Universidade Federal Rural de Pernambuco Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

Márcia Pereira da Silva

Análise de memória em cinética de canais iônicos. Teoria e aplicação.

Recife 2022



# Universidade Federal Rural de Pernambuco Márcia Pereira da Silva

Análise de memória em cinética de canais iônicos. Teoria e aplicação.

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

Orientador: Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues

> Recife 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação Universidade Federal Rural de Pernambuco Sistema Integrado de Bibliotecas Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M319a Silva, Márcia Pereira da

Análise de memória em cinética de canais iônicos. Teoria e aplicação. / Márcia Pereira da Silva. - 2022. 159 f. : il.

Orientador: Romildo de Albuquerque Nogueira. Coorientador: Claudio Gabriel Rodrigues. Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2022.

1. Correlação de longo alcance. 2. Análise de Flutuação Destendenciada. 3. Entropia Aproximada. 4. Alfa-hemolisina. 5. Bicamada Lipídica Plana. I. Nogueira, Romildo de Albuquerque, orient. II. Rodrigues, Claudio Gabriel, coorient. III. Título

CDD 636.089

Márcia Pereira da Silva

## Análise de memória em cinética de canais iônicos. Teoria e aplicação.

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

**Área de concentração**: Biotecnologia na linha de Estudo dos Mecanismos e Processos Celulares Básicos na Ciência Animal

### APROVADA em 28 de fevereiro de 2022

Banca Examinadora

Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE Presidente

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

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior Departamento de Bioquímica - UFPE

Dr. Ramón Enrique Ramayo González Departamento de Física - UFRPE

Dr. Thiago de Salazar e Fernandes Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE

## Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à Deus que sempre cuida de mim e dos meus sonhos.

Agradeço ao meu pai José Brasil, que mesmo em meios a tantas dificuldades financeiras e não tendo concluído o ensino fundamental e médio até seus 50 anos de idade, sempre soube a importância do estudo e nos deu o suporte suficiente para o nosso estudo. 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.

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 e meus irmãos que muito me ajudaram e incentivaram nesta minha trajetória.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dijanah Cota Machado, pelo apoio sempre que solicitada.

A todas as colegas e amigos que de uma forma contribuíram para a realização e conclusão desse trabalho.

Á 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.

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) apoio financeiro.

Muito obrigada!

"Eu gosto de um universo que inclui muito do que é desconhecido e, ao mesmo tempo, muito do que pode ser conhecido. Um universo em que tudo é conhecido seria estático e monótono, tão chato... Já um universo em que não se pode conhecer novas coisas não é lugar adequado para um ser pensante. O universo ideal para nós é muito parecido com o universo que habitamos, e sinto que isso não é uma coincidência. "

Carl Sagan

### Resumo

Os canais iônicos são proteínas integrais presentes nas membranas celulares responsáveis pelas trocas iônicas entre os meios intra e extracelulares e entre as organelas e o citoplasma. Eles estão envolvidos em muitos processos fisiológicos, como a geração de impulsos nervosos, secreção hormonal, batimento cardíaco, entre inúmeros outros processos. A cinética dos canais iônicos é classicamente tratada como um processo aleatório, conhecido como processo de Markov. Mais recentemente, no entanto, vários estudos mostraram que esse processo não é aleatório, mas sim determinístico, ou seja, é histórico-dependente. Essa propriedade é chamada de memória longa ou correlação de longo alcance. No entanto, ainda há muita controvérsia a respeito de como essa propriedade se origina e qual região do canal é responsável por essa propriedade. Na presente tese de doutorado foi realizada uma revisão da literatura sobre memória em cinética de canais iônicos e publicada no periódico Acta Biotheoretica, no ano de 2021. Nesta revisão são discutidos quais os fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados com a origem da memória longa na cinética dos canais iônicos, quais modelos reproduzem melhor o efeito memória, quais métodos matemáticos são utilizados para sua análise, como também a ubiquidade dessa propriedade em diferentes tipos de canais iônicos. Nas etapas de análises experimentais, aplicamos o método de Entropia Aproximada para investigar a existência de aleatoriedade no processo cinético dos canais de ahemolisina de Staphylococcus aureus, bem como o método de Análise de Flutuação Destendenciada (Detrended Fluctuation Analysis-DFA) para investigar a existência de memória longa nesse processo. Esses canais foram incorporados em bicamadas lipídicas compostas por difitanoilfosfatidilcolina construídas pela aposição de duas monocamadas lipídicas a um orifício de uma partição que separa dois compartimentos aquosos. Todos os experimentos foram realizados nas seguintes condições: solução tamponada de NaCl 1M, pH 4,5; voltagem de 40 mV e temperatura de 25 ± 1 ° C. As correntes no canal unitário foram registradas em tempo real na memória de um microcomputador acoplado a um conversor A/D e um amplificador de patch-clamp. O valor médio da condutância dos canais de  $\alpha$ -hemolisina foi de 0,82  $\pm$  0,0025 nS (n = 128). Nossos resultados mostraram que a cinética dos canais é um processo determinístico, com presença de memória longa ( $DFA_{\alpha}$  = 0,63 ± 0,04) e que o expoente de Hurst após a aleatorização dos dados foi de 0,51 (± 0,03), comprovando que a presença de memória longa é uma característica do processo cinético dos canais e não um artefato da série numérica. Os resultados obtidos através do método de entropia aproximada ( $ApEnA = 0.55142 (\pm 0.28; ApEnF = 0.114472 \pm 0.082541)$ corroboram com os resultados do método DFA, eles mostraram que a complexidade das séries originais do estado aberto, tendem a aumentar após randomização dos dados, o que demostra que o comportamento das séries possui repetições de padrões ao longo do tempo, sendo um indicativo de presença de uma dinâmica determinística. Os resultados das nossas análises demonstraram que mesmo canais iônicos simples, que não são formados por grandes domínios de proteínas e não possuem domínios de gating, também apresentam um comportamento determinístico, com presenca de memória longa.

**Palavras-chave:** Correlação de longo alcance; Análise de Flutuação Destendenciada; Entropia Aproximada; α-hemolisina; Bicamada Lipídica Plana.

### Abstract

Ion channels are integral proteins present in cell membranes responsible for ionic flux between intra and extracellular environment and between organelles and the cytoplasm. They are involved in many physiological processes, such as the generation of nerve impulses, hormone secretion, heartbeat, among countless other processes. The kinetics of ion channels is classically treated as a random process, known as the Markov process. More recently, however, several studies have shown that this process is not random, but deterministic, that is, it is history dependent. This property is called long memory or long-term correlation. However, there is still a lot of controversy as to how this property originates and which region of the channel is responsible for this property. In the present doctoral thesis, we carried out a review of the literature on memory in ion channel kinetics and published it in the journal Acta Biotheoretica, in the vear 2021. In this review, the intrinsic and extrinsic factors related to the origin of long memory in channel kinetics are discussed, which models best reproduce the memory effect, which mathematical methods are used for its analysis, as well as the ubiquity of this property in different types of ion channels. In our experimental analyses, we applied the Approximate Entropy method to investigate the existence of randomness in the kinetic process of the  $\alpha$ -hemolysin channels of Staphylococcus aureus, as well as the Detrended Fluctuation Analysis-DFA method to investigate the existence long memory in this process. These channels were incorporated into lipid bilayers composed of difitancylphosphatidylcholine constructed by apposition of two lipid monolayers to an orifice of a partition that separates two aqueous compartments. All experiments were performed under the following conditions: 1M NaCI buffered solution, pH 4.5; voltage of 40 mV and temperature of 25 ± 1 ° C. Ionic currents in the single-channel were recorded in real time in the memory of a microcomputer coupled to an A/D converter and a patch-clamp amplifier. The mean value of the conductance of the  $\alpha$ -hemolysin channels was 0.82  $\pm$  0.0025 nS (n = 128). Our results showed that the channel kinetics is a deterministic process, with the presence of long memory  $(DFA_{\alpha} = 0.63 \pm 0.04)$  and that the Hurst exponent after data randomization was  $0.51 (\pm 0.03)$ , proving that the presence of long memory is a characteristic of the kinetic process of the channels and not an artifact of the numerical series. The results obtained through the approximate entropy method (AvEnA = $0.55142 (\pm 0.28; ApEnF = 0.114472 \pm 0.082541)$  corroborate the results of the DFA method, they showed that the complexity of the original open state series tend to increase after randomization of the data, which shows that the behavior of the series has repetitions of patterns over time, indicating the presence of a deterministic dynamics. Our results showed that even simple ion channels, which are not formed by large protein domains and are not have gating domains, they also have a deterministic behavior, with the presence of long memory.

**Key word:** Long-term correlation; Detrended Fluctuation Analysis; Approximate Entropy; α-hemolysin; Planar Lipid Bilayer.

Sumário	47
1. Introdução	17
2. Objetivos	20
3. Revisão de Literatura	22
3.1 Canais Iônicos	22
3.1.1 Mecanismo de gating dos canais iônicos	23
3.1.2 Seletividade iônica	24
3.1.3 Permeabilidade iônica	25
3.1.4 Disfunções dos canais iônicos: canalopatias	26
3.1.5 Canais lônicos como alvos de novos medicamentos	26
3.2 Cinética dos Canais Iônicos	27
3.3 Correlação de longo alcance	29
3.4 A propriedade de memória longa é uma propriedade ubíqua	31
3.4.1 Memória em peptídeos antimicrobianos formadores de canais iônicos	32
3.4.2 Memória em canais de íons de potássio	34
3.4.3 Memória em canais de íons BK	35
3.4.4 Memória em canais iônicos seletivos a ânion	37
3.5 Origem da memória longa	38
3.5.1 Origem a partir dos estímulos de gating	39
3.5.2 Origem a partir da dinâmica presente no estado fechado	40
3.5.3 Origem a partir do mecanismo de ação do mecanismo de gating	41
3.5.4 Origem a partir das flutuações da espessura da membrana	42
3.5.5 Origem é a partir de uma memória metabólica	43
3.5.6 Origem a partir da criticalidade auto-organizada	43
3.6 Métodos matemáticos de análise de memória longa	44
3.7 Aplicação: Investigação da presença de memória na cinética de canais formados α-Hemolisina de Staphylococcus aureus em bicamadas lipídicas planas	s pela 45
3.7.1 A α-hemolisina (α-HL) de Staphylococcus aureus	45
3.7.2 Canais formados pela α-hemolisina produzida pelo Staphylococcus aureus	46
4. Materiais e Métodos	50
4.1 Formação da bicamada lipídica	50
4.2 Sistema de aquisição dos registros de canal unitário	52
4.3 Processamento e análise de dados	52
4.4 Análise de dados: Análise de flutuação destendenciada (DFA)	53
4.5 Entropia Aproximada	54
4.6 Análise Estatística	56
REFERÊNCIAS	57

Capítulo 01: Versão em português do artigo publicado na Revista Acta Biotheoretica em Maio de 2021: Memory in Ion Channel Kinetics70
1 Introdução71
2 Importância da Memória74
3 Como identificar a presença de memória longa na cinética dos canais iônicos?75
4 Métodos matemáticos formais para análise de memória77
5 Memória longa é uma propriedade ubíqua a todos os canais iônicos?
6 Modelos matemático capazes de simular memória85
7 Origem da Memória97
8 Conclusões
Capítulo 02: Versão em português do manuscrito submetido a revista Acta Biotheoretica: 107
Análise de memória de longo alcance em canais iônicos formados por α-hemolisina Staphylococcus aureus
Introdução109
1.1 Cinéca dos canais iônicos109
1.2 Canal iônico de α-hemolisina de <i>Staphylococcus aureus</i>
1.3 Memória Longa111
2. Materiais e Métodos
2.1 Materiais113
2.2 Métodos113
2.2.1 Registros de canais unitários113
2.2.2 Análise de Dados114
Análise de Flutuações Destendenciadas (DFA)114
Entropia Aproximada115
3. Resultados e Discussão117
3.1 Caracterização cinética do canal formado pela α-hemolisina de <i>Staphylococcus aureus</i> em bicamada lipídica plana117
3.2 Análise de Flutuações Destendenciadas (DFA)121
3.3 Entropia Aproximada123
4. Conclusões
Considerações Finais
Anexos
Anexo 01: Artigo publicado na Revista Acta Biotheoretica intitulado "Memory in Ion Channel Kinetics"133

### Lista de Figuras

**FIGURA 01.** Representação esquemática do canal de potássio inserido em uma bicamada lipídica. A figura mostra os diferentes domínios do canal iônicos, sendo possível observar o filtro de seletividade, a região de gate e a cavidade central. Adaptado de KOPEC *et al.* (2018). ......<sup>22</sup>

FIGURA 2. Mecanismo de *gating* dos canais KirBac1.1 A. Na região voltada para o interior das células os canais apresentam um sequências de aminoácidos, presentes no domínio poro-gate, que modificam sua conformação em resposta a estímulos e assim transitam entre diferentes estados de fechado (B) e aberto (C). Adaptado de AMANI *et al.* (2020).

FIGURA 3. Figura esquemática da estrutura do canal iônicos especificando a região que forma o filtro de seletividade. Adaptado de 25 PETKOV (2009).

**FIGURA 4:** Registro da corrente iônica através de canais formados pela  $\alpha$ -hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus*. A linha tracejada na parte superior indica que a proteína formadora do canal se encontra em um estado conformacional que permite a passagem do fluxo iônico, dessa forma temos valores de correntes superiores a zero. A linha tracejada inferior indica que o canal se encontra em um estado conformacional que impede o fluxo iônico através do seu poro hidrofílico, nessa condição temos valores de correntes próximos de zero. (Imagem do autor)

29

**FIGURA 5:** Canal iônico formado pela α-hemolisina. A. Visão lateral do canal iônico, onde pode ser observado que a região troncular se insere completamente na membrana lipídica, a região copal, que não se insere na membrana lipídica e a região anelar (parte inferior da copa) fica ancorada na membrana; B. Visão superior com cada subunidade

representada em diferentes cores. Adaptado do Protein Data Bank (PDB), código 7AHL.	48
<b>FIGURA 6:</b> Processo de formação da bicamada lipídica plana através da aposição de duas monocamadas lipídicas. Adaptado de GUTSMANN et	
al., 2015	51
<b>FIGURA 7</b> . Esquema do canal unitário formado pela α-hemolisina produzida pelo <i>Staphylococcus aureus</i> incorporado em bicamada lipídica	
plana formada no orifício da partição de Teflon <sup>®</sup> Adaptado de CARNEY et al., 2013 e LUNDBÆK et al., 2010.	51
FIGURA 8. Sistema de aquisição e monitoramento dos registros das	
correntes iônicas. (Imagem do autor)	52
FIGURA 9. Processo de idealização dos registros de canais unitários. O	
software QuB (versão 2.0.0.34) analise todos os valores de correntes do	
registro e com base no valor médio é identificado os tempos em que o	
canal permaneceu em cada um dos estados. Através do método de Half-	
Amplitude, o QuB considera que abaixo de 50% do valor da corrente do	
registro o canal está no estado fechado e acima de 50% o canal está no	
estado aberto (isso para canais registradas em correntes positivas. Para	
registros obtidos em voltagens negativas o contrário é verdadeiro).	
(Imagem do autor)	53

### Listas de Figuras do Capítulo 01

**FIGURA 01.** Coeficiente  $\alpha$ -DFA na cinética do canal BK em célula de Leydig. a. Mostra o registro da corrente iônica através de canal unitário; b. Mostra o valor do  $\alpha - DFA$  da série temporal com os tempos de permanência do canal BK nos estados abertos e fechados (série temporal com memória); c. Mostra o valor do  $\alpha - DFA$  da série temporal com os tempos de permanência do canal BK nos estados abertos e fechados após a randomização dos dados (série temporal sem memória). A corrente iônica foi registrada na configuração *outside-out*, de canais do tipo BK de células de Leydig de camundongos, sob uma voltagem constante de -60 mV, e uma concentração de cálcio [Ca2+] = 0,05 µM. A seta indica o estado fechado do canal. .....

**FIGURA 2**. Mapa caótico do modelo de Bahramian et al. (2019). A parte inferior representa o estado fechado e a parte superior representa o 87 estado aberto. A linha vermelha é uma bissetriz do primeiro quadrante...

FIGURA 3 Ilustração esquemática dos modelos de cinética de canais iônicos propostos por Wawrzkiewicz et al. (2012). O espaço conformacional do modelo é subdividido em 20 unidades utilizados como espaço difusivo. O limiar entre o estado aberto e fechado é representado por TP, que dividem o espaço unidimensional em dois subconjuntos que representam os estados fechados e abertos. A parte negativa corresponde aos estados fechados do canal, e uma parte positiva corresponde ao estado aberto. A coordenada de reação x representa a conformação real da gate do canal. As linhas verde, vermelha e azul são as representações esquemáticas da função potencial associada aos modelos. O perfil de variação de energia nos estados aberto e fechado é específico em cada modelo e pode ser modificado de diferentes formas, pela ação da força de deriva. a. Representação esquemática do Modelo 1. Neste modelo TP é mantido fixo e o espaço unidimensional é limitado pelos dois limites móveis B1 e B2, que simultaneamente diminuem ou expandem o espaço acessível

Pág.

### Listas de Figuras do Capítulo 02

**FIGURA 01.** Representação esquemática do canal de potássio inserido em uma bicamada lipídica. A figura mostra os diferentes domínios do canal iônicos, sendo possível observar o filtro de seletividade, a região de gate e a cavidade central. Adaptado de KOPEC *et al.* (2018). ......<sup>1</sup>

**FIGURA 02:** Registros de correntes iônicas através de canais unitários formados por α-hemolisina de *Staphylococcus aureus* em diferentes condições experimentais onde é possível observar a mudança na dinâmica da cinética desses canais ocasionadas por variações nas condições experimentais. A. 40 mV, NaCl 1M, pH 7,0; B. 40 mV, KCl 1M, pH 7,4; C. 200 mV, NaCl 1M, pH 7,0; D. 40 mV, NaCl 1M, pH 4,5...... 118

**FIGURA 5**. Valores de ApEn da série original do canal a-HL nos estados aberto e fechado e valores de ApEn dessas séries após a randomização dos dados (teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5%). ... 124

Pág.

## Lista de tabelas

Tabela	1:	Coeficiente	de	Hurst	(método	DFA)	da	série	de	tempo	de	
perman	ênci	a nos estado	s ab	erto-fe	chado do	canal o	-HL					122

Tabela 2: Entropia aproximada das séries dos tempos de permanência do	
canal $\alpha$ -HL nos estados aberto e fechado ante e depois da randomização das	
séries	123

Introdução

## 1. Introdução

Os canais iônicos são proteínas integrais presentes nas membranas celulares que permitem o fluxo de íons através da bicamada lipídica. Tal fluxo está envolvido em diversos processos celulares e fisiológicos, tais como geração de potenciais de ação, contração muscular, transmissão dos impulsos nervosos, batimentos cardíacos, secreção celular dentre muitas outras funções (HILLE, 2001). Além disso os canais iônicos estão envolvidos também na origem de inúmeras doenças, denominadas canalopatias. Portanto, possuem enorme importância tanto na biologia quanto na farmacologia e medicina (FERMINI, 2008).

Muitos autores descrevem o processo cinético desses canais como sendo um processo Markoviano, ou seja, possuem um comportamento aleatório e pesquisas que envolvem modelagem dessas proteínas são ainda modelados pelo formalismo das cadeias de Markov (SAKMANN; NEHER, 1995; COX et al., 1997; SCHMANDT; GALAN, 2012; CHEN et al., 2019). No entanto, hodiernamente, muitos autores demonstraram que a cinética de diferentes tipos de canais iônicos é considerada um processo determinístico, que apresenta a propriedade de memória longa, processo também conhecido como correlação de longo alcance (NOGUEIRA et al., 1995; VARANDA et al., 2000; SIWY et al., 2001; BANDEIRA et al., 2008; FUENTE et al., WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA 2017: et al., 2018; WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA et al., 2020A; WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA et al., 2020b; MIŚKIEWICZ et al., 2020).

A presença de memória longa em inúmeros processos biológicos pode ser determinada através do uso de métodos matemáticos e permitem compreender propriedades que não podem ser analisados 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, Análise de Flutuações Destendenciadas (DFA) e Entropia Aproximada têm sido utilizados para análise dessa propriedade em sistemas biológicos (NOGUEIRA et al., 1995; SIWY et al., 2001; HOLZINGER, 2012; FUENTE et al., 2017).

De acordo com Silva et al. (2021), atualmente ainda não existe um consenso sobre qual a origem da memória presente na cinética dos canais iônicos. Existem diferentes explicações sobre onde se originaria essa capacidade dos canais iônicos repetir um padrão de comportamento ao longo do tempo. Portanto mais estudos são necessários para uma maior compreensão dessa propriedade, se ela pode ser modulada por agentes externos e qual região do canal, ou fatores externos a ele, origina tal comportamento.

Sabendo da ausência de um consenso sobre a origem da memória longa na cinética dos canais iônicos, a utilização de um canal iônico simples, com maior facilidade de modulação do seu comportamento cinético pode servir de modelo para estudos sobre essa propriedade e pode gerar um maior entendimento das suas possíveis origens. Assim, acreditamos que utilizar canais iônicos formados pela  $\alpha$ -hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus* ( $\alpha$ -HL) pode ser um excelente meio de investigar se tal memória está presente em canais iônicos cujo mecanismo de *gating* é simples como também inferir qual poderia ser a origem biológica de tal propriedade.

Os canais de α-HL são formados por peptídeos hidrofílicos capazes de oligomerizar e formar canais transmembranares heptaméricos (GOUAUX *et al.*, 1994; SONG *et al.*, 1996; BERUBE; WARDENBURG 2013; WILSON *et al.*, 2019; DIVYAKOLU *et al.*, 2019) nas membranas lipídicas de uma célula suscetível, cujo poro central é preenchido por água (BHAKDI; TRANUN-JENSEN, 1991; SEILIE; WARDENBURG, 2017). Estes canais são permeáveis a diferentes cátions, ânions e a pequenas moléculas orgânicas (MENESTRINA, 1986; KRASILNIKOV; SABIROV, 1989; BHAKDI; TRANUN-JENSEN, 1991; WALEV *et al.*, 1993; EIFFLER *et al.*, 2016; GUROS; BALIJEPALLI; KLAUDA, 2018).

Há muito interesse em estudar canais iônicos biológicos devido aos papéis importantes que tais estruturas desempenham na fisiologia das organelas, células e tecidos (HILLE, 2001). Além disso, alterações na estrutura e função das proteínas formadoras de canais podem produzir doenças, as chamadas canalopatias (KUZMENKIN *et al.*, 2007). O estudo da dinâmica de aberturas e fechamentos desses canais possibilitam um maior entendimento de processos fisiológicos importantes (HILLE, 2001). Muitos estudos tem analisado tais canais iônicos como alvos importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos (BAGAL *et al.*, 2013). Aproximadamente 18% dos medicamentos compostos por pequenas moléculas, registrados no banco de dados moléculas bioativas com propriedades semelhantes a

drogas (ChEMBL Database), é direcionado para canais iônicos (SANTOS *et al.*, 2017), com vendas globais em torno de US \$ 12 bilhões (HUTCHINGS *et al.*, 2019).

O estudo dos canais iônicos tem auxiliado na descoberta de drogas para o tratamento de doenças, drogas usadas como anestésicos locais e gerais, como também na elucidação da gênese de inúmeras doenças decorrente de disfunções destes canais (SANTOS, 2017). De acordo com Borys (2020), se conseguirmos compreender qual a origem da memória longa na cinética dos canais iônicos e qual o seu significado para a fisiologia do organismo vivo, podemos utilizar tal propriedade como alvo de pesquisas de novos medicamentos.

Portanto, esta é uma grande motivação prática para a obtenção de mais conhecimento sobre estrutura, mecanismo de ação, atividade, e as propriedades que governam o funcionamento dos canais iônicos, produzindo assim conhecimento de grande importância para as áreas de biologia, farmacologia e médica.

Neste trabalho foi realizada uma revisão da literatura sobre memória na cinética de canais iônicos, como também foi investigada a presença ou ausência de memória de longo alcance na cinética dos canais iônicos formados pela  $\alpha$ -hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus* ( $\alpha$ -HL). A compreensão desses processos é de grande importância para um maior entendimento dos mecanismos biofísicos que regem a função dos canais iônicos, como também para analisarmos a capacidade dos canais de  $\alpha$ -HL serem utilizados como modelos para análise da propriedade de memória longa na cinética dos canais iônicos.

# 2. Objetivos

## 3.1 Objetivos Gerais

Investigar a propriedade de memória longa no comportamento cinético dos canais iônicos.

## 3.2 Objetivos Específicos

a. Análise teórica da presença de memória na cinética dos canais iônicos.

b. Investigar a existência de correlação de longo alcance através do método de DFA nas sequências de aberturas e fechamentos dos canais iônicos formados pela α-hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus*.

c. Investigar a complexidades da cinética dos canais formados pela α-hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus*, usando-se o método Entropia Aproximada;

Revisão de Literatura

## 3. Revisão de Literatura

### 3.1 Canais Iônicos

Os canais iônicos são proteínas presentes nas membranas celulares cuja função é permitir o fluxo de íons entre os meios intercelular e extracelular, bem como entre o citoplasma e o interior das organelas. Estruturalmente, os canais iônicos são poros transmembrana formados por proteínas integrais com múltiplas subunidades que formam domínios especializadas como filtro de seletividade e sensores de estímulo para abertura e fechamento do canal. Alguns canais são grandes peptídeos formados por uma única subunidade, mas muitas contém várias subunidades proteicas (FIGURA 01) (HILLE, 2001).

FIGURA 01: Representação esquemática do canal de potássio inserido em uma bicamada lipídica. A figura mostra os diferentes domínios do canal iônicos, sendo possível observar o filtro de seletividade, a região de gate e a cavidade central.



Fonte: Adaptado de KOPEC et al. (2018).

Apesar da grande variabilidade estrutural que os canais iônicos apresentam, dependendo do tipo de canal ou da localização desses, eles compartilham 3 propriedades biofísicas básicas: *gating*, seletividade e permeabilidade (HILLE, 2001).

### 3.1.1 Mecanismo de gating dos canais iônicos

Os canais iônicos alternam entre diferentes conformações como um resultado de estímulos intra ou extracelular, que modificam o diâmetro do poro central dos canais, ora permitindo a passagem do fluxo iônico, ora bloqueando tal fluxo. Dessa forma, controlam e regulam a atividade elétrica e química nas células (HILLE, 2001; FLOOD *et al.*, 2019). Tais mudanças conformacionais são moduladas por ligantes, variação de voltagens, variação de pH, entre outros fatores (MORAN *et al.*, 2015; BOSCARDIN *et al.*, 2016; ALEXANDER *et al.*, 2017).

Esse processo de abertura e fechamento dos canais é denominado de mecanismo de *gating* (FIGURA 02). Esse mecanismo pode ser realizado por alguns canais através do filtro de seletividade, no entanto, de uma maneira geral, os canais iônicos possuem uma região especializada que desempenha esse papel, o domínio poro-*gate* (ROUX, 2017).

FIGURA 02: Mecanismo de *gating* dos canais KirBac1.1 A. Na região voltada para o interior das células os canais apresentam sequências de aminoácidos, presentes no domínio poro-gate, que modificam sua conformação em resposta a estímulos e assim transitam entre diferentes estados de fechado (B) e aberto (C).



Fonte: Adaptado de AMANI et al. (2020).

### 3.1.2 Seletividade iônica

A elevada seletividade a um dado íon específico ou a uma classe de íons está presente na grande maioria dos canais iônicos. Essa seletividade ocorre devido a presença do filtro de seletividade, formado por uma região rica em resíduos de aminoácidos carregados voltados para o interior do canal (FIGURA 03). A seletividade do canal a um determinado íon não se dá apenas pelo seu diâmetro. Obviamente íons que possuem um diâmetro maior que o diâmetro do canal tem sua passagem através do canal bloqueada. No entanto íons com diâmetro inferior ao diâmetro do canal não necessariamente são selecionado e passarão através do poro central do canal (HILLE, 2001).

No caso dos canais de potássio, por exemplo, os íons de sódio possuem diâmetro inferior ao diâmetro dos íons de potássio e seu fluxo através dos canais de potássio é bloqueado. Isso se deve ao fato de que em uma solução, os íons são cercados por moléculas de água, sendo hidratados, possuindo assim uma camada de solvatação. Isso muda o diâmetro total do íon. Para fluir através do canal, o íon precisa ser desidratado antes de entrar no filtro de seletividade. No interior do canal iônico, os resíduos de aminoácidos possuem cadeias de átomos de oxigênio da carbonila que se estendem ao longo do filtro de seletividade formando quatro sítios de ligação para os íons de potássio. Esses sítios de ligação possuem uma correspondência perfeita para o íon K<sup>+</sup>. Assim, mesmo os íons de sódio possuindo um diâmetro menor do que os íons de potássio, eles não são selecionados devido esse mecanismo, gerando uma elevada seletividade presente na maioria dos canais iônicos (PETKOV, 2009).

FIGURA 03: Figura esquemática da estrutura do canal iônicos especificando a região que forma o filtro de seletividade.



## Fonte: Adaptado de PETKOV (2009).

### 3.1.3 Permeabilidade iônica

O fluxo através dos canais iônicos é crucial para manutenção da vida. Estando envolvido em diversos processos celulares e fisiológicos, sendo responsáveis pela despolarização, repolarização e hiperpolarização de membranas, participando assim da geração de potenciais de ação, contração muscular, transmissão dos impulsos nervosos, batimentos cardíacos, secreção e controle do volume celular, dentre muitos outros processos (HILLE, 2001; FERMINI, 2008; LIPSCOMBE; WYLLIE, 2018).

O movimento direcional de íons através do poro central dos canais iônicos é um fenômeno elétrico e possui um fluxo de 10<sup>6</sup> íons/segundo através de um canal unitário. Essa corrente elétrica, tipicamente, apresenta-se na faixa de pico ampere (pA). Tal fluxo é determinado pelo gradiente eletroquímico gerado tanto pela diferença de concentração de íons nos espaços intra e extramembranar, quanto pela diferença de potencial ao longo da membrana (HILLE *et al.*,2001; PETKOV, 2009; ROUX, 2017). Já a facilidade com que esse fluxo iônico ocorre entre dois pontos é chamado de condutância, e é medido em Siemens (S), estando na faixa pico Siemens (pS) (PETKOV, 2009).

### 3.1.4 Disfunções dos canais iônicos: canalopatias

A dinâmica dos canais é especifica para o tipo de canal e depende das condições do ambiente onde o canal está inserido. Variações das condições ambientais, tais como espessura e composição da bicamada lipídica são capazes de alterar a função do canal, podendo ocasionar até em perda de funcionalidade desses canais. Além disso, alterações na sequência de aminoácidos das proteínas formadoras de canal podem alterar o seu funcionamento (KELKAR; CHATTOPADHYAY 2007; LUNDBÆK *et al.* 2010).

Mutações nos genes codificadores das proteínas formadoras de canais ou mudanças na interação proteica pode levar a alterações no mecanismo de ação dessas estruturas levando a perda ou ganho de função gerando patologias denominadas canalopatias (IMBRICI *et al.*, 2016) tais como epilepsia, diabetes mellitus, cardiopatias, paralisia muscular, entre outras patologias (KUZMENKIN *et al.*, 2007). Dessa forma os canais iônicos são um alvo importante para o desenvolvimento de novas drogas (ZAMPONI *et al.*, 2015; WEYER-MENKHOFF; LÖTSCH, 2018).

Canais afetados por essas mutações podem sofrer alteração nos tempos de permanência nos diferentes estados de condutância, podendo residir por um tempo mais curto ou mais longo que o normal no estado aberto, através de modificações da probabilidade de abertura. Alterações no tempo de permanência dos canais nos diferentes estados de condutância pode ser observado no caso da paralisia periódica hipocalêmica tipo 1, o que acarreta em mudanças no comportamento dos processos macroscópico no qual esses canais estão envolvidos, levando a paralisia muscular (KUZMENKIN *et al.*, 2007).

### 3.1.5 Canais lônicos como alvos de novos medicamentos

Aproximadamente um terço de todo o genoma codifica proteínas de membrana e, mais de dois terços dos medicamentos no mercado têm proteínas de membrana como alvos (LIU; CAFFREY, 2005). As proteínas formadoras de canais iônicos são a segunda classe mais abundante de proteínas de membrana envolvidas na descoberta de drogas (HUTCHINGS *et al.*, 2019).

Inúmeras pesquisas estão envolvidas na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos. Dentre essas pesquisas, o alvo de novas drogas são canais de

diferentes tipos tais como canais de cálcio, potássio, sódio, dentre outros. Tais medicamentos atuariam modulando o comportamento de canais iônicos, agindo assim como analgésicos, bem como no tratamento de doenças como doenças cardiovasculares, arritmias cardíacas, dores crônicas, dentre inúmeras outras doenças (SANTOS *et al.*, 2017).

De acordo com Wawrzkiewicz-Jałowiecka *et al.* (2020b), por exemplo, um completo entendimento do processo de abertura e fechamento de canais iônicos do tipo BK aumentaria as chances de desenvolvimento de novas drogas que iriam auxiliar no combate ao glioblastoma, um tipo de câncer cerebral. Vendas globais de medicamentos que atuam de alguma forma em canais iônicos arrecadam em torno de US \$ 12 bilhões (HUTCHINGS *et al.*, 2019; KOIVISTO *et al.*, 2021).

### 3.2 Cinética dos Canais Iônicos

O processo de abertura e fechamento dos canais iônicos ocorrem através de mudanças conformacionais, que permitem o canal ora permitir, ora bloquear a passagem dos íons. Esse processo é denominado de cinética dos canais iônicos (HILLE, 2001; BAGAL *et al.*, 2013). As mudanças conformacionais dos canais iônicos estão relacionadas ao mecanismo de *gating* e são essas mudanças conformacionais que controlam o fluxo iônico entre os ambientes intra e extracelular (SYCHEV; IVANOV, 2014), que permitem que esses canais possam abrir por um breve momento e fechar novamente (YELLEN, 2002). A energia usada para as transições entre os diferentes estados conformacionais é derivada das flutuações térmicas no ambiente ao redor do canal e de estímulos endógenos ou exógenos (LIEBOVITCH; FISCHBARG; KONIAREK, 1987).

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:

### Fechado ≓ Aberto

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

A cinética dos canais iônicos é tradicionalmente vista como um processo aleatório, processo Markoviano, no qual o processo de transição entre estados de condutância seria inteiramente probabilístico. Em outras palavras, os eventos de abertura ou fechamento não seriam influenciados por um evento passado e dependem apenas do estado presente (se estiver aberto, é possível calcular as probabilidades de que o canal permanecerá aberto ou mudará para um estado fechado) (COLQUHOUN; HAWKES 1981; ASHCROFT 2000; LIEBOVITCH; KREKORA, 2002; PETKOV, 2009).

Muitos autores ainda têm descrito a cinética do canal iônico como sendo um processo Markoviano e pesquisas que envolvem modelagem dessas proteínas ainda são modelados pelo formalismo das cadeias de Markov (SAKMANN; NEHER 1995; COX *et al.*, 1997; SCHMANDT; GALAN, 2012; CHEN *et al.*, 2019). Entender a cinética dos canais iônicos dessa forma, é assumir que esses canais alternam entre estados discretos de condutância, separados por barreiras de energia altas e discretas e que as probabilidades de transição entre as conformações abertas e fechadas são consideradas independentes do tempo, ou seja, é um processo randômico (COLQUHOUN; HAWKES, 1977; LIEBOVITCH *et al.*, 1987; LIEBOVITCH; KREKORA, 2002). Por causa desse tipo de comportamento, o modelo markoviano tradicional prevê que os tempos de permanência do canal no estado aberto ou fechado seguem uma distribuição exponencial (COLQUHOUN; HAWKES, 1994), ou uma soma de exponenciais, quando o canal apresenta um processo de abertura e fechamento composto por diferentes subestados (LIEBOVITCH; TOTH, 1991).

No entanto, diferentes processos fisiológicos não se comportam de forma randômica e são governados por leis determinísticas. Eles são caóticos, fractais, ou de alguma forma um processo determinístico. Exemplos desse determinismo em processos biológicos podem ser observados no crescimento dos organismos, na frequência cardíaca, nos processos envolvidos na atividade cerebral, no metabolismo celular, no crescimento de tumores, na vascularização extraembrionária, na condensação da cromatina, entre outros (FERNANDES *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2014; AGUIAR *et al.*, 2015b; BASSIL *et al.*, 2017; SZASZ *et al.*, 2018; XAVIER *et al.*, 2018; GUPTA *et al.*, 2020). Esse comportamento também tem sido observado em diferentes tipos de canais iônicos.

A partir de registros de canais unitários é possível extrair séries temporais compostas pelos tempos de permanência em que os canais residem nos estados abertos e fechados (FIGURA 4). Análise das séries temporais obtidas a partir desses tempos de permanência permite obter informações sobre o comportamento cinético

dessas proteínas (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Análises realizadas tanto em canais iônicos presentes na membrana plasmática, bem como canais presentes em membranas de organelas celulares têm mostrado que o comportamento dos canais iônicos é governado por leis determinísticas. Dessa forma a cinética de diferentes tipos de canais iônicos é considerada um processo que exibe correlação de longo alcance, ou seja, existe uma memória longa no processo cinéticos desses canais (NOGUEIRA *et al.*, 1995; VARANDA *et al.*, 2000; SIWY *et al.*, 2001; BANDEIRA *et al.*, 2008; FUENTE *et al.*, 2017; WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA *et al.*, 2018; WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA *et al.*, 2018; MIŚKIEWICZ *et al.*, 2020).

FIGURA 4: Registro da corrente iônica através de canais formados pela α-hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus*. A linha tracejada na parte superior indica que a proteína formadora do canal se encontra em um estado conformacional que permite a passagem do fluxo iônico, dessa forma temos valores de correntes superiores a zero. A linha tracejada inferior indica que o canal se encontra em um estado conformacional que impede o fluxo iônico através do seu poro hidrofílico, nessa condição temos valores de correntes próximos de zero.



Fonte: Imagem do autor.

### 3.3 Correlação de longo alcance

Do ponto de vista da neurociência, a memória é a capacidade de adquirir, armazenar, e recuperar informações (KANDEL *et al.*, 2000). O conceito de memória pode variar um pouco seu significado quando analisado a partir de diferentes perspectivas, como na área da imunologia, da física, da biologia molecular, bem como na área de estatística, mas sempre se refere à capacidade de armazenar e recuperar tais informações no futuro (LENDLEIN, KELCH, 2002; BERAN *et al.*, 2013; FUENTE, 2015; FREER *et al.*, 2017; LEA, 2018; PRADEU; DU PASQUIER, 2018).

Numa perspectiva matemática, a memória longa, também chamada de correlação de longo alcance, pode ser entendida como a persistência de autocorrelação em um conjunto de dados, que decai mais lentamente do que uma taxa exponencial associada ao processo estocástico (BAILLIE, 1996), podendo decair de acordo com uma lei de potência, por exemplo. A presença de memória de longo alcance em um determinado processo significa que há um padrão particular que se repete ao longo do tempo de observação do fenômeno (LI e KANEKO, 1992).

A presença de memória longa em uma série temporal significa que pontos distantes no tempo estão correlacionados, que essa correlação persiste ao longo do tempo e diminui lentamente (HUGHES; LEE, 2015). De acordo com Morettin e Toloi (2004), este processo de memória longa pode ser caracterizado por um lento decaimento para zero da função hiperbólica de autocorrelação, e sua função de densidade espectral não é limitada na frequência zero.

Muitas pesquisas têm demonstrado que leis determinísticas também governam o comportamento dos canais iônicos, onde a cinética do canal iônico é considerada um processo que exibe correlação de longo alcance (NOGUEIRA *et al.*, 1995; VARANDA *et al.*, 2000; SIWY *et al.*, 2001; BANDEIRA *et al.*, 2008; FUENTE *et al.*, 2017; WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA *et al.*, 2018).

Essa correlação na cinética dos canais iônicos significa que os estados aberto ou fechado não ocorrem aleatoriamente, indicando uma dependência persistente entre os pontos de dados que compõem a série temporal (GIRAITIS *et al.*, 2003). Em alguns sistemas, a presença de memória longa pode ser analisada como um fator correlacionado com o tempo do processo (NOGUEIRA *et al.*, 1995), ou seja, o sistema tem a propensão de replicar seu comportamento atual (persistente) ou o comportamento oposto (anti-persistente), no futuro. Por exemplo, a presença de memória persistente na cinética do canal iônico significa que um longo tempo gasto em um evento aberto ou fechado, no tempo *t*, tem uma probabilidade maior de ser seguido por outro longo tempo no futuro (o mesmo é verdade para valores de tempos curtos). Correlações de longo alcance foram observadas nas séries temporais de

diferentes tipos de canais formadas tanto pelos tempos de permanência do canal no estado aberto e fechados separadamente, bem como nas séries temporal conjunta, formada pela alternância dos tempos de aberto e fechado (SILVA *et al.*, 2021).

No entanto, Siwy *et al.* (2001), mostraram que as sequências de estado aberto têm um menor expoente de Hurst do que o encontrado para tempos de permanência no estado fechados. Siwy *et al.* (2002) sugeriram que o efeito de memória presente na sequência de tempo de permanência aberto-fechado dos canais BK das fibras extensoras da tíbia de *Schistocerca gregaria* são determinados pelas propriedades da correlação do estado fechado. Resultados semelhantes também foram relatados por Wawrzkiewicz-Jałowiecka *et al.* (2020a) em canais BK de glioblastoma humano células por meio de análise multifractal.

Borys (2020) afirma que se conseguirmos compreender qual a origem da memória longa na cinética dos canais iônicos e qual o seu significado para a fisiologia do organismo vivo, podemos utilizar tal propriedade alvo de pesquisas de novos medicamentos. O estudo dos canais iônicos tem auxiliado na descoberta de drogas para o tratamento de doenças, drogas usadas como anestésicos locais e gerais (SANTOS *et al.*, 2017; HUTCHINGS *et al.*, 2019) como também na elucidação da gênese de inúmeras doenças decorrente de disfunções destes canais (ASHCROFT, 2000).

Analisar a cinética dos canais iônicos sob a ótica desse novo paradigma, assumindo um comportamento determinístico dos canais iônicos deve ser considerado na modelagem e simulações da dinâmica dos canais iônicos para explicar processos macroscópicos, como potencial de ação e liberação de hormônios, intrinsecamente controlada pela abertura e fechamento de canais iônicos. Assim, é importante que todas as propriedades presentes nessa dinâmica desses canais, inclusive a propriedade de memória longa, sejam consideradas nas simulações.

3.4 A propriedade de memória longa é uma propriedade ubíqua

A presença de memória na cinética do canal iônico foi observada pela primeira vez por Nogueira et al. (1995) em registros de canais unitários de potássio ativados por cálcio (canais BK) de células de Leydig de camundongos, através da análise R/S Hurst. Outros estudos da cinética de BK e outros tipos de canais iônicos foram realizados desde então e corroboraram esses resultados (FULIŃSKI *et al.,* 1998;

VARANDA et al., 2000; SIWY et al., 2001; BANDEIRA et al., 2008; WAWRZKIEWICZ et al., 2012; FUENTE et al., 2017; WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA et al., 2018).

A propriedade de memória longa está presente em vários tipos de canais, desde peptídeos antimicrobianos (ASTASHEV *et al.*, 2007) a canais complexos formados por múltiplas subunidades, como potássio, cálcio, cloreto e canal catiônico não seletivo (FULIŃSKI *et al.*, 1998; KOCHETKOV *et al.*, 1999; VARANDA *et al.*, 2000; SIWY *et al.*, 2001; MERCIK *et al.*, 1999; LAN *et al.*, 2003; KAZACHENKO *et al.*, 2004; MANNA *et al.*, 2007; ASTASHEV *et al.*, 2007; BANDEIRA *et al.*, 2008; LAN *et al.*, 2008; PENG *et al.*, 2012; WAWRZKIEWICZ *et al.*, 2012; FUENTE *et al.*, 2017; WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA *et al.*, 2018; MIŚKIEWICZ *et al.*, 2020).

Além disso, correlação de longo alcance também foi encontrada em canais iônicos presentes em membranas de organelas. Wawrzkiewicz-Jałowiecka *et al.* (2020b) observaram correlação de longo prazo em canais BK de membranas mitocondriais de células de glioblastoma humano. Correlações de longo alcance também foram observadas em canais iônicos presentes nas membranas vacuolares de beterraba (*Beta vulgaris* L.) (MIŚKIEWICZ *et al.,* 2020). Portanto, parece que a memória de longo prazo é uma propriedade onipresente dos canais iônicos.

3.4.1 Memória em peptídeos antimicrobianos formadores de canais iônicos

Alguns peptídeos antimicrobianos têm a capacidade de se inserir em bicamada lipídica e, posteriormente, formar poros, como gramicidina e alameticina, entre outros (ANDERSEN; KOEPPE II; ROUX, 2005; HUANG; CHARRON, 2017).

Gramicidina A (gA) é um pentadecapeptídeo linear produzido por *Bacillus brevis* com a capacidade de inserir e formar canais iônicos simples permeáveis a cátions monovalentes em membranas celulares (SARGES e WITCOP, 1965; ANDERSEN; KOEPPE II; ROUX, 2005; BROWND *et al.*,2018). A formação dos canais gA nas membranas ocorre por meio de um processo de dimerização, com associação transmembrana de dois monômeros gA presentes em cada monocamada da bicamada lipídica formando dímeros de gramicidina, estabelecendo a formação dos canais gA. O processo de abertura e fechamento desses canais ocorre através da troca entre as formas dimerizada e monomérica, respectivamente. A estabilidade do canal iônico no estado aberto ocorre por meio de ligações de hidrogênio na região terminal formil-NH de cada monômero (LUM *et al.*, 2017; BROWND, 2018).

Harms *et al.* (2003) analisaram o processo cinético dos canais gA, reconstruídos em bicamada lipídica planar, utilizando o método matemático função de autocorrelação (ACF). Seus resultados mostraram que tanto o tempo de permanência aberto quanto o tempo de permanência fechado possuem memória curta, sendo este efeito de memória um pouco mais persistente para o estado aberto quando comparado à dinâmica do estado fechado, o que pode ser explicado pelo fato que o processo de abertura e fechamento dos canais gA ser governado por diferentes mecanismos. Onde o tempo em que o canal permanece aberto está relacionado à quebra das ligações de hidrogênio entre os monômeros. O tempo que o canal permanece fechado está relacionado ao movimento que tais monômeros fazem junto com o movimento lateral junto com os lipídios e depende do encontro de dois monômeros.

A alameticina é um icosapeptídeo extracelular produzido por *Trichoderma viride* capaz de formar canais iônicos por meio da associação de 4 a 14 monômeros helicoidais organizados circularmente na bicamada lipídica. As trocas entre os diferentes estados condutores nestes canais dependem da adição ou exclusão de monômeros, ou seja, o parâmetro responsável pelas mudanças entre os subestados de condutância observados nos registros de canal unitário são as diferentes formas multiméricas do canal (MEYER; REUSSER, 1967; PAYNE; JAKES; HARTLEY, 1970; LAVER, 1994; LEITGEB *et al.*, 2007).

Astashev *et al.* (2007) investigaram as séries de tempo de permanência de subestados abertos do canal de alameticina usando o método DFA, MF-DFA e o método para avaliação dos parâmetros locais de Holder. Os resultados da análise DFA mostraram que as séries temporais formadas tanto pelos tempos de permanência obtidos em um único estado quanto pelos tempos de permanência em aberto de todos os estados de condutividade mostraram que esse processo é aleatório, expoente de Hurst da série completa próximo de 0,5. Porém, em ambas as situações, as séries temporais apresentaram dois regimes de correlação de longo alcance: com a presença de dois parâmetros de Hurst. Os resultados obtidos através da análise multifractal e Método para avaliação dos parâmetros locais de Holder, apontam que a cinética deste canal é um processo multifractal fracamente correlacionado.

Segundo Astashev et al. (2007), é importante considerar que o processo determinístico encontrado em BK (NOGUEIRA; VARANDA; LIEBOVITCH, 1995; WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA *et al.*, 2018), potássio (LAN *et al.*, 2003; KAZACHENKO *et al.*, 2004), cloreto (MANNA *et al.*, 2007; FUENTE *et al.*,2017) e canal de cálcio (MIŚKIEWICZ *et al.*, 2020) ocorre em canais compostos por macromoléculas formando uma estrutura supercomplexa de pelo menos quatro subunidades  $\alpha$  transmembranares, cada uma composta por cerca de 1200 resíduos de aminoácidos. No entanto, o canal de alameticina possui uma estrutura incomparavelmente mais simples, que é uma sequência linear de 18 aminoácidos. A simplicidade na estrutura do canal de alameticina, quando comparada aos canais nativos de membranas biológicas, pode ser entendida como a causa para suas propriedades fractais serem expressas de forma mais fraca do que para canais iônicos de membranas biológicas.

### 3.4.2 Memória em canais de íons de potássio

O processo cinético dos canais de K<sup>+</sup> ocorre através da transição entre três estados de condutância: repouso, ativado e inativado e o mecanismo de transição entre esses estados é ativado por mudanças no potencial de membrana, ou seja, eles são sensíveis à voltagem, no entanto, alguns deles podem ser bloqueados por ligantes e são estimulados por vários mensageiros. O segmento S4 é carregado positivamente e, portanto, é considerado necessário na ativação dependente de voltagem do canal (HILLE, 2001; LEUCHTAG, 2008; KUANG; PURHONEN; HEBERT, 2015).

Alguns autores investigaram a presença de memória nesses canais em diferentes tipos de células e usando diferentes métodos matemáticos. Lan *et al.* (2003) analisaram o comportamento cinético dos canais de potássio retificadores retardados de neurônios ganglionares da raiz dorsal de ratos, por meio da análise de R/S Hurst. Seus resultados mostraram que, neste tipo de canal, os tempos de permanência nos sucessivos eventos de abertura e fechamento desses canais estão correlacionados ao longo do tempo, apresentando uma longa memória antipersistente.

Kazachenko *et al.* (2004) analisaram as séries de tempo de permanência tanto para série completa (eventos abertos e fechados intercalados) quanto nos estados abertos e fechados separadamente dos canais de potássio dependentes de voltagem de neurônios do molusco *Lymnaea stagnalis*. Esses autores aplicaram a análise de Hurst, o método de transformada rápida de Fourier e transformada Wavelet e observaram um comportamento de memória longa com pelo menos dois expoentes de Hurst (em alguns casos as séries apresentavam dois expoentes de Hurst: H1 e H2) no mesmo processo. Onde o processo apresenta uma memória longa mais fraca em curta escala e uma memória longa mais forte em uma escala maior de tempo. Em alguns casos, um terceiro valor expoente de Hurst pode aparecer. Esses autores afirmam que a cinética dos canais de potássio voltagem-dependentes é um processo que apresenta correlação persistente no tempo e que pode ser descrito como um processo Multifractal.

Lan *et al.* (2008) estudaram as flutuações no sinal da corrente do canal iônico do canal de potássio dependente de voltagem de neurônios ganglionares da raiz dorsal de ratos. Esses autores mostraram, por meio do DFA, que esse tipo de canal apresenta uma memória longa persistente na corrente de canais unitários. Esses autores mostraram que mesmo em diferentes potenciais de ponta de pipeta a memória longa está presente no sistema.

Peng *et al.* (2012) investigaram a flutuação da corrente iônica do canal de potássio dependente da voltagem em LbT2 através dos métodos de função de autocorrelação e DFA, e demonstraram que a memória longa persistente está presente na cinética desses canais iônicos e que a correlação ao longo do tempo decai em três regimes de correlação diferentes.

Em uma abordagem diferente, Shrivastava, Malik e Ghosh *et al.* (2016) analisaram o ruído da corrente do canal sintético formados pelo segmento S6 do canal KvAP derivado de *Aeropyrum pernix* em bicamadas lipídicas planas. Eles investigaram o comportamento cinético do canal iônico e observaram a presença de dois regimes nas flutuações de corrente. A densidade espectral de potência da corrente do canal no estado aberto mostrou a presença de ruído 1/f, bem como ruído 1/f<sup>(2-3)</sup>. Segundo esses autores, a presença de ruído 1/f significa uma autocorrelação em todas as escalas de tempo, ou seja, a flutuação em qualquer momento é histórico-dependente.

### 3.4.3 Memória em canais de íons BK

O mecanismo de *gating* do canal BK é acionado de forma sinérgicas através de voltagem e concentração de Ca<sup>2+</sup>, sendo também modulado pela concentração de
Mg<sup>2+</sup> (MAGLEBY, 2001). Esses canais possuem quatro segmentos transmembrana que atuam como sensores de voltagem e oito domínios citosólicos que respondem a variações nas concentrações de cátions divalentes, quatro domínios sensíveis a variações em Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> e quatro domínios sensíveis a variações de cálcio intracelular (ZANG *et al.*, 2018)

A investigação de um comportamento de memória em canais iônicos ocorreu originalmente em 1995 em canais BK (NOGUEIRA; VARANDA; LIEBOVITCH, 1995). Esses autores analisaram o comportamento cinético do canal BK de célula de Leydig por meio de análise não-linear do tempo de permanência do canal nos diferentes estados de condutância. Os resultados da análise de Hurst, demostrou que o processo cinético do canal BK possui memória longa, com um valor expoente de Hurst médio igual a 0,75, o que significa que o tempo de permanência do canal no estado aberto e fechado estão correlacionados no tempo.

Kochetkov *et al.* (1999) investigaram a presença de memória longa no comportamento cinético dos canais BK em células Vero de rim cultivadas. Eles aplicaram o método de Hurst para analisar o comportamento cinético desses canais. Esses autores observaram que para cada série analisada o processo era caracterizado por dois comportamentos distintos, a análise de Hurst apresentou dois coeficientes (H1 e H2), ambos apresentando valores indicativos de presença de memória neste processo cinético, H1 apresentando uma memória longa mais fraca e H2 apresentando uma memória longa mais forte.

Esses resultados são semelhantes aos resultados de Kazachenko *et al.* (2004) quando estudaram o canal de potássio em neurônios do molusco *Lymnaea stagnalis* e observaram que o comportamento cinético apresenta dois regimes de memória longa. Segundo Kochetkov *et al.* (1999), a presença de dois expoentes de Hurst é indicativo de que tal processo tem dois comportamentos: um comportamento com leve dependência em curto espaço de tempo e uma correlação mais fortemente correlacionada em um intervalo de longo prazo. No entanto, para Barabási e Vicsek (1991) e Millán e Lefranc (2013), a presença de diferentes coeficientes de Hurst é uma característica de processos multifractais.

Mercik e Weron (2001) investigaram a cinética dos canais de potássio do tipo BK em células de fibras musculares de gafanhotos (*Schistocerca gregaria*) por índice de autossimilaridade H, análise de Hurst e DFA e demostraram a presença de correlação de longo alcance no processo. Esses autores assumem que a memória longa no sinal da corrente iônica emerge como consequência das propriedades de distribuição de cauda longa dos tempos de permanência no estado fechado. Resultados semelhantes foram obtidos por este mesmo grupo de pesquisa (SIWY *et al.,* 2001) usando diferentes métodos matemáticos (função de autocorrelação, análise de H/S Hurst, DFA e análise de dispersão local na análise da cinética do canal tipo BK. Eles observaram um comportamento determinístico no tempo de permanência do estado fechado e aberto.

## 3.4.4 Memória em canais iônicos seletivos a ânion

Existe uma classe de canais iônicos seletivos para ânions. Dentre esses canais seletivos para ânions, a família do canal de Cloreto (CLC) é muito importante, devido ao fato desse íon ser é o ânion fisiológico mais abundante. Mutações nos canais de cloreto levam a um aumento da excitabilidade, sugerindo que os CLCs controlam o potencial de membrana em repouso nas células excitáveis. Eles também participam da regulação do volume celular. Os canais seletivos de ânions têm anéis de resíduos carregados positivamente em seus poros, o que ajuda a excluir todos os cátions. Mutações em alguns desses canais podem levar à fibrose cística, por exemplo (PETKOV, 2009).

Fuente e co-autores (2017) analisaram os canais de cloreto ativados por cálcio (CaCCs) de oócitos de *Xenopus laevis*. Suas análises mostraram que a cinética desses canais apresenta memória de longo prazo, porém, há uma transição de comportamentos persistentes para anti-persistentes. O comportamento do efeito memória na cinética do canal CaCCs apresenta o anti-persistente em dados mais longos e o persistente em dados mais curtos para todos os conjuntos de dados experimentais. Eles analisaram a presença de memória na cinética do canal CaCCs em diferentes ambientes de pH externo (ácido, neutro e básico) usando diferentes métodos matemáticos. Eles também observaram que os expoentes de Hurst eram significativamente diferentes para valores de pH distintos.

Manna, Banerjee e Ghosh (2007) analisaram o canal de ânion dependente de voltagem (VDAC) reconstituído em membrana plana de Difitanoilfosfatidilcolina e colesterol em diferentes potenciais transmembrana. Eles aplicaram análise de

dimensão fractal e métodos DFA para investigar os registros do canal VDAC. Esses autores observaram a presença de memória de longo alcance em ambos os potenciais transmembrana aplicados. O coeficiente α-DFA foi de 0,78 e 0,74 a +25 e + 15mV, respectivamente. Além disso, os resultados da análise da dimensão fractal mostraram que a cinética dos canais VDAC possui um comportamento fractal.

Fuente *et al.* (2017) atribuem esse comportamento auto-similar na cinética desses canais de cloreto ativados por cálcio à memória metabólica dinâmica. Eles entendem os canais iônicos, assim como as enzimas, como um sistema aberto composto de subsistemas e esse comportamento correlacionado é resultado de um efeito de autocorrelação interno do sistema, onde este sistema tem a capacidade de armazenar padrões catalíticos funcionais. Enquanto Manna, Banerjee e Ghosh (2007) sugeriram que o efeito de memória presente na cinética do VDAC poderia ser gerado por um mecanismo de gating funcionando como um oscilador acoplado.

# 3.5 Origem da memória longa

De acordo com Silva *et al.* (2021), atualmente ainda não é compreendido a origem dessa correlação de longo alcance presente na cinética dos canais iônicos. De acordo com Wawrzkiewicz *et al.* (2012) e Borys (2020), essa memória seria inserida no comportamento cinético desses canais através de forças originadas nas flutuações na espessura da membrana celular. No entanto, Manna *et al.* (2007) atribui a origem da memória ao fenômeno gerado pelo movimento de diferentes regiões da proteína formadora de canal durante as alterações conformacionais necessárias para a abertura e fechamento desses canais. Além disso, outros autores possuem ideias diferentes sobre essa origem (MERCIK *et al.*, 1999; BRAZHE; MAKSIMOV 2006; SHRIVASTAVA; CHETAN MALIK; GHOSH, 2016; FUENTE *et al.*, 2017).

Dependendo da perspectivada utilizada, alguns autores atribuem a presença de memória a fatores intrínseco ao canal, outros afirmam que a memória está relacionada a fatores presentes no ambiente que circunda o canal, já para outros autores essa memória seria inserida no comportamento cinético desses canais através uma combinação de fatores intrínseco e extrínsecos. Dentre as hipóteses formuladas pelos diferentes pesquisadores da área, existem seis hipóteses sobre as prováveis origens para a propriedade de memória longa na cinética dos canais iônicos:

- i. Origem a partir dos estímulos de gating;
- ii. Origem a partir da dinâmica do estado fechado
- iii. Origem a partir do mecanismo de ação do gating
- iv. Origem a partir das flutuações da espessura da membrana
- v. Origem a partir de uma memória metabólica
- vi. Origem a partir da criticalidade auto-organizada

# 3.5.1 Origem a partir dos estímulos de gating

Kochetkov *et al.* (1999) analisaram a cinética dos canais BK em células Vero de rim através da análise R/S de Hurst. Esses autores demostraram a presença de memória longa no comportamento cinético desses canais. Eles observaram pelo menos dois expoentes de Hurst nas séries temporais, demostrando a existência de uma memória longa mais fraca em uma escala de tempo curta, onde o expoente de Hurst é menor, e uma memória longa mais forte numa escala temporal longa, apresentando um expoente de Hurst maior.

Eles mostraram que há uma relação entre a probabilidade de abertura e a presença de mais de um expoente de Hurst para uma mesma série temporal. Seus resultados mostraram a existência de uma correlação entre a variação do valor do expoente de Hurst para uma mesma série temporal com a probabilidade de abertura. Quanto maior a probabilidade de abertura ( $p_0$ ) mais cedo ocorre a mudança no valor do expoente de Hurst. Esses autores observaram também que a variação do  $p_0$  ocorre em decorrência de variações em dois estímulos de *gating*: tanto quando ocorre um aumento na voltagem, quanto quando ocorre um aumento na concentração de Ca<sup>2+</sup>. De acordo com esses autores, mudanças no ambiente ao redor do canal têm alguma influência na propriedade de memória longa e podem participar como um modulador dessa propriedade.

Varanda *et al.* (2000), Barbosa *et al.* (2007), e Wawrzkiewicz-Jałowiecka *et al.* (2018) investigaram, em diferentes canais BK, se a propriedade de memória longa é dependente da condição ambiental. Eles mostraram que os diferentes valores de voltagem, a variação da concentração de cálcio, tensão mecânica e temperatura não removem o efeito de memória do processo, ou seja, a longa memória observada na cinética BK não é dependente de estímulos de *gating*.

Wawrzkiewicz-Jałowiecka, Dworakowska e Grzywna (2017) também analisaram a influência de fatores ambientais em torno do canal BK. Esses autores avaliaram como a temperatura afeta a função do canal BK da célula de glioblastoma humano. Seus resultados mostraram que a variação da temperatura pode influenciar o comportamento do canal, modificando as probabilidades de abertura, o tempo de vida médio e a condutância, mostrando que o canal BK possui alta sensibilidade às mudanças de temperatura.

Os resultados desses autores mostram que apesar de as condições em torno do canal afetar o comportamento cinético, a memória longa é mantida no processo de abertura e fechamento do canal BK, onde para algumas condições experimentais é possível observar um aumento do valor do expoente de Hurst com o aumento da temperatura. Dessa forma podemos inferir que as condições do entorno do canal não retiram a memória longa do processo, mas pode gerar variações nos valores dessa memória, sendo um fator que pode estar relacionado de alguma com a origem dessa propriedade.

## 3.5.2 Origem a partir da dinâmica presente no estado fechado

Para Mercik e Weron (2001) a memória presente cinética dos canais iônicos resulta da natureza dicotômica do sinal e pode se originar na propriedade de cauda longa da distribuição dos tempos de permanência dos tempos fechados, ou seja, o comportamento de estado fechado do canal BK pode ser o responsável pela memória de longo alcance encontrada no processo cinético desses canais.

Os resultados de Siwy *et al.* (2001) mostraram que a distribuição do tempo de permanência para o estado fechado segue uma lei de potência, enquanto o comportamento do tempo de permanência no estado aberto segue um decaimento exponencial. Esses autores também observaram que o coeficiente de Hurst no estado fechado é significativamente maior do que o valor encontrado no estado aberto. Esses resultados podem ser evidências de que o processo de abertura e fechamento consiste em dois sistemas interligados, ao invés de um único processo, onde a propriedade de memória longa presente na cinética dos canais iônicos pode ser atribuída a dinâmica do estado fechado. Investigar esses processos separadamente pode ser o caminho para uma melhor compreensão dos mecanismos que governam o processo cinético do canal iônico.

Siwy e colaboradores (2001) também observaram, através das análises de DFA, que o comportamento dos tempos de permanência fechados é mais complexo do que o estado aberto. Dois coeficientes de Hurst foram observados para o estado fechado, um menor para menores escalas de tempos e um maior para maiores escalas de tempo, enquanto o estado aberto apresentou apenas um expoente de escala. Os resultados da análise de predição não linear e do método de dispersão local também mostraram a presença de um comportamento determinístico nas séries dos tempos de permanências fechados; no entanto, não foi conclusivo para o comportamento do estado aberto.

Esses autores concluíram que os valores dos parâmetros indicadores de memória longa e a localização *crossing over (*local onde ocorre a mudança do valor do coeficiente de Hurst dentro de uma mesma série temporal), para a série completa são semelhantes ao crossing over encontrados para dados de estado fechado e assumiram que essa semelhança demonstra que a dinâmica do estado fechado prevalece sobre a dinâmica presente na cinética de abertura e fechamento desses canais, atribuindo assim, a origem da presença do comportamento determinístico presente na cinética dos canais iônicos a dinâmica do estado fechado.

3.5.3 Origem a partir do mecanismo de ação do mecanismo de gating

De acordo com Manna *et al.* (2007), regiões específicas dos canais iônicos são responsáveis por detectar estímulos de *gating* e são distribuídos ao longo da proteína. Eles são capazes de detectar variações nos potenciais transmembrana que servem de estímulo para a troca entre os diferentes estados conformacionais dos canais. Este mecanismo de bloqueio ou abertura do canal iônico requer o movimento de uma grande fração da massa da proteína através da bicamada lipídica, o que ocorre em resposta a uma voltagem específica. Se a energia desse processo supera a barreira de energia, o canal iônico alterna entre dois estados conformacionais.

Diversas forças influenciam o movimento de apenas um sensor de voltagem: uma força de restauração, devido à propriedade elástica da molécula de proteína; uma força de amortecimento, resultante da viscosidade do ambiente no qual o sensor está localizado; e uma força motriz eletrostática, devido às interações entre os aminoácidos do domínio sensor e o ambiente. Quando as regiões dos sensores de voltagem começam a se mover a partir de suas posições iniciais, eles experimentam um desequilíbrio na força eletrostática devido às suas interações mútuas. Assim, dependendo das condições iniciais de conformação do sensor de voltagem, flutuações de diferentes amplitudes ocorrem nas regiões desses sensores. Este processo pode ser entendido como um oscilador forçado e o movimento de um conjunto de sensores pode ser entendido como osciladores acoplados. Esses osciladores são gerados energeticamente por duas ou mais forças motrizes presentes no sistema, no ambiente, ou em ambos. De acordo com Manna e colaboradores, esses osciladores acoplados podem ser responsáveis pelo comportamento determinístico presente nos canais.

É importante enfatizar que as interações entre os sensores de voltagem são independentes da presença ou ausência de um campo elétrico externo. Desta forma, mesmo com potencial constante (ou zero) aplicado à membrana, os sensores de voltagem interagem entre si e com o entorno, permitindo o acoplamento. Assim, a correlação de longo prazo é esperada mesmo em tensões constantes ou nulas.

De acordo com Borys (2020), a origem biológica da propriedade de memória longa consistente, numa perspectiva baseada do caos, está relacionada com o *gate* dos canais iônicos. Ele teoriza que o *gate* sofre interações de Van Der Waals com o ambiente cada vez mais fortes ao longo do tempo. Para passar de um estado para outro, ele precisa de uma grande flutuação, que pode levá-lo do estado inicial para o estado final de maior energia, garantindo uma forte ligação nesse estado. Assim, um longo tempo de permanência é esperado novamente no futuro. Alternativamente, o *gate* pode sofrer alterações através de um longo processo passo a passo. Este processo envolveria a transição parcial do *gate* e o aumento lento da força de ligação no estado oposto. Dessa forma, essa estaria relacionado com a repetições de padrões ao longo do tempo.

## 3.5.4 Origem a partir das flutuações da espessura da membrana

Wawrzkiewicz *et al.* (2012) atribuem a origem da memória a forças geradas por flutuações na espessura da membrana lipídica, que atuam sobre a proteína formadora de canais. Eles atribuem a presença de memória de longo alcance na cinética dos canais iônicos à ação combinada da bicamada lipídica e da proteína formadora de canais. A ação da bicamada lipídica sobre a proteína formadora do canal poderia introduzir a propriedade de memória por meio de flutuações locais na espessura da membrana que envolve o canal.

Essas flutuações podem modificar a densidade dos átomos no domínio do *gate* do canal iônico de duas maneiras: por meio de flutuações síncronas nos limites do espaço conformacional de uma região que pode estar relacionada ao ângulo de abertura do anel de glicina presente no *gate* do canal; ou por meio de mudanças sincronizadas nos valores de energia potencial relacionados a cada substados dos estados aberto e fechado (WAWRZKIEWICZ *et al.*, 2012).

## 3.5.5 Origem é a partir de uma memória metabólica

Fuente *et al.* (2017) relacionaram a memória de longo alcance encontrada no comportamento cinético dos canais de cloreto ativados por cálcio à dinâmica da memória metabólica descrita na Teoria da Estrutura Metabólica Celular (CMS) proposta por Fuente (2015). De acordo com essa teoria, as células podem processar informações e armazenar memória metabólica. O CMS propõe dois mecanismos para armazenar padrões catalíticos: o primeiro ocorre regulando as atividades enzimáticas pela dinâmica de atratores do tipo Hopfield.

Esses atratores armazenam padrões que podem ser recuperados por um estímulo específico; o segundo mecanismo ocorreria por meio de modificações póstraducionais covalentes das enzimas e, assim, a memória funcional pode ser adicionada reversivelmente por meio de marcas moleculares estáveis (FUENTE 2015). De acordo com Fuente *et al.* (2013), a propriedade da memória é um requisito fundamental para o processamento eficiente da informação. Eles acreditam que a informação molecular pode ser armazenada e recuperada corretamente por estímulos específicos.

#### 3.5.6 Origem a partir da criticalidade auto-organizada

Para Shrivastava, Chetan Malik e Ghosh (2016) a autocorrelação observada em todas as escalas de tempo na corrente iônica do canal formado pelo peptídeo sintético S6 do canal KvAP está associada à interação entre os íons e a parede do canal e funciona como um fenômeno de criticidade auto-organizada.

O fenômeno de criticidade auto-organizada aparece em sistemas sujeitos a uma perturbação permanente, que evolui naturalmente ao longo do tempo para um estado crítico, sem ajustes nos parâmetros externos e sem sensibilidade às condições iniciais. No entanto, neste estado crítico, o sistema é altamente suscetível a pequenas alterações, que podem causar reações imprevisíveis. O ponto crítico em sistemas dinâmicos é um atrator alcançado partindo-se do equilíbrio. Quando o estado crítico é atingido, o comportamento do sistema segue uma lei de potência (BAK *et al.* 1988).

De acordo com Brazhe e Maksimov (2006), entender que a dinâmica dos canais iônicos funciona de modo semelhante a um sistema baseado na criticidade autoorganizada é assumir que o canal iônico é um sistema dissipativo complexo que pode atingir um estado crítico auto-organizado. Nesse ponto, um distúrbio conformacional local pode se espalhar por todo o sistema, resultando em uma grande mudança conformacional.

## 3.6 Métodos matemáticos de análise de memória longa

Muitas das informações que descrevem o comportamento do canal iônico, em muitos processos fisiológicos, foram gerados através de modelagem computacional e simulações baseadas no processo de Markov (GRANDI *et al.*, 2007; SAMPSON *et al.*,2010; SCHMANDT; GALÁN 2012; FURUTANI *et al.*,2019), e isso implica considerar a cinética de abertura/fechamento de canais iônicos como um processo puramente aleatório. No entanto, a propriedade de memória já foi demostrada ser uma propriedade ubíqua na cinética dos diferentes tipos de canais iônicos. Sendo assim, é necessário modelar tal processo através de modelos que incorporem essa propriedade nas suas simulações.

Dessa forma, a aplicação de métodos matemáticos nas análises das propriedades biofísicas dos canais iônicos, tal como na análise da cinética dos canais iônicos, possibilita alcançar resultados não alcançados através de metodologias tradicionais. Tais métodos matemáticos, como Análise de Hurst, Função de autocorrelação, DFA e Entropia Aproximada, têm sido não só para análise de canais iônicos, mas também na análise de diferentes sistemas biológicos (NOGUEIRA *et al.*, 1995; SIWY *et al.* 2001; HOLZINGER, 2012, SILVA *et al.*, 2021).

O DFA é um método seguro para quantificação das correlações de longo alcance em séries temporais não-estacionárias. Esse método foi proposto por Peng e*t al.* (1994) para análises de sequências gênicas de DNA, e tem sido utilizado para análise em diversos campos de pesquisas (NASCIMENTO *et al.*, 2010; PENG *et al.*,

2012; CASTRO et al., 2014; AGUIAR et al., 2015; BUSHA; BANIS, 2017; ARIAS-CALLUARI et al., 2019; DJAWAD et al., 2019; KIM et al., 2019).

Por outro lado, a análise da Entropia aproximada não quantifica a presença de memória longa, mas pode ser utilizada para quantificar a previsibilidade das flutuações de uma série temporal, analisando se 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). Dessa forma, é possível observar se o processo é aleatório ou se existe indicativos de determinismo dentro do processo.

3.7 Aplicação: Investigação da presença de memória na cinética de canais formados pela α-Hemolisina de Staphylococcus aureus em bicamadas lipídicas planas.

A escolha do canal formado por α-HL como um modelo experimental para investigar o comportamento da memória em canais iônicos se deu pelo fato deste canal poder apresentar um mecanismo de *gating* bastante simples em relação a outros canais mais complexos, tais como os canais de sódio e potássio de tecidos excitáveis e outros. Este canal, dependendo da voltagem de *clamp*, do pH e concentração da solução que banha o canal, pode se apresentar como um nanoporo de diâmetro fixo, sem nenhum sistema de *gating* ou apresentar um sistema *gating*, mesmo que bastante simples em relação a outros canais.

Dessa forma é possível modular o comportamento desse canal em bicamada lipídica artificial através de variações das condições experimentais com o objetivo de obter registros das transições entre os estados abertos e fechados através da variação do pH da solução e, por exemplo, e assim analisar a dinâmica presente no processo cinético desses canais. Além disso, nossos resultados podem mostrar ser os canais formado por α-HL excelentes modelos de estudo da propriedade de memória longa.

## 3.7.1 A $\alpha$ -hemolisina ( $\alpha$ -HL) de Staphylococcus aureus

A α-HL é um dos fatores de virulência do *Staphylococcus aureus*. Essa toxina se insere na bicamada lipídica da membrana plasmática e forma poros líticos (FUSSLE *et al.*, 1981; KRASILNIKOV *et al.*, 1988; THOMER *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2020) que permanecem abertos e modificam a homeostase celular (GOUAUX *et al.*, 1994; BERUBE; WARDENBURG, 2013).

A  $\alpha$ -HL é uma proteína de 33 kDa produzida pelo *Staphylococcus aureus* e é liberada na forma de monômeros de polipeptídeos de 293 aminoácidos (GRAY; KEHOE, 1984.; WILSON *et al.*, 2019), composta quase que inteiramente por  $\beta$ -folhas com pouca estrutura em  $\alpha$ -hélice (BERUBE; WARDENBURG, 2013). Essa proteína quando inseridas em membranas biológicas e em bicamadas lipídicas artificiais são capazes de formar canais iônicos (MENESTRINA, 1986).

# 3.7.2 Canais formados pela α-hemolisina produzida pelo Staphylococcus aureus

Os canais iônicos formados pela α-hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus têm sido* utilizado como ferramenta biotecnológica para detecção de moléculas, como DNA, bem como pequenas moléculas orgânicas. O uso desses nanoporos como ferramenta biotecnológica é possível por que em determinados valores de pH, concentração da solução eletrolítica e voltagem aplicada ao sistema, eles se comportam como poros que permanecem abertos ao longo do experimento. Dessa forma, interações entre uma dada substância e o nanoporo causam uma assinatura característica no valor da corrente iônica desses canais, podendo ser utilizado como ferramenta de análise de várias moléculas (ROBERTSON *et al.*, 2007; KAWANO *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2011; AGUIAR *et al.*, 2015a; MACHADO *et al.*, 2016; JUNIOR *et al.*, 2019).

No entanto, sob condições experimentais específicas, tais canais passam a ter um mecanismo de gating, que pode ser considerado simples, quando comparados ao processo encontrados em canais iônicos mais complexos como os canais do tipo BK, outros canais de potássio e canais de cloreto, os quais foram utilizados em análises da presença de memória longa em seu processo cinético (NOGUEIRA et al., 1995; FULIŃSKI et al., 1998; KOCHETKOV et al., 1999; VARANDA et al., 2000; SIWY et al., 2001; MERCIK et al., 1999; LAN et al., 2003; KAZACHENKO et al., 2004; MANNA et al., 2007; ASTASHEV et al., 2007; BANDEIRA et al., 2008; LAN et al., 2008; PENG et al., 2012; WAWRZKIEWICZ et al., 2012; FUENTE al., 2017; et WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA et al., 2018; MIŚKIEWICZ et al., 2020).

Segundo Kasianowicz e Bezrukov (1995), o processo cinético dos canais de α-HL são sensíveis a alteração nos valores de pH, onde tal variação gera uma dinâmica de *gating*, e os canais α-HL apresentam transições entre os estados aberto e estado fechado, com os eventos do estado fechado ocorrem em uma escala de tempo menor. O pH altera também as flutuações iônicas e essas alterações podem ser geradas pelas reações de protonação, onde a flutuação é causada pela modulação da condutância pela ionização reversível de N resíduos idênticos dentro do canal.

A α-HL é um peptídeo hidrofílico capaz de oligomerizar e formar nanoporos heptaméricos (GOUAUX *et al.,* 1994; SONG *et al.,* 1996; BERUBE; WARDENBURG, 2013; WILSON *et al.* 2019; DIVYAKOLU *et al.,* 2019) nas membranas lipídicas de uma célula suscetível, onde oligomeriza-se para formar um canal transmembrana hidrofílico (BHAKDI; TRANUN-JENSEN, 1991; SEILIE; WARDENBURG, 2017).

Os canais iônicos formados pela α-HL são compostos por três regiões, uma no lado extracelular, o domínio extramemebranar ou copal, outra situada logo abaixo do domínio copal, o domínio de borda, ou região anelar, e o terceiro domínio forma o poro cilíndrico transmembrana, o domínio da haste, ou troncular (FIGURA 05) (SONG *et al.*, 1996; AGUIAR *et al.*, 2015; DIVYAKOLU *et al.*, 2019).

Estes canais são voltagem-dependentes seletivos a diferentes cátions, ânions (MENESTRINA, 1986; BHAKDI; TRANUN-JENSEN, 1991; WALEV *et al.*, 1993; EIFFLER *et al.*, 2016) bem como pequenas moléculas orgânicas (BHAKDI; TRANUN-JENSEN, 1991), podendo também permitirem o fluxo de ânions dependendo da composição da bicamada lipídica na qual ele estiver inserido e da solução eletrolítica (MENESTRINA, 1986; KRASILNIKOV; SABIROV, 1989; GUROS; BALIJEPALLI; KLAUDA, 2018).

FIGURA 05: Canal iônico formado pela α-hemolisina. A. Visão lateral do canal iônico, onde pode ser observado que a região troncular se insere completamente na membrana lipídica, a região copal, que não se insere na membrana lipídica e a região anelar (parte inferior da copa) fica ancorada na membrana; B. Visão superior com cada subunidade representada em diferentes cores.



Fonte: Adaptado do Protein Data Bank (PDB), código 7AHL.

Os canais iônicos formados pela  $\alpha$ -hemolisina apresentam permeabilidade a diferentes íons monovalentes, como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, bem como Ca<sup>2+</sup> (BHAKDI; TRANUN-JENSEN, 1991; WALEV *et al.*, 1993; EIFFLER *et al.*, 2016). Segundo Guros, Balijepalli e Klauda (2018), o  $\alpha$ -HL pode ser seletivo a cátions ou ânions dependendo da composição da membrana lipídica em que o canal está inserido. Krasilnikov e Sabirov (1989) mostraram que variações de pH altera tanto a condutância quanto a seletividade iônica. Essa seletividade iônica pode ser atribuída à presença de grupos carregados positivamente dentro do poro do canal (MENESTRINA, 1986).

Metodologia

# 4. Materiais e Métodos

# 4.1 Formação da bicamada lipídica

As bicamadas lipídicas planas (BLP's) utilizadas nos experimentos foram formadas pela técnica de Montal e Mueller (1972) em um orifício de 60 µm de diâmetro presente em uma partição de Politetrafluoroetileno (Teflon®) que separava a câmara de Teflon em dois compartimentos (*cis/trans*). As BLP's foram construídas com difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC). Em cada hemicâmaras foi adicionado um volume inicial inferior a 1,2 ml de solução eletrolítica, deixando assim os níveis da solução abaixo do orifício. Em seguida foi adicionado em ambos os compartimentos da câmara, 15µl da solução de lipídeo (10 mg/ml em hexano).

Em seguida à adição do lipídio o orifício é banhado por uma solução de 1% de solução de hexadecano em hexano. Após um tempo médio de 15 minutos, quando teoricamente todo solvente contido na solução lipídica já está evaporado, o nível da solução eletrolítica é elevado a um volume superior a 1,2 mL em cada hemicâmaras, deixando, assim, o nível da solução eletrolítica acima da posição do orifício. Dessa forma a bicamada lipídica é formada. A formação da membrana é monitorada através de uma lupa e pela resposta capacitiva da membrana observada no sistema de aquisição e monitoramento dos registros de correntes iônicas através do canal iônico. O esquema da formação das bicamadas lipídicas planas pode ser observado na figura 06.

FIGURA 06: Processo de formação da bicamada lipídica plana através da aposição de duas monocamadas lipídicas.



Fonte: Adaptado de GUTSMANN et al., 2015.

Após a observada a estabilidade da bicamada lipídica, os canais unitários foram formados pela adição de 0,1-0,8 µl da solução contendo  $\alpha$ -HL à solução padrão (NaCl 1 M, Hepes 2,5 mM, pH 4,5 no compartimento *cis* da câmara experimental, para fornecer concentrações finais que formam apenas canal unitário na BLP (FIGURA 07). Todos os experimentos foram realizados a 24 (± 1°C). As correntes iônicas dos canais  $\alpha$ -HL foram obtidas aplicando um potencial transmembrana de 40 mV.

FIGURA 07: Esquema do canal unitário formado pela α-hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus* incorporado em bicamada lipídica plana formada no orifício da partição de Teflon<sup>®</sup>.



Fonte: Adaptado de CARNEY et al., 2013 e LUNDBÆK et al., 2010

# 4.2 Sistema de aquisição dos registros de canal unitário

O sistema de aquisição dos registros de correntes iônicas é constituído por um amplificador patch clamp (Axon Instruments, Foster City, CA), sendo utilizado durante os experimentos no modo Voltagem Clamp conectado. O amplificado conecta a câmara de Teflon<sup>®</sup>, através de eletrodos Ag/AgCI em pontes de sal Agar-KCI 3M (3% p/v), a uma placa conversora analógico-digital (PCI 6024E da National Instruments Corporation ou DIGIDATA 1440 da Molecular Devices). A saída do amplificador é conectada a um microcomputador onde foram executados programas computacionais que permitiram a aquisição e monitoramento dos registros de corrente. As correntes foram filtradas a 0-2 kHz por um filtro passa-baixa Bessel (Model 902, Frequency Devices, Haverhill, MA) e gravados em uma amostragem de 100 kHz. O sistema de aquisição e monitoramento dos correntes iônicas pode ser observado na figura 08.

Figura 08: Sistema de aquisição e monitoramento dos registros das correntes iônicas.



Fonte: Imagem do autor.

# 4.3 Processamento e análise de dados

Após a obtenção dos registros das correntes iônicas, esses dados foram processados e analisados no Clampfit (versão 10.5) e no Sview (v. 4.09, USA) e idealizados no QuB (versão 2.0.0.34) para obtenção das séries temporais com os tempos de residência do canal  $\alpha$ -HL nos tempos aberto e fechado (FIGURA 9).

FIGURA 09: Processo de idealização dos registros de canais unitários. O software QuB (versão 2.0.0.34) analise todos os valores de correntes do registro e com base no valor médio é identificado os tempos em que o canal permaneceu em cada um dos estados. Através do método de *Half-Amplitude*, o QuB considera que abaixo de 50% do valor da corrente do registro o canal está no estado fechado e acima de 50% o canal está no estado aberto (isso para canais registradas em correntes positivas. Para registros obtidos em voltagens negativas o contrário é verdadeiro).



Fonte: Imagem do autor.

# 4.4 Análise de dados: Análise de flutuação destendenciada (DFA)

Nas análises através do DFA, o algoritmo utilizado foi obtido no website Physionet (GOLDBERGER *et al.*, 2000) O método do DFA é um método matemático não linear para divulgar correlações de longo prazo em séries temporais não estacionárias. É capaz de identificar a memória longa nessas séries evitando a detecção de memória de longo prazo espúria aos dados quando é devida a artefatos de não estacionariedade (PENG *at al.*, 1994).

O método DFA tem sido usado em muitas áreas de pesquisa para analisar diferentes fenômenos, como respiração humana, cinética do canal iônico, dados do mercado de ações, eletrocardiograma e eletrocorticograma, a resposta das células a diferentes toxinas (NASCIMENTO *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2012; CASTRO *et al.*, 2014; AGUIAR *et al.*, 2015; BUSHA; BANIS 2017; ARIAS-CALLUARI *et al.*, 2019; DJAWAD *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2019).

Este método não linear consiste basicamente em analisar as flutuações de uma série integrada de dados após a remoção de tendências, analisando assim a presença ou ausência de um processo de autossimilaridade dentro da série temporal (STANLEY *et al.*, 1999; HU *et al.*, 2001). Segundo Hu (2001), é comum a presença de tendências nas séries temporais geradas por sistemas biológicos ou físicos. Dessa forma o destendenciamento dos dados é uma etapa importante que permite evitar que qualquer ruído, vindo de fora do sistema, seja a*nalisado em conjunto com os dados.* 

A análise de flutuação destendenciada através do algoritmo do DFA consiste em inicialmente obter séries integradas, y(k), a partir da série temporal original de acordo com a equação

$$y(k) = \sum_{i}^{k} [y(i) - \bar{y}]$$
<sup>(1)</sup>

onde y(i) são os elementos da série original e  $\overline{y}$  é sua média. Em seguida, divida a série de tempo integrada de comprimento N em N / n caixas não sobrepostas. A tendência local  $y_n(k)$  em cada caixa é obtida por meio de um ajuste de mínimos quadrados linear. Em seguida, a retração dos dados é feita calculando a diferença entre a série integrada y (k) e a tendência local y(k) em cada caixa e calculando F(n), a flutuação da raiz quadrada média, da seguinte forma:

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

Os procedimentos acima são repetidos para diferentes escalas, ou seja, diferentes valores de n, para fornecer uma relação entre F(n) e os diferentes tamanhos de caixa n. Finalmente, é feito um gráfico duplo log de F(n) versus n. O coeficiente de regressão linear do gráfico duplo-log da função F(n)~n<sup> $\alpha$ </sup> é o parâmetro  $\alpha$  do DFA, que indica a presença ou ausência de correlação de longo prazo (memória) na série original.

## 4.5 Entropia Aproximada

O método de entropia aproximada (ApEn) é tipicamente utilizado em séries com N entre 75 e 5000 pontos. Os parâmetros de entrada o algoritmo compara a distância entre subgrupos de dados analisando a semelhança entre eles, dessa forma é possível analisar se um processo possui uma dinâmica aleatória ou se possui um comportamento determinístico (PINCUS, 1994).

Para a análise da entropia aproximada ApEn (*i*, *t*, *N*) de uma determinada série temporal de tamanho N é necessário definir inicialmente dois parâmetros de entrada: o valor de *i* e *t* (PINCUS, 1994). O parâmetro *i* é um valor inteiro positivo que estipula

o tamanho da janela para comparação de similaridade e o *t* é o limiar de tolerância para aceitação dessa similaridade (PINCUS; GOLDBERGER, 1994; WU *et al.*, 2016).

A análise dos dados através do método ApEn (i, t, N) de uma dada a série temporal  $\{x(n)\}$  de tamanho N consiste em inicialmente definir uma sequência de vetores  $u^1(n), u^2(n), ..., u^{(N-i+1)}(n)$ , onde cada vetor  $u^i(n)=[x(n), x(n+1), ..., x(n+i-1)]$  onde cada vetor consiste de *i* valores consecutivos *x* pertencentes ao sinal e serve com um padrão para comparação com os outros vetores da série temporal analisada. Em seguida calcula-se a distância máxima,  $d[u^i(j), u^i(k)], 1 \le j, k \le N - i + 1$ , entre os componentes escalares que formam os vetores  $u^i(j) e u^i(k)$  através da equação:

$$d[u^{i}(j), u^{i}(k)] = \max_{l=1,2,\dots,i} |x(j+l-1) - x(k+l-1)|$$
 04

A sequência de vetores x(n), x(n+1), ..., x(n+i-1) é utilizada para calcular o  $C_j^I(t)$  para cada vetor, onde o  $C_j^I(t)$  que denota a probabilidade de k satisfazer a condição de que a distância  $d[u^i(j), u^i(k)]$  seja menor do que t e é calculado através da equação abaixo:

$$C_I^I(t) = n \text{ imero } de \ k \ que \ satisfaz \ d[u^i(j), u^i(k)] \le t/N - i + 1$$

$$03$$

O valor de  $C_j^I(t)$  indica a frequência de similaridade entre o vetor  $u^i(k)$  de comprimento de janela *i* e um determinado padrão  $u^i(j)$  dentro do limiar de tolerância *t*.

Após a obtenção dos valores de  $C_J^I(t)$ , calcula-se a média dos logaritmos naturais de  $C_I^I(t)$ ),  $\phi^i(t)$ :

$$\phi^{i}(t) = \frac{\sum_{j=1}^{N-i+1} \log_e C_j^I(t)}{N-i+1}$$

e a entropia aproximada para séries finitas é dada então por:

$$ApEn (i, t, N) = |\emptyset^{i}(t) - \emptyset^{i+1}(t)|$$
$$= \left[ \frac{\sum_{j=1}^{N-i+1} \log_{e} C_{j}^{I}(t)}{N-i+1} - \left[ \frac{\sum_{j=1}^{N-i+1} \log_{e} C_{j}^{I}(t)}{N-1} \right] \right]$$

Menores valores para ApEn (*i*,*t*,*N*) 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).

# 4.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos através da análise de entropia aproximada foram comparados através do teste Mann-Whitney com nível de significância de 5%.

# REFERÊNCIAS

ABD DJAWAD, Y. *et al.* The application of detrended fluctuation analysis to assess physical characteristics of the human cell line ECV304 following toxic challenges. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 23, p. 100269, 2019.

AGUIAR, J. P. *et al.* Biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual no desenvolvimento de ferramentas analíticas. **Química Nova**, v. 38, p. 817-827, 2015a.

AGUIAR L. A. A. *et al.* Long-term correlation of the electrocorticogram as a bioindicator of brain exposure to ionizing radiation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 48, p. 915-922, 2015b.

ALEXANDER, S. P. H. *et al.* The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18: Ligand-gated ion channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. S130-S159, 2017.

AMANI, R. *et al.* Conformational changes upon gating of KirBac1. 1 into an openactivated state revealed by solid-state NMR and functional assays. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 6, p. 2938-2947, 2020.

ANDERSEN, O. S.; KOEPPE, R. E.; ROUX, B. Gramicidin channels. **leee Transactions on Nanobioscience**, v. 4, n. 1, p. 10-20, 2005.

ARIAS-CALLUARI, K.; NAJAFI, M.; HARRÉ, M. S.; ALONSO-MARROQUIN, F. Stationarity of the detrended time series of S&P500. **ArXiv Preprint** arXiv:1910.01034, 2019.

ASHCROFT, F. M. **Ion Channels and Desease**. Orlando. Academic Press, 2000. 481 p.

ASTASHEV, M. E.; KAZACHENKO, V. N.; GRIGORIEV, P. A. Alamethicin channel kinetics: Studies using fluctuation analysis and multifractal fluctuation analysis. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology**, v. 1, n. 3, p. 246-252, 2007.

BAGAL, S. K. *et al.* lon channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 593-624, 2013.

BAILLIE, R. T. Long memory processes and fractional integration in econometrics. **Journal of Econometrics**, v. 73, n. 1, p. 5-59, 1996.

BANDEIRA, H. T. *et al.* Chaotic model and memory in single calcium-activated potassium channel kinetics. **Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science**, v. 18, n. 3, p. 033136, 2008.

BARABÁSI, A.-L.; VICSEK, T. Multifractality of self-affine fractals. **Physical Review A**, v. 44, n. 4, p. 2730, 1991.

BASSIL, G.; ZARZOSO, M.; NOUJAIM, S. F. Allometric scaling of electrical excitation and propagation in the mammalian heart. **Journal of Theoretical Biology**, v. 419, p. 238-242, 2017.

BERAN, J.; FENG, Y.; GHOSH, S.; KULIK, R. Definition of long memory. In: BERAN, J.; FENG, Y.; GHOSH, S.; KULIK, R. (ed) **Long-Memory Processes**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. 209-384.

BERUBE, B. J.; WARDENBURG, J. B. *Staphylococcus aureus* α-toxin: nearly a century of intrigue. **Toxins**, v. 5, n. 6, p. 1140-1166, 2013.

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 733-751, 1991.

BORYS, P. Long term Hurst memory that does not die at long observation times— Deterministic map to describe ion channel activity. **Chaos, Solitons & Fractals**, v. 132, p. 109560, 2020.

BROWND, M. *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.

BUSHA, B. F.; BANIS, G. A. stochastic and integrative model of breathing. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 237, p. 51-56, 2017.

CASTRO, C. R. O. B.; MORAES R. B.; SILVA J. R. F. *et al.* Detrended Fluctuation Analysis applied to ECG in dogs subjected to physical effort. **Exp Clin Cardiol** 20(9):5068-5073, 2014.

CHEN, X. J. *et al.* Combination of "quadratic adaptive algorithm" and "hybrid operator splitting" or uniformization algorithms for stability against acceleration in the Markov model of sodium ion channels in the ventricular cell model. **Medical & biological engineering & computing**, v. 57, n. 6, p. 1367-1379, 2019.

CHEN, X.-J. *et al.* Combination of "quadratic adaptive algorithm" and "hybrid operator splitting" or uniformization algorithms for stability against acceleration in the Markov model of sodium ion channels in the ventricular cell model. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 57, n. 6, p. 1367-1379, 2019.

COLQUHOUN, D.; HAWKES, A.G. Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 199, n. 1135, p. 231-262, 1977.

COLQUHOUN D, HAWKES A. G. On the stochastic properties of single ion channels. **Proc R Soc Lond B**, v.211, n. 1183, p. 205-235, 1981.

COLQUHOUN D.; HAWKES A.G. The interpretation of single channel recordings. In: Ogden DC (ed) Microelectrode Techniques: **The Plymouth Workshop Handbook**, 2° ed. Cambridge: The Company of Biologists Ltd. 1994, p. 141-188.

COSTA, E. V. L. . Fractal analysis of extra-embryonic vascularization in Japanese quail embryos exposed to extremely low frequency magnetic fields. **Bioelectromagnetics**, v. 34, n. 2, p. 114-121, 2013.

COX, D.H.; CUI, J.; ALDRICH, R.W. Allosteric gating of a large conductance Caactivated K<sup>+</sup> channel. **The Journal of general physiology**, v. 110, n. 3, p. 257-281, 1997.

DIVYAKOLU, S. *et al.* Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy. **Advances in Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 80-104, 2019.

DREYER, I.; MÜLLER-RÖBER, B.; KÖHLER, B. Voltage-gated ion channels. In: **Membrane transport in plants. Blackwell Publ**., 2005. p. 150-192.

EIFFLER, I. *et al. Staphylococcus aureus* α-toxin-mediated cation entry depolarizes membrane potential and activates p38 MAP kinase in airway epithelial cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 311, n. 3, p. L676-L685, 2016.

FERMINI, B. Recent advances in ion channel screening technologies. Ion Channels. In: Fermini B, Priest BT (Org.) **Ion Channel: Top Med Chem**, Berlin, Heidelberg: Springer, p. 1-25, 2008.

FERNÁNDEZ-FALGUERAS, A. *et al.* Cardiac channelopathies and sudden death: recent clinical and genetic advances. **Biology**, v. 6, n. 1, p. 7, 2017.

FERNANDES, T. S.; SILVA, I. M. S.; BARROS, R. Non-linear Dynamics of Chromosome Condensation Induced by Colcemid. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v. 56, n. 1, p. 85-92, 2013.

FLOOD, E. *et al.* Atomistic simulations of membrane ion channel conduction, gating, and modulation. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 13, p. 7737-7832, 2019.

FREER, S. *et al.* A single-atom quantum memory in silicon. Quantum Science and Technology, v. 2, n. 1, p. 015009, 2017.

FUENTE, I.M. Elements of the cellular metabolic structure. **Front Mol Biosci**, v. 2, 2015.

FUENTE, I. M.; CORTES, J. M.; PELTA, D. A.; VEGUILLAS J. Attractor Metabolic Networks. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58284, 2013.

FUENTE, I. M. *et al*, Dynamic properties of calcium-activated chloride currents in *Xenopus laevis* oocytes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

FULIŃSKI, A. *et al.* Non-Markovian character of ionic current fluctuations in membrane channels. **Physical Review E**, v. 58, n. 1, p. 919, 1998.

FURUTANI, K. *et al.* A Kinetic Mechanism Underlying hERG Facilitation by a Blocker. **Biophysical Journal**, v. 116, n. 3, p. 245a, 2019.

FÜSSLE, R. *et al.* On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. **Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 1, p. 83-94, 1981.

GALLISTEL, C. R.; KING, A.P. Memory and the computational brain: Why cognitive science will transform neuroscience. John Wiley & Sons, v. 6, 2011.

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.

GOUAUX, J. E. *et al.* Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 26, p. 12828-12831, 1994.

GRANDI, E. *et al.* Simulation of Ca-calmodulin-dependent protein kinase II on rabbit ventricular myocyte ion currents and action potentials. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 11, p. 3835-3847, 2007.

GRAY, G. S.; KEHOE, M. Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* wood 46. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 615-618, 1984.

GUPTA, V.; MITTAL, M.; MITTAL, V. Chaos theory: an emerging tool for arrhythmia detection. **Sensing and Imaging**, v. 21, n. 1, p. 1-22, 2020.

GUROS, N.B.; BALIJEPALLI, A.; KLAUDA, J.B. The role of lipid interactions in simulations of the  $\alpha$ -hemolysin ion-channel-forming toxin. **Biophysical Journal**, v. 115, n. 9, p. 1720-1730, 2018.

HARMS, G.S. *et a*l. Probing conformational changes of gramicidin ion channels by single-molecule patch-clamp fluorescence microscopy. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 3, p. 1826-1838, 2003.

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

HU, K. *et al.* Effect of trends on detrended fluctuation analysis. **Physical Review E**, v. 64, n. 1, p. 011114, 2001.

HOLZINGER, A. *et al.* On applying approximate entropy to ECG signals for knowledge discovery on the example of big sensor data. In: **International conference on active media technology**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 646-657.

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.

HUGHES, T.A.C.; LEE, J. A new test for short memory in long memory time series. **The American Statistician**, v. 69, n. 3, p. 182-190, 2015.

HUTCHINGS. C.J.; COLUSSI, P.; CLARK, T.G. Ion channels as therapeutic antibody targets. In: **MAbs**, v. 11, n. 2, p. 265-296, 2019.

JUAYERK-HERRERA, K.L. *et al.* Deterministic modeling of single-channel and whole-cell currents. **Journal of Theoretical Biology**, v. 508, n. 110459, 2020.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. (eds). **Principles of Neural Science**, 2° ed. New York: McGraw-Hill, v. 4, pp. 1227-1246, 2000.

KAWANO, R. *et al.* Controlling the translocation of single-stranded DNA through  $\alpha$ -hemolysin ion channels using viscosity. **Langmuir**, v. 25, n. 2, p. 1233-1237, 2009.

KAZACHENKO, VN. *et al.* Fractal properies of gating in potential-dependent K<sup>+</sup>- channels in Lymnaea stagnalis neurons. **Biofizika**, v. 49, n. 5, p. 852-865, 2004.

KIM J. *et al.* Scaling and correlation properties of RR and QT intervals at the cellular level. **Sci Rep** , n. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

KOCHETKOV, K.V. *et al.* Non-markovian gating of Ca 2<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cultured kidney cells Vero. Rescaled range analysis. **J Biol Phys**, v. 2, n. 5, p. 2-3, 1999.

KOPEC, W. *et al.* Direct knock-on of desolvated ions governs strict ion selectivity in K+ channels. **Nature Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 813-820, 2018.

KOIVISTO, A.-P. *et al.* Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 1-19, 2021.

KASIANOWICZ, J.J.; BEZRUKOV, S.M. Protonation dynamics of the alpha-toxin ion channel from spectral analysis of pH-dependent current fluctuations. **Biophysical Journal**, v. 69, n. 1, p. 94-105, 1995.

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.

KRASILNIKOV, O. V. *et al.* The structure of *Staphylococcus aureus* a-toxin-induced ionic channel. Gen. **Physiol. Biophys**, v. 7, p. 467-473, 1988.

KRASILNIKOV, O. V.; SABIROV, R. Z. Ion transport through channels formed in lipid bilayers by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. **Gen. Physiol. Biophys**, v. 8, p. 213-222, 1989.

KUANG, Q.; PURHONEN, P.; HEBERT, H. Structure of potassium channels. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 19, p. 3677-3693, 2015.

KUZMENKIN, A. *et al.* Gating of the HypoPP-1 mutations: I. Mutant-specific effects and cooperativity. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 454, n. 3, p. 495-505, 2007.

LAN, T. H. *et al.* Rescaled range analysis applied to the study delayed rectifier potassium channel kinetics. **Biophysical Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 67-74, 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.; KORFF, C. M.; PICARD, F. 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.

LAVER, D. R. The barrel-stave model as applied to alamethicin and its analogs reevaluated. **Biophysical Journal**, v. 66, n. 2, p. 355-359, 1994.

LEA, P. V. U.S. Patent No. 9,996,479. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 2018.

LEITGEB, B. *et al.* The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 6, p. 1027-1051, 2007.

LENDLEIN, A.; KELCH, S. Shape-memory polymers. **Angew Chem Int**, v. 41, n. 12, p. 2034-2057, 2002.

LEUCHTAG, H. R. Voltage-sensitive ion channels: Biophysics of molecular excitability. **Springer Science & Business Media**, 2008.

LI, W.; KANEKO K. Long-range correlation and partial  $1/f\alpha$  spectrum in a noncoding DNA sequence. **Europhys Lett**, v. 17, n. 7, p.655, 1992.

LIEBOVITCH, L. S.; FISCHBARG, J.; KONIAREK, J. P. Ion channel kinetics: a model based on fractal scaling rather than multistate Markov processes. **Mathematical Biosciences**, v. 84, n. 1, p. 37-68, 1987.

LIEBOVITCH, L. S.; KREKORA, P. The physical basis of ion channel kinetics: the importance of dynamics. **IMA Volumes in Mathematics and its Applications**, v. 129, p. 27-52, 2002.

LIEBOVITCH, L. S.; TOTH, T. I. A model of ion channel kinetics using deterministic chaotic rather than stochastic processes. **J Theor Biol**, v. 148, n, 2, p. 243-267, 1991.

LIPSCOMBE D.; WYLLIE D. J. A. Editorial Overview: Ion Channels, 2018.

LIU, J. *et al.* Structure-based discovery of a small-molecule inhibitor of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 18, p. 5944-5959, 2020.

LIU, W.; CAFFREY, M. Gramicidin structure and disposition in highly curved membranes. Journal of Structural Biology, v. 150, n. 1, p. 23-40, 2005.

LUM, K. *et al.* Exchange of gramicidin between lipid bilayers: implications for the mechanism of channel formation. **Biophysical Journal**, v. 113, n. 8, p. 1757-1767, 2017.

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.

MACHADO, D. C. *et al.* Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly (ethyleneglycol) by alpha-hemolysin nanopore sensor. **RSC advances**, v. 6, n. 61, p. 56647-56655, 2016.

MANNA, S.; BANERJEE, J.; GHOSH, S. Breathing of voltage dependent anion channel as revealed by the fractal property of its gating. **Physica A**, v. 386, n. 1, p. 573-580, 2007.

MENESTRINA, G. lonic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations. **The Journal of membrane biology**, v. 90, n. 2, p. 177-190, 1986.

MERCIK, S.; WERON, K. Stochastic origins of the long-range correlations of ionic current fluctuations in membrane channels. **Phys Rev E**, v. 63, n. 5, p. 051910-1-051910-10, 2001.

MEYER, C. E.; REUSSER, F. A polypeptide antibacterial agent isolated from Trichoderma viride. **Experientia**, v. 23, n. 2, p. 85-86, 1967.

MILLÁN, G.; LEFRANC, G. A fast multifractal model for self-similar traffic flows in high-speed computer networks. **Procedia Computer Science**, v. 17, p. 420-425, 2013.

MIŚKIEWICZ J. *et al.* Long range correlations of the ion current in SV channels. Met3PbCl influence study. **Plos One**, v. 15, n. 3, p. e0229433, 2020.

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.

MORAN, Y. *et al.* Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 4, p. 515-525, 2015.

MORETTIN, P. A.; TOLOI. C. M. C. **Análise de Séries Temporais**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2004.

NASCIMENTO, R. S. Analysis of signal fluctuations of Cortical Spreading Depression: Preliminary findings. Physica A, v. 389, n. 9, p. 869-1873, 2010.

NOGUEIRA, R. A.; VARANDA, W. A.; LIEBOVITCH, L. S. Hurst analysis in the study of ion channel kinetics. **Braz J Med Biol Res**, v. 28, n. 4, p. 491-496, 1995.

OLIVEIRA. R. C. Long-term correlation in single calcium-activated potassium channel kinetics. **Physica A**, v. 364, p. 13-22, 2006.

PENG, C.-K. *et al.* Mosaic organization of DNA nucleotides. **Physical Review E**, v. 49, n. 2, p. 1685, 1994.

PAYNE, J. W.; JAKES, R.; HARTLEY, B. S. The primary structure of alamethicin. **Biochemical Journal**, v. 117, n. 4, p. 757-766, 1970.

PENG, Z.-Y. *et al.* Existence of memory in membrane channels: analysis of ion current through a voltage-dependent potassium single channel. **Cell Biology International**, v. 36, n. 11, p. 973-979, 2012.

PETKOV, G. V. Ion channels. In: **Pharmacology**. Academic Press, 2009. p. 387-427.

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

ROBERTSON, J. W. F. *et al.* Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 20, p. 8207-8211, 2007.

RODRIGUES, C. G. *et al.* Hofmeister effect in confined spaces: halogen ions and single molecule detection. **Biophysical journal**, v. 100, n. 12, p. 2929-2935, 2011.

ROUX, B. Ion channels and ion selectivity. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 201-209, 2017.

SAKMANN, B.; NEHER, E. Single-channel recording. Plenum Press; 1995.

SAMPSON, K. J. *et al.* A computational model of Purkinje fibre single cell electrophysiology: implications for the long QT syndrome. **J Physiol**, v. 588, n. 14, p. 2643-2655, 2010.

SANTOS, R. *et al.* A comprehensive map of molecular drug targets. Nat Rev **Drug Discov**, v. 16, n. 1, p. 19-34, 2017.

SCHMANDT, N. T.; GALÁN, R. F. Stochastic-shielding approximation of Markov chains and its application to efficiently simulate random ion-channel gating. **Physical Review Letters**, v. 109, n. 11, p. 118101, 2012.

SEILIE, E. S.; WARDENBURG, J. B. *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. In: Seminars in cell & developmental biology. **Academic Press**, 2017. p. 101-116.

SILVA, M. P. *et al.* Memory in Ion Channel Kinetics. **Acta Biotheoretica**, p. 1-26, 2021.

SIWY, Z.; AUSLOOS, M.; IVANOVA, K. Correlation studies of open and closed state fluctuations in an ion channel: Analysis of ion current through a large-conductance locust potassium channel. **Physical Review E**, v. 65, n. 3, p. 031907, 2002.

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: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 297, n. 1-2, p. 79-96, 2001.

SONG, L. *et al.* Structure of staphylococcal α-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v. 274, n. 5294, p. 1859-1865, 1996.

STANLEY, H. E. *et al.* Statistical physics and physiology: monofractal and multifractal approaches. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 270, n. 1-2, p. 309-324, 1999.

SYCHEV, S. V.; IVANOV, V. T. Large scale conformational transitions in  $\beta$ -structural motif of gramicidin A: kinetic analysis based on CD and FT-IR data. Journal of Peptide Science, v. 20, n. 8, p. 657-667, 2014.

SZASZ, O. *et al.* An allometric approach of tumor-angiogenesis. **Medical Hypotheses**, v. 116, p. 74-78, 2018.

THOMER, L.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 343-364, 2016.

VARANDA, W. A. *et al.* Hurst analysis applied to the study of single calciumactivated potassium channel kinetics. Journal of Theoretical Biology, v. 206, n. 3, p. 343-353, 2000.

WALEV, I. W. A. N. et al. Staphylococcal alpha-toxin kills human keratinocytes by permeabilizing the plasma membrane for monovalent ions. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, p. 4972-4979, 1993.

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.

WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA, A.; DWORAKOWSKA, B.; GRZYWNA, Z. J. The temperature dependence of the BK channel activity–kinetics, thermodynamics, and long-range correlations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1859, n. 10, p. 1805-1814, 2017.

WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA, A. *et al.* Mechanosensitivity of the bk channels in human glioblastoma cells: kinetics and dynamical complexity. **The Journal of Membrane Biology**, v. 251, n. 5, p. 667-679, 2018.

WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA, A. *et al.* Multifractal properties of BK channel currents in human glioblastoma cells. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 12, p. 2382-2391, 2020a.

WAWRZKIEWICZ-JAŁOWIECKA, A. *et al.* Differences in Gating Dynamics of BK Channels in Cellular and Mitochondrial Membranes from Human Glioblastoma Cells Unraveled by Short-and Long-Range Correlations Analysis. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 2305, 2020b.

WEYER-MENKHOFF, I.; LÖTSCH, J. Human pharmacological approaches to TRPion-channel-based analgesic drug development. **Drug Discovery Today**, v. 23. n. 12, p. 2003-2012, 2018.

WILSON, J. W. *et al.* Ion mobility-mass spectrometry reveals that α-hemolysin from *Staphylococcus aureus* simultaneously forms hexameric and heptameric complexes in detergent micelle solutions. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 15, p. 10204-10211, 2019.

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.

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

XAVIER, A. I. S. F. *et al.* Fractal analysis of chromatin as a potential indicator of human exposures to ionizing radiation. **Scientia Plena**, v. 14, p. 1-8, 2018.

ZAMPONI, G. W.; STRIESSNIG, J.; KOSCHAK, A. DOLPHIN, A. C. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 821-870, 2015.

Capítulo 01: Versão em português do artigo publicado na Revista Acta Biotheoretica em Maio de 2021: Memory in Ion Channel Kinetics

# Memória na Cinética dos Canais lônicos

SILVA, M. P.<sup>1</sup>; RODRIGUES, C.G.<sup>2</sup>; VARANDA, W.A.<sup>3</sup>, NOGUEIRA, R.A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco,

Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,

#### Pernambuco, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

(aposentado), Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

\*Autor Correspondente: nogromildo@gmail.com

# Resumo

Os canais iônicos são proteínas de transporte presentes nas bicamadas lipídicas das membranas biológicas. Eles estão envolvidos em muitos processos fisiológicos, como a geração de impulsos nervosos, secreção hormonal e batimentos cardíacos. Alterações conformacionais na proteína formadora de canais iônicos permitem a abertura ou fechamento desses poros para controlar o fluxo iônico através das membranas celulares. A abertura e o fechamento do canal iônico têm sido tratados classicamente como um processo cinético aleatório, conhecido como processo de Markov. Aqui, o tempo que o canal permanece em um determinado estado é considerado independente da condição que ele tinha no estado anterior. Mais recentemente, no entanto, vários estudos mostraram que esse processo não é aleatório, mas determinístico, onde os tempos de permanência abertos e fechados e a corrente iônica que flui através do canal são dependentes da história. Essa propriedade é chamada de memória longa ou correlação de longo alcance. No entanto, ainda há muita controvérsia sobre como essa memória se origina, qual região do canal é responsável por essa propriedade e quais modelos poderiam reproduzir melhor o efeito memória. Neste artigo, foi realizada uma revisão do que é, onde está, sua possível origem e os métodos matemáticos utilizados para analisar a memória de longo prazo presente no processo cinético dos canais iônicos.

**Palavras-chave:** Correlação de Longo Alcance; Propriedade de Memória longa; Canal Iônico; Coeficiente de Hurst; Análise de Flutuação Destendenciada; Modelagem da Memória.

# 1 Introdução

Do ponto de vista da neurociência, a memória é a capacidade de adquirir, armazenar e recuperar informações (Kandel et al. 2000), bem como a capacidade de transportá-las (Gallistel e King 2009). Do ponto de vista da ciência computacional, a memória é o conjunto de dispositivos que permite que um computador armazene dados e tenha acesso a esses dados novamente no futuro, ou seja é a capacidade do
computador de preservar a informação (Lea 2018). Do ponto de vista químico, a memória de forma, por exemplo, é a capacidade de um material retornar à forma ou condição anterior após uma determinada mudança em seu estado (Lendlein e Kelch 2002). Mesmo que o conceito de memória seja analisado a partir de outras perspectivas, como em imunologia, física, biologia molecular, bem como na área de estatística, o significado pode variar um pouco, mas sempre se refere à capacidade de armazenar e recuperar informações (Beran et al. al. 2013; De La Fuente 2015; Freer et al. 2017; Pradeu e Du Pasquier 2018).

Do ponto de vista matemático, a memória de longo alcance pode ser entendida como a persistência da autocorrelação em um conjunto de dados, que decai mais lentamente do que a taxa exponencial associada ao processo estocástico, como uma média móvel auto-regressiva (Baillie 1996). A presença de memória de longo alcance em um determinado processo significa que existe um padrão particular que se repete ao longo do tempo de observação do fenômeno (Li e Kaneko 1992).

A presença dessa memória longa em uma série temporal significa que eventos pertencentes a um dado processo estão correlacionados no tempo, e que essa correlação persiste ao longo do tempo e diminui lentamente (Hughes e Lee 2015). Segundo Morettin e Toloi (2004), esse processo de memória longa pode ser caracterizado por um lento decaimento hiperbólico da função de autocorrelação para zero, e sua função de densidade espectral não é limitada à frequência zero.

O processo de Markov foi usado para descrever a cinética de canais iônicos por um longo tempo. Dizer que a cinética desses canais possui uma dinâmica Markoviana é assumir que os canais iônicos possuem estados de condutância discretos, nos quais as probabilidades de mudança entre esses diferentes estados dependem apenas do estado atual e não do comportamento anterior; em outras palavras, é o mesmo que aceitar que a dinâmica de abertura e o fechamento desses canais é puramente aleatório (Liebovitch e Krekora 2002). Atualmente, esse modelo ainda é usado para descrever a cinética do canal iônico (Schmandt e Galan, 2012; Chen et al. 2019).

Muitos autores demonstraram que diferentes processos fisiológicos não se comportam aleatoriamente, mas que são regidos por leis determinísticas. São caóticos, fractais, ou de alguma forma um processo determinístico, como o crescimento de organismos, frequência cardíaca, atividade cerebral, metabolismo celular, crescimento tumoral, entre outros (Aguiar et al. 2015; Bassil et al. 2017; Szasz et al. 2018; Castro et al. 2014; Gupta et al. 2020). Esse comportamento determinístico também tem sido observado na cinética dos canais iônicos, onde existe a presença de correlação de longo alcance (Nogueira et al. 1995; Varanda et al. 2000; Siwy et al. 2001; Bandeira et al. 2008; De La Fuente et al. 2017; Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. 2018), o que significa que os estados aberto ou fechado desses canais não ocorrem aleatoriamente.

A presença de memória longa em uma dada série temporal indica uma dependência persistente entre os eventos que compõem a série (Giraitis et al. 2003), ou seja, é um processo correlacionado no tempo (Nogueira et al. 1995), onde o sistema tem a propensão de replicar seu comportamento atual (persistente) ou o comportamento oposto (anti-persistente), no futuro. Por exemplo, a presença de memória persistente na cinética do canal iônico significa que uma longa permanência em um dado estado conformacional (aberto ou fechado), no tempo t, tem maior probabilidade de ser seguido por outro evento longo no futuro (o mesmo vale para valores de tempo curto. Esse comportamento tem sido observado tanto em séries temporais formadas pela sequência de tempos do canal no estado aberto e fechado, bem como quando o processo cinético é analisado em separado, onde as séries temporais são formadas pelas sequências de tempo pertencentes ao estado aberto, ou formadas pelas sequências pertencentes ao estado fechado.

No entanto, Siwy et al. (2001), mostraram que as sequências de estado aberto têm um expoente de Hurst menor do que o encontrado para tempos de permanência fechados. Esses autores sugeriram que o efeito memória presente na cinética dos canais BK das fibras extensoras da tíbia de *Schistocerca gregaria* é determinado pelas propriedades de correlação pertencentes ao estado fechado. Resultados semelhantes também foram relatados por Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. (2020a) em canais BK de células de glioblastoma humano por meio de análise multifractal.

O objetivo desta revisão é discutir sobre a presença de memória de longo prazo na cinética dos canais iônicos, quais são as prováveis origens desse comportamento, quais abordagens matemáticas, bem como quais modelos têm sido utilizados para a análise desse fenômeno.

## 2 Importância da Memória

As correntes iônicas através das membranas celulares desempenham um papel crucial em uma ampla gama de processos fisiológicos necessários para a manutenção da vida como na excitabilidade das células nervosas e musculares, na geração de potenciais de ação, no mecanismo de ação de segundos mensageiros e na secreção celular (Lipscombe e Wyllie 2018). Esses fluxos iônicos ocorrem ao longo de vias específicas de proteínas (canais) a partir da energia eletroquímica armazenada nos gradientes de íons através da membrana (Hille 2001).

Alterações na estrutura e função das proteínas formadoras de canais podem originar doenças denominadas de canalopatias, como no diabetes mellitus, epilepsia, síndrome do QT longo e outras doenças cardíacas. Mutações na proteína formadora de canais iônicos podem alterar o tempo de permanência dos canais nos estados fechados ou abertos, como na Paralisia Periódica Hipocalêmica tipo 1. Essa alteração no comportamento do canal produz alterações no comportamento macroscópico, levando a paralisia muscular (Kuzmenkin et al. 2007). Portanto, entender a estrutura, atividade e funcionamento dos canais iônicos é de enorme importância tanto para a biologia quanto para a medicina (Fermini 2008; Kim 2014; Lascano et al. 2016; Fernández-Falgueras et al. 2017; Kline e Costantini 2019).

Aproximadamente um terço de todo o genoma codifica proteínas de membrana e, mais de dois terços dos medicamentos no mercado têm proteínas de membrana como alvos (Liu e Caffrey 2005). As proteínas formadoras de canais iônicos são a segunda classe mais abundante de proteínas de membrana envolvidas na descoberta de medicamentos (Hutchings et al. 2019). Aproximadamente 18% dos medicamentos, registrados no banco de dados de moléculas bioativas (ChEMBL Database), são direcionados para canais iônicos (Santos et al. 2017), com vendas globais em torno de US\$ 12 bilhões (Hutchings et al. 2019). Portanto, esta é uma grande motivação prática para obter mais conhecimento sobre sua estrutura e mecanismo de ação.

Embora os estudos de canais iônicos, tanto no nível molecular, quanto macroscópico, tenham avançado nos últimos anos, ainda existem algumas questões metodológicas que não permitem uma análise experimental completa de algumas de suas propriedades fundamentais. Muitas das informações que descrevem o comportamento do canal iônico, em muitos processos fisiológicos, foram geradas por

meio de modelagem computacional e através de simulações baseadas no processo de Markov (Grandi et al. 2007; Schmandt e Galán 2012; Sampson et al. 2010; Furutani et al. 2019), onde a cinética de abertura e fechamento dos canais iônicos é considerada um processo puramente aleatório.

No entanto, um novo paradigma para o comportamento cinético dos canais iônicos já foi demostrado, assumindo que esse fenômeno possui um comportamento determinístico, com presença de memória de longo alcance. Assim, essa propriedade deve ser considerada na modelagem e simulações da dinâmica desses canais para explicar processos macroscópicos, como potencial de ação e liberação de hormônios, intrinsecamente controlados pela abertura e fechamento dos canais iônicos. Dessa forma, sugerimos que a propriedade de memória deve ser adicionada às análises e simulações, tornando-se uma nova ferramenta para explorar as características intrínsecas do canal iônico.

### 3 Como identificar a presença de memória longa na cinética dos canais

#### iônicos?

Os canais iônicos desempenham sua função de permitir ou bloquear o fluxo iônico através de mudanças conformacionais na estrutura dos canais iônicos, induzindo transições entre diferentes estados de condutância (Liebovitch e Krekora 2002). Esse processo, chamado de gating, ocorre em resposta a estímulos, como mudanças de voltagem, estresse mecânico, temperatura, mudanças de pH, presença de ligantes químicos, entre outros, o que resulta na abertura ou fechamento da via de permeação através do canal (Hille 2001; Dreyer et al. 2004). A energia usada para as transições entre diferentes estados conformacionais é derivado das flutuações térmicas no ambiente ao redor do canal e estímulos endógenos ou exógenos (Liebovitch et al. 1987). Esse tipo de comportamento é tradicionalmente visto como um processo aleatório no qual a transição entre os estados é inteiramente probabilística. Em outras palavras, os eventos de abertura ou fechamento não seriam influenciados por um evento passado e são dependentes apenas do estado presente (se estiver aberto, é possível calcular as probabilidades de que o canal permaneça aberto ou mude para um canal o estado fechado) (Colquhoun e Hawkes 1981; Hille 2001; Liebovitch e Krekora 2002).

Um modelo físico da cinética de um canal iônico, baseado em um processo Markoviano, assume que o canal iônico alterna entre estados discretos, separados por e barreiras discretas de energia. Além disso, as probabilidades de transição entre os estados abertos e fechados são consideradas independentes do tempo (Colquhoun e Hawkes 1977; Liebovitch et al. 1987; Liebovitch e Krekora 2002). Por causa desse tipo de comportamento, o modelo tradicional markoviano prevê que a distribuição de densidade de probabilidade dos tempos de permanência do canal no estado aberto ou fechado seguem uma distribuição exponencial (Colquhoun e Hawkes 1994), ou uma soma dos exponenciais,quando os estados aberto ou fechado são compostos por mais de um sub-estado (Liebovitch e Toth 1991).

No entanto, vários estudos mostraram que a distribuição dos tempos de permanência é melhor descrito por uma exponencial alongada ou uma lei de potência (Liebovitch et al. 1987; Sansom 1989; Mercik e Weron 2001; Wawrzkiewicz et al. 2012). Além disso, modelos puramente aleatórios falham em simular propriedades específicas presentes no processo de *gating*, como a memória de longo alcance observada nos tempos de permanência abertos e fechados dos canais iônicos (Varanda et al. 2000; Oliveira et al. 2006; Lan et al. 2008).

Análises de alta resolução de correntes iônicas em canal unitário, através da técnica de *patch-clamp* (Neher e Sakmann, 1976), tem sido amplamente utilizada para obtenção de séries temporais que representam o tempo de permanência do canal em diferentes estados de condutância. Essas séries temporais podem ser analisadas através de métodos matemáticos, possibilitando o estudo de várias propriedades biofísicas, como as constantes de tempo, o comportamento da distribuição de probabilidade, bem como a presença ou não de padrões de repetição nessas séries. A partir da análise estatística dessas séries temporais, é possível concluir se o processo cinético dos canais iônicos resulta de um comportamento aleatório ou determinístico (Colquhoun e Hawkes 1981; Liebovitch e Krekora 2002).

Vários relatos mostraram que o processo de abertura e fechamento de diferentes tipos de canais iônicos como canais formados pela alameticina, canais do tipo BK, canais de potássio dependente de voltagem, de cálcio, de cloreto e canais de cátions não-seletivos possuem memória ((Nogueira et al. 1995; Fuliński et al. 1998; Kochetkov et al. 1999; Mercik et al. 1999; Varanda et al. 2000; Siwy et al. 2001; Lan

et al. 2003; Kazachenko et al. 2004; Mana et al. 2007; Astashev et al. 2007; Bandeira et al. 2008; Lan et al. 2008; Peng et al. 2012; Wawrzkiewicz et al. 2012; De La Fuente et al. 2017; Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. 2018; Miśkiewicz et al. 2020). No entanto, a origem da memória é um assunto não completamente compreendido.

## 4 Métodos matemáticos formais para análise de memória

Mana et al. (2007) afirma que avaliar o comportamento da cinética do canal iônico com base nas propriedades estatísticas dos histogramas de tempo de permanência, e outras análises tradicionais, implica aceitar a premissa de que esse processo é linear, estacionário e em equilíbrio.

Esses autores enfatizam que a cinética dos canais iônicos é não-linear, nãoestacionário e em não está em equilíbrio. Sendo assim, esse tipo de análise não é satisfatório para entender os mecanismos que regem esse processo. Lan et al. (2003) observaram que mesmo para um canal iônico simples de dois estados com memória, as distribuições de tempo de permanência nos estados fechados e abertos podem ser ajustadas por duas exponenciais.

Em vista disso, métodos matemáticos apropriados devem ser empregados no estudo da presença ou ausência de memória de longo alcance na cinética dos canais iônicos. Existem diferentes métodos matemáticos para investigar a presença de memória longa nas séries temporais, como Análise de Hurst, Função de Autocorrelação, Análise de Flutuação Destendenciada (DFA) e Análise Multifractal. A escolha do método depende das propriedades dos dados da série temporal que está sendo analisada (Hurst 1951; Peng et al. 1994; Nogueira et al. 1995; Siwy et al. 2001; Astashev et al. 2007; Hudetz et al. 2016).

## 4.1 Análise R/S de Hurst

A análise R/S de Hurst é um método matemático proposto por Harold Edwin Hurst em 1951 em sua pesquisa para projetar um sistema para controlar o rio Nilo, no Egito, através de uma série de pequenas barragens e reservatórios. A crença anterior à análise de Hurst era que um processo estocástico determinava o fluxo de água no rio. Hurst analisou os registros de enchentes rio do Nilo que ocorreram durante nove séculos e mostrou que o processo não possuía um comportamento aleatório, sendo determinístico e apresentando uma correlação de longo alcance. Este método foi utilizado por Mandelbrot e colaboradores para investigar a existência de dependência estatística de longo alcance em séries temporais (Mandelbrot e Ness 1968; Mandelbrot e Wallis 1968; Mandelbrot e Wallis 1969a, b). Eles analisaram diferentes séries temporais simuladas e mostraram que a análise R/S é um método estatístico robusto para revelar a presença de memória de longo alcance em séries temporais.

A obtenção de um coeficiente de Hurst para a cinética do canal iônico pode ser obtido analisando as séries temporais das sequências de tempos de permanência nos diferentes estados de condutância obtidas experimentalmente ou por meio de simulações computacionais.

O expoente de Hurst para uma dada série temporal, T=1, 2, ..., N é calculado subdividindo a série temporal em subséries  $I_m$  (m=1, ..., z), cujos elementos em cada uma das séries são denotados como  $t_{m,k}$ (k = 1, ..., n). Em seguida, o valor médio t e o desvio padrão S são obtidos para cada subsérie e a série de desvios acumulados em relação à média ( $\bar{t}$ ) é obtida de acordo com:

$$Y_{m,k} = \sum_{j=1}^{k} (t_{m,k} - \bar{t})$$
(1)

O valor R/S é o "intervalo"  $R_m = \max(Y_{m,k}) - \min(Y_{m,k})$ , de  $Y_{m,k}$  normalizado pelo desvio padrão. Então, a média (R/S) é calculada para a série de comprimentos n. Este procedimento é feito para diferentes escalas. Primeiro, é calculado para todo o conjunto de dados. Em seguida, o conjunto é dividido em dois subconjuntos iguais. O procedimento de cálculo de R/S é repetido para diferentes valores de n. O comprimento das subséries é obtido dividindo a série a série total em n elementos, onde  $n = N/\tau$ , onde  $\tau = 1, 2, 4, ..., N/2$ .

Então, é gerado um gráfico de log duplo de  $(R/S)_{médio}$  versus n e a inclinação do gráfico, obtida pelo método de regressão linear de mínimos quadrados, é o expoente de Hurst, o parâmetro usado para identificar a memória de longo alcance no sistema.

Hurst (1951) observou que a faixa R/S tem a seguinte relação empírica:  $(R/S)_{médio} = (N/2)^{H}$ , onde H é definido como o expoente de Hurst com valores no intervalo  $0 \le H \le 1$ . O valor do expoente de Hurst (H) pode indicar três possíveis regimes em um processo. H = 0,5 significa que não há similaridade entre os elementos da sequência de dados; ou seja, o sistema se comporta aleatoriamente. Valores entre 0 e 0,5 indicam que o processo é determinístico, com a presença de uma memória de longo alcance anti-persistente, ou seja, a presença de eventos longos na série temporal no presente tenderá a ser acompanhado por eventos de curta duração no futuro (e vice-versa). E, por fim, valores 0,5< H  $\leq$ 1,0 são indicativos da presença de memória de longo alcance persistente, onde um valor alto na série temporal tenderá a ser seguido por um valor alto no futuro (e vice-versa) (Matos et al. 2008).

## 4.2 Análise de Flutuação Destendenciadas (DFA)

DFA é um método proposto por Peng et al. (1994) para quantificar correlações de longo alcance em séries temporais não estacionárias. Esse método possui uma vantagem sobre outros métodos porque evita a detecção de correlações espúrias quando tais correlações são artefatos de não estacionariedade.

A presença de tendência pode não ser uma característica intrínseca dos dados; em vez disso, uma consequência de efeitos externos. A análise dos dados sem levar em consideração essas tendências espúrias pode levar à identificação de falsas correlações (Kantelhardt et al. 2001). A remoção da tendência é essencial porque evita que qualquer ruído externo afete o comportamento do sistema. De acordo com Hu e colaboradores (2001), a presença de tendências é comum em séries temporais geradas por sistemas biológicos ou físicos.

O método DFA tem sido utilizado na análise de diversos fenômenos, tais como cinética de canais iônicos, respiração humana, dados do mercado financeiro, resposta das células a diferentes toxinas, eletrocardiograma e eletrocorticograma (Nascimento et al. 2010; Peng et al. 2012; Castro et al. 2014; Aguiar et al. 2015; Busha e Banis 2017; Arias-Calluari et al. 2019; Djawad et al. 2019; Kim et al. 2019).

A análise através do método de DFA consiste em analisar as séries temporais após a remoção da tendência e buscar a presença ou ausência de autossimilaridade dentro da série temporal (Stanley et al. 1999; Hu et al. 2001). As etapas dessa análise ocorrem de acordo com as seguintes etapas (Peng et al. 1994, 1995):

(a) Obtenção de uma série integrada, y (k), a partir da série temporal original de acordo com a equação abaixo:

$$y(k) = \sum_{i=1}^{k} [y(i) - \bar{y}],$$
(2)

onde y(i) são os elementos da série original e  $\bar{y}$  é sua média.

(b) Em seguida, divide-se a série temporal integrada de comprimento N em N/n janelas não sobrepostas.

(c) Obtemos a tendência local,  $y_n(k)$ , para cada caixa através de um ajuste linear através do método dos mínimos quadrados.

(d) A tendência presente em cada janela é retirada dos dados calculando a diferença entre a série integrada, y(k), e a tendência local,  $y_n(k)$ . Finalmente, calculamos F(n), a raiz quadrada média da flutuação, como segue:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^{N} [y(k) - y_n(k)]^2}$$
(3)

(e) Os procedimentos acima são repetidos para diferentes escalas de tempo, diferentes valores de n, para fornecer uma relação entre F(n) e os diferentes tamanhos de janela (n).

(f) Finalmente, é traçado um gráfico duplo-log de F(n) versus n. O coeficiente de regressão linear do gráfico da função  $F(n) \sim n^{\alpha}$  é o parâmetro DFA,  $\alpha$ , que indica a presença ou ausência de correlação de longo alcance (memória) na série original.

Um  $\alpha$  = 0,5 indica um comportamento aleatório da série. Valores entre 0 e 0,5 indicam a presença de memória antipersistente; ou seja, valores baixos são mais propensos a serem seguidos por valores altos e vice-versa. Valores de  $\alpha$  entre 0,5 e 1,0 indicam a presença de memória persistente, ou seja, há maior probabilidade de que um curto tempo de permanência ser seguido por outro um curto; o mesmo vale para valores altos (Peng et al. 1994). A Figura 1 mostra o registro da corrente iônica do canal unitário do tipo BK (a),  $\alpha$ -DFA da cinética dos canais iônicos do tipo BK de células de Leydig (série temporal com memória) (b) e  $\alpha$ -DFA da série temporal após randomização dos dados (série temporal sem memória) (c). Esses resultados foram obtidos por nosso grupo e ainda não foram publicados.



**Fig. 1**. Coeficiente  $\alpha$ -DFA na cinética do canal BK em célula de Leydig. a. Mostra o registro da corrente iônica através de canal unitário; b. Mostra o valor do  $\alpha$  – *DFA* da série temporal com os tempos de permanência do canal BK nos estados abertos e fechados (série temporal com memória); c. Mostra o valor do  $\alpha$  – *DFA* da série temporal com os tempos de permanência do canal BK nos estados abertos e fechados (série temporal com a memória); c. Mostra o valor do  $\alpha$  – *DFA* da série temporal com os tempos de permanência do canal BK nos estados abertos e fechados após a randomização dos dados (série temporal sem memória). A corrente iônica foi registrada na configuração *outside-out*, de canais do tipo BK de células de Leydig de camundongos, sob uma voltagem constante de -60 mV, e uma concentração de cálcio [Ca2+] = 0,05 µM. A seta indica o estado fechado do canal.

#### 4.3 Análise Multifractal

A análise da memória de longo alcance na cinética dos canais iônicos pode ser obtida tanto através do método de DFA, bem como através de outros métodos, como a análise R/S de Hurst. No entanto, tais métodos são robustos apenas quando as séries possuem propriedades de escala monofractal. No entanto, muitas séries temporais não exibem ao longo do tempo um comportamento de escala monofractal simples nas flutuações. Neste caso, diferentes expoentes de escala são necessários para diferentes segmentos da série. Assim, uma análise multifractal deve ser aplicada. O método multifractal DFA (MF-DFA) foi proposto por Kantelhardt et al. (2002) e pode ser utilizado para identificar o comportamento de escala multifractal presentes nas séries temporais. Makowiec e Fuliski (2010) propuseram um protocolo para usar a análise multifractal no estudo da cinética do canal iônico como um método para revelar

a correlação de longo alcance nas sequências de tempo de permanência nos diferentes estados de condutância.

O algoritmo MF-DFA (Kantelhardt et al. 2002) quantifica a correlação de longo alcance da seguinte forma:

(a) Primeiro, obtemos uma série integrada, y(k), a partir da série temporal original x(i):

$$Y(k) = \sum_{i=1}^{k} [x(i) - \bar{x}]$$
(4)

onde  $\bar{x}$  é a média da série x(i).

(b) Em seguida, a série integrada Y(k) é dividida em Ns sub-séries não sobrepostas de tamanho s.

As etapas a e b são repetidas para a análise da série com sentido invertido, do final até início da série. Assim, são obtidos segmentos de 2Ns. Este procedimento é necessário porque o comprimento N da série muitas vezes não é um múltiplo da escala de tempo s. Assim, quando s divide N, tal que  $Ns \times s < N$ , poderia haver uma perda de alguns dados do registro. Para resolver esse problema, o algoritmo analisa as janelas adjacentes em duas etapas, uma vez da direita para a esquerda da série e uma segunda vez uma da esquerda para a direita, sequencialmente.

(c) A tendência local da série integrada  $y_n$  é calculada, em cada subsérie, por um ajuste linear ou polinomial, através do método dos mínimos quadrados.

(d) Em cada segmento, a variância é calculada:

(1) Para cada segmento  $v, v = 1, ..., N_s$ :

$$F^{2}_{(v,s)} \equiv \frac{1}{s} \sum_{i=1}^{s} \{Y[(v-1)s+i] - y_{v}(i)\}^{2}$$
(5)

е

2. Para cada segmento  $v = N_s + 1, ..., 2N_s$ :

$$F^{2}_{(v,s)} \equiv \frac{1}{s} \sum_{i=1}^{s} \{Y[N - (v - N_{s})s + i] - y_{v}(i)\}^{2},$$
(6)

onde  $y_v(i)$  é o ajuste polinomial no segmento v. A série temporal é destendenciada pela subtração do entre o ajuste polinomial e da série integrada.

(e) Calcula-se o valor médio dos segmentos, obtendo-se a da função de flutuação de ordem qth:

$$F_q(s) \equiv \left\{ \frac{1}{2N_s} \sum_{\nu=1}^{2N_s} [F^2(\nu, s)]^{q/2} \right\}^{1/q},\tag{7}$$

(f) Então, o procedimento acima é repetido para diferentes escalas s.

(g) E finalmente, para cada valor de q é gerado um gráfico log-log de  $F_q$  (s) versus s.

Quando  $F_q(s)$  aumenta, para grandes valores de *s*, como uma lei de potência  $F_q(s) \sim s^{h(q)}$ , isso indica a presença de correlação de longo alcance na série x(i). Se q = 2, o método DFA é aplicado. Para q = 0 o expoente h(q) não é determinado usando a equação acima, em vez disso, o procedimento de média logarítmica é aplicado,

$$F_0(s) \equiv exp\left\{\frac{1}{4N_s} \sum_{\nu=1}^{2N_s} ln[F^2(\nu, s)]\right\} \sim s^{h(0)}$$
(8)

Em processos monofractais, h(q) é independente de q, seu comportamento de escala, de variâncias  $F^2(v,s)$ , é semelhante para todos os segmentos e  $F_q(s)$  apresenta o mesmo comportamento de escala para todos os valores de q. Em séries com um comportamento Multifractal, diferentes comportamentos de escala podem ser observados e  $F_q(s)$  apresenta um comportamento de escala dependente do dos valores de q.

#### 4.4 Função de Autocorrelação

Segundo Hunt (2016), a função de autocorrelação (*ACF*) mede a correlação entre os dados dos dados da série temporal em relação a eles mesmos. A análise de autocorrelação da série temporal  $x(i), i = x_1, x_2, ..., x_N$ , com média  $\bar{x}$ , é dada pelo seguinte procedimento:

(a) Inicialmente, os pares de dados pertencentes à série temporal são formados:
(x<sub>1</sub>, x<sub>1+k</sub>), (x<sub>2</sub>, x<sub>2+k</sub>), ..., (x<sub>n</sub>, x<sub>n+k</sub>), onde k é um atraso entre os elementos da série;
(b) A função de autocorrelação, r(k), é definida:

$$r(k) = \frac{\sum_{i=1}^{N-r} (x_i - \bar{x})(x_{i+k} - \bar{x})}{\sum_{i=1}^{N} (x_i - \bar{x})^2}$$
(9)

(c) O comportamento da função de autocorrelação é obtido através da construção de um gráfico r(k) versus k.

Exceto para r(0), onde o valor da função de autocorrelação é igual a 1, o valor de r(k) é igual a zero quando a série temporal se originar de um processo aleatório. Séries que têm seus dados correlacionados no tempo apresentam valores de r(k)significativamente diferentes de zero.

De acordo com Mercik et al. (1999), a função de autocorrelação pode ser aplicada como um teste para detecção de memória de longo alcance na cinética de canais iônicos, onde, os expoentes da função de autocorrelação são parâmetros que indicam a velocidade de perda de correlação ao longo do processo.

## 5 Memória longa é uma propriedade ubíqua a todos os canais iônicos?

A presença de memória na cinética dos canais iônicos foi observada pela primeira vez por nosso grupo de estudo (Nogueira et al. 1995) em canais unitários de potássio ativados por cálcio (canais BK) presentes nas células de Leydig de camundongos. Esses autores avaliaram o processo cinético desses canais em diferentes concentrações de cálcio e diferentes voltagens transmembranares. Através da análise R/S de Hurst, eles observaram a presença de memória de longo prazo persistente ao longo da série de tempos de permanência do canal nos estados abertos e fechados.

Posteriormente, outros estudos da cinética de BK e de outros tipos de canais iônicos foram realizados com resultados que corroboraram nossos resultados (Fuliński et al. 1998; Varanda et al. 2000; Siwy et al. 2001; Bandeira et al. 2008; Wawrzkiewicz et al. 2012; De La Fuente et al. 2017; Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. 2018).

A propriedade de memória já demonstrou estar presente em diversos tipos de canais, desde peptídeos antimicrobianos (Astashev et al. 2007) até canais complexos formados por múltiplas subunidades, como potássio, cálcio, cloreto e canal de cátions não seletivos (Varanda et al. 2000; Lan et al. 2003; Kazachenko et al. 2004; Wawrzkiewicz et al. 2012; Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. 2020a).

Além disso, a propriedade de memória longa também foi encontrada em canais iônicos presentes nas membranas das organelas. Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. (2020b) observaram a presença de correlação de longo alcance em canais BK de membranas mitocondriais de células de glioblastoma humano. Correlações de longo alcance também foram observadas na série temporal de canais iônicos presentes nas membranas vacuolares de beterraba vermelha (*Beta vulgaris L*.) (Miśkiewicz et al. 2020). Portanto, é plausível assumir que a memória de longo prazo é uma propriedade onipresente dos canais iônicos.

#### 6 Modelos matemático capazes de simular memória

## 6.1 Model0 Caótico

Os sistemas caóticos possuem um comportamento que, inicialmente, parece ser aleatório. No entanto, é um processo simples, regido por uma função específica e fortemente dependente das condições iniciais do sistema (Rickles et al. 2007). Um modelo caótico de cinética de canais iônicos foi inicialmente proposto por Liebovitch e Toth (1991). Este modelo é um mapa iterado composto por uma função linear por partes e assume que as transições do canal entre os diferentes estados de condutância não são aleatórias. Para Liebovitch e Toth, tais transições são geradas por forças determinísticas, onde os valores atuais (*i*) no tempo  $t \, é \, x(n)$ , e o valor de *i* no tempo  $t + \Delta t \, é \, x(n+1)$ . Assim, a variável aleatória x pode ser determinada em função do valor no instante anterior. Podemos observar que o modelo de Liebovitch e Toth já assumia que o comportamento cinético dos canais iônicos era determinístico, no entanto, nosso grupo de pesquisa demonstrou que esse modelo não possui a capacidade de reproduzir a propriedade de memória longa, observado nos dados experimentais, nos resultados dos dados simulados (Bandeira et al. 2008).

Alguns modelos caóticos recentes foram propostos para incorporar o efeito de memória no sistema (Bahramian et al. 2019; Borys 2020; Juayerk-Herrera et al. 2020). O modelo Bahramian e colaboradores considera os canais iônicos como sistemas determinísticos. Este modelo descreve a série de tempo de permanência do canal iônico nos diferentes estados de condutância como um processo caótico e reproduz tanto a propriedade de memória de longo alcance quanto a variabilidade da probabilidade de abertura ( $P_0$ ) dependente da voltagem observados nos dados experimentais.

Neste modelo, o canal iônico alterna entre dois estados, aberto e fechado, onde o valore da corrente iônica no tempo t é igual a x(n) e o valor da corrente no tempo t + 1 é  $x_{(n+1)}$ , e o forma geral do mapa unidimensional é dada por:

$$x_{(n+1)} = f(x_{(n)}).$$
(10)

Na modelagem, inicialmente, define-se o valor limiar de corrente que delimita os estados aberto e fechado, *T*. Dessa forma, se x(n) < T, o canal encontra-se no estado fechado; já se x(n) > T, o canal encontra-se no estado aberto. A flutuação dos valores de corrente tem um comportamento em forma de sino. Os parâmetros de modelagem do mapa caótico são  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\lambda \in \omega$ . Onde  $\lambda$  representa o centro da curva,  $\alpha$ é a amplitude máxima da curva,  $\beta$  representa a variância de *y* em relação à média, sendo obtido ela equação:

$$y = \frac{\alpha}{\left(1 + \left(\beta(x - \lambda)\right)^{\omega}\right)},\tag{11}$$

ω é um parâmetro que modifica a forma da curva. O mapa caótico é determinado por uma função composta por quatro termos e função *step* (ver Fig. 2): A parte superior, representa o estado aberto; a parte inferior, representa o estado fechado; a parte do mapa que liga o estado fechado ao estado aberto é B – > U, e a quarta parte U – > B, conecta o estado aberto ao estado fechado; além disso, o quinto termo da função, a função de *step*, é aplicada para moldar uma função de mapa com o comportamento desejado.



**Fig. 2.** Mapa caótico do modelo de Bahramian et al. (2019). A parte inferior representa o estado fechado e a parte superior representa o estado aberto. A linha vermelha é uma bissetriz do primeiro quadrante.

Os parâmetros  $\alpha_0$ ,  $\beta_0$ ,  $\lambda_0 \in \omega_0$  correspondem à parte superior do mapa; os parâmetros  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\lambda_1$ , e  $\omega_1$  modelam o comportamento na parte inferior; os parâmetros  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$ ,  $\lambda_2$ , e  $\omega_2$  correspondem a *B*-> *U* e, por fim, os parâmetros  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\lambda_3$ , e  $\omega_3$  correspondem a *U*-> *B* da função. Dessa forma, o mapa caótico é descrito de acordo com a função abaixo:

$$x_{(n+1)} = \frac{\alpha_0}{\left(1 + \left(\beta_0(x_{(n)} - \lambda_0)\right)^{\omega_0}\right)} + \frac{\alpha_1}{\left(1 + \left(\beta_1(x_{(n)} - \lambda_1)\right)^{\omega_1}\right)} + \frac{\alpha_2}{\left(1 + \left(\beta_2(x_{(n)} - \lambda_2)\right)^{\omega_2}\right)} + \frac{\alpha_3}{\left(1 + \left(\beta_3(x_{(n)} - \lambda_3)\right)^{\omega_3}\right)} + 0,75$$

$$* \text{ step } (x_{(n)} - 0,7)$$

$$(12)$$

Ajustes nos parâmetros  $\beta_2$  e  $\beta_3$  permitem que o modelo simule séries temporais com diferentes valores do expoente de Hurst e diferentes valores de  $P_0$ , propriedades presentes nos dados experimentais. Segundo os autores, valores mais baixos para  $\beta_2$ causam uma expansão de B- > U, e é responsável por mudar  $x_{(n)}$  do estado fechado para o estado aberto em um curto período de tempo. O aumento do valor de  $\beta_3$  torna a parte U->B mais estreita, o que faz com que  $x_{(n)}$  permaneça no estado aberto por um tempo prolongado. As mudanças nos valores de  $\beta_2$  e  $\beta_3$  estão relacionadas às variações nos dados experimentais, como voltagem, e modificam o tempo de permanência no estado e aberto e a probabilidade de canal aberto.

O modelo de Bahramian et al. (2019) foi o primeiro modelo caótico capaz de reproduzir a presença de correlação de longo alcance na dinâmica de um canal iônico. Além disso, ele reproduz séries temporais com diferentes valores do expoente de Hurst e uma ampla faixa de probabilidade de abertura, propriedades presentes nas séries temporais originadas a partir dos dados experimentais.

Borys (2020) observou que o modelo de Bahramian e colaboradores não é capaz de reproduzir um coeficiente de Hurst independente da escala de tempo. Em vez disso, o mapa caótico deste modelo produz um coeficiente de Hurst consistente com a memória em uma escala de tempo limitada, ou seja, a simulação em grandes escalas de tempo da série mostra que o valor do expoente de Hurst tendem a valores próximos a 0,5, o que é indicativo de aleatoriedade dos dados.

Com o objetivo de criar um modelo caótico que reproduza um coeficiente de Hurst independente da escala de tempo, Borys (2020) propôs um mapa caótico determinístico capaz de simular o comportamento cinético do canal em larga escala de tempo e que apresenta um coeficiente de Hurst consistente, com a persistência da memória por longos períodos de observação.

O efeito Hurst dependente da escala de tempo, observado nas simulações através do modelo de Bahramian et al. (2019), de acordo com Borys (2020), abre uma questão importante que vale a pena investigar: os sistemas biológicos exibem efeito Hurst limitado no tempo (limitado, por exemplo, pelo tempo de vida)?

O modelo proposto por Borys (2020) é um mapa determinístico composto por duas regiões, a região positiva, que corresponde ao estado aberto, e a região negativa, correspondente ao estado fechado. A variável  $x_{(n+1=)}F(x_n)$  flutua no intervalo de todo o domínio dos números reais, e é composta por uma parte inteira, relacionada à correlação de longo prazo, e uma parte racional, relacionada ao comportamento caótico.

Nesse modelo, a variável  $W_n$  (tamanho da janela) é definida como dependente do tempo gasto na correlação do tempo de permanência. Essa variável impõe a

condição de que quanto maior a correlação, menor a probabilidade de interrupção da mesma. A probabilidade de mudança do canal entre os diferentes estados de condutância conservando a correlação é  $\alpha$ , e (1- $\alpha$ ) para mudança de estado perdendo a correlação. Assim, o parâmetro  $\alpha$  controla o efeito Hurst.

Borys (2020) propôs uma possível interpretação biológica do efeito Hurst consistente com o mapa caótico. Segundo ele, o *gate* sofre interações de Van Der Waals com o ambiente cada vez mais fortes ao longo do tempo. Para passar de um estado para outro, ele precisa de uma grande flutuação, que pode levá-lo do estado inicial para o estado final de maior energia, garantindo uma forte ligação nesse estado. Assim, um longo tempo de permanência é esperado novamente no futuro. Alternativamente, o *gate* pode sofrer alterações através de um longo processo passo a passo. Este processo envolveria a transição parcial do *gate* e o aumento lento da força de ligação no estado oposto.

## 6.2 Modelo Baseado no Processo Estacionário Dicotômico com Memória longa

Mercik e Weron (2001) desenvolveram um modelo para cinética dos canais iônicos com base nos dados experimentais de canais BK de Fibras musculares de *Schistocerca gregaria*. De acordo com esse modelo, a dinâmica do canal iônico funciona como um sinal estocástico dicotômico, onde a presença de memória é uma consequência das propriedades de cauda longa da distribuição de probabilidades dos tempos de permanência do canal no estado fechado.

No modelo de Mercik e Weron (2001), os valores da corrente iônica do canal iônico são distribuídos entre duas populações. A população mais próxima de zero corresponde ao estado de condutância fechada e a população com os maiores valores corresponde ao estado aberto. Assim, o canal pode ser modelado como um sinal dicotômico 0-1.

A simulação do sinal de corrente iônica é baseada nos resultados da análise estatística dos dados experimentais, como os tempos médios de permanência, os desvios padrão em cada estado de condutância e valores médios de corrente iônica ao longo do tempo. As distribuições de probabilidade do tempo de residência em cada estado de condutância foram construídas de acordo com os dados experimentais, os tempos de permanência no estado aberto abertos são distribuídos de acordo com uma função exponencial e os tempos de permanência no estado fechados são distribuídos de acordo com a lei de Pareto. A distribuição dos valores simulados da corrente segue o mesmo comportamento experimental, uma distribuição gaussiana. A modelagem do sinal de corrente tem as seguintes etapas:

Inicialmente, uma série de variáveis aleatórias é gerada:

$$\{T_k\}_{k=0,1,2,\dots} = \left\{\tau, \tau + \sum_{i=1}^k (T_{c,i} + T_{o,i}), k = 1,2\dots\right\}$$
(13)

Que representa os instantes de tempo em que o canal abre; a variável  $\tau$  é o tempo de atraso entre o início do sinal reconstruído e o início das transições consecutivas entre os estados aberto e fechado.  $T_{c,i} e T_{o,i}$  são os tempos de fechamento e abertura, respectivamente. A variável  $\tau$  é definida pela função

$$\tau = (T_o^{(0)} + T_{c,0})B + T_c^{(0)}(1 - B),$$
(14)

onde  $T_o^{(0)}$  e  $T_c^{(0)}$  são os tempos de abertura e fechamento durante o período de atraso, respectivamente, B é a variável aleatória de Bernoulli e  $\tau$  tem a seguinte distribuição de probabilidade:

$$P\{\tau < t\} = \frac{1}{\langle T_c \rangle + \langle T_o \rangle} \int_0^t \{1 - [F_c * F_o](s)\} ds,$$
(15)

onde  $F_c$  e  $F_o$  são as funções de distribuição cumulativa para os períodos fechados e estado aberto, respectivamente, e o termo  $[F_c * F_o](t)$  representa a convolução das funções  $F_c$  e  $F_o$ , que assegura que a série ({ $T_k$ }<sub>k=1,2,3...</sub>) é um processo estacionário.

Após a realização dos passos anteriores, temos as variáveis que descrevem a aparência do estado aberto e fechado. Assim, é possível definir o processo dicotômico L(t):

$$L(t) = B\mathbf{1}_{[0,T_{o,0})}(t) + \sum_{n=0}^{\infty} \mathbf{1}_{[T_n,T_n+T_{o,n+1})}(t),$$
(16)

onde 1 é a função indicador, definida como

$$1_{[a,b)}(x) = \begin{cases} 1 & if \ x \in [a,b) \\ 0 & if \ x \notin [a,b) \end{cases}.$$
 (17)

O processo dicotômico L(t) é responsável por comutar o sistema entre os dois níveis de condutância, estado aberto e estado fechado.

Com base na sequência dicotômica de abertura e fechamento, o registro de corrente iônica é reconstruído. As variáveis aleatórias independentes  $\{I_{o,n}\}_{n=1,2,3,...}$  e  $\{I_{c,n}\}_{n=1,2,3,...}$  são os valores de corrente iônica para o estado aberto e fechado, respectivamente. Os valores de  $I_c$  possuem distribuição idêntica e média igual a  $\langle I_c \rangle = m$  e os valores de  $I_c$  também possuem distribuição idêntica e média igual a  $\langle I_o \rangle = M$ .

Por fim, o enésimo registro de corrente é definido por:

$$I(n) = L(n\Delta t)I_{o,n} + [1 - L(n\Delta t)]I_{c,n},$$
(18)

onde  $\Delta t = 1/f_{ex}$  and  $f_{ex}$  é a frequência na qual a corrente iônica é modelada.

A flutuação dos valores de corrente ao longo do tempo, I(t), é um processo estacionário, cuja função de autocorrelação decai como uma lei de potência determinada pelo expoente de "cauda"  $D_c$  da distribuição dos tempos de permanência no fechado.

O modelo proposto por Mercik e Weron (2001) foi capaz de reproduzir um sistema com propriedade de memória de longo alcance e seus resultados, através da análise de Hurst, análise de flutuação destendenciada e índice de Orey apresentaram valores médios próximos aos valores experimentais. Além disso, a função de autocorrelação dos dados simulados também apresentou resultados semelhantes aos dos dados experimentais.

Embora o modelo proposto possa reproduzir a presença de memória no processo cinético dos canais iônicos, um aspecto que pode ser questionado é o fato desse modelo reproduzir apenas um sistema com comportamento estacionário já que para alguns tipos de canais iônicos, como canais aniônicos dependentes de voltagem (Manna et al. 2007), o sinal de corrente não é um processo estacionário. Assim, não é um modelo que possa ser aplicado para simular o comportamento de todos os canais iônicos.

## 6.3 Modelo de cinética de canal iônico baseado em criticidade auto-organizada

A criticidade auto-organizada é um fenômeno que aparece em sistemas sujeitos a uma perturbação permanente, que evolui naturalmente ao longo do tempo para um estado crítico, sem ajustes nos parâmetros externos e sem sensibilidade às condições iniciais. No entanto, neste estado crítico, o sistema é altamente suscetível a pequenas mudanças ou ruído, que pode causar reações imprevisíveis. O ponto crítico em sistemas dinâmicos é um atrator alcançado partindo-se do equilíbrio. Quando o estado crítico é atingido, o comportamento do sistema segue uma lei de potência (Bak et al. 1988).

Um modelo de cinética de canal iônico baseado em criticidade auto-organizada foi proposto por Brazhe e Maksimov, em 2006. Este modelo assume que o canal iônico é um sistema complexo dissipativo que pode atingir um estado crítico autoorganizado. Nesse ponto, um distúrbio conformacional local pode se espalhar por todo o sistema, resultando em uma grande mudança conformacional. O modelo mostra que a criticalidade auto-organizada, e suas propriedades estatísticas e fractais, é capaz de reproduzir o comportamento dos dados experimentais dos canais iônicos BK.

O modelo assume os resíduos de aminoácidos da proteína do canal iônico como uma rede hexagonal, com dimensão de matriz de 256 × 256.

Na simulação, um valor arbitrário  $z_c$  ( $z_c \ge 0$ ) é inicialmente determinado, e um local (i, j) do sistema é escolhido aleatoriamente e perturbado (pelo movimento browniano do solvente):

$$z_{i,j} \to z_{i,j} + e, \tag{19}$$

onde  $z_{i,j}$  é a "tensão" conformacional em (i, j), e e é o parâmetro que descreve o fluxo de energia no sistema. Após essa perturbação no sistema, se  $z_{i,j} > z_c$ , (i, j) relaxa e perturba os sítios vizinhos:

$$z_{i,j} \to z_{i,j} - n$$

$$\{z'_k\}_{i,j} \to \{z'_k\}_{i,j} + 1, \, k = 1, \dots, n,$$
(20)

onde  $\{z'_k\}_{i,j}$  é a conformação dos locais que circundam (i,j), e n é o número de vizinhos. Cada unidade do sistema está relacionada de 3 a 6 unidades vizinhas. Se n < 6, a proteína é simulada em uma forma mais solta do que a proteína nativa. A relaxação  $z_{i,j}$  é repetida até que  $z_{i,j} \leq z_c$ . Esse procedimento é realizado com todos os locais vizinhos que se tornaram instáveis. A perturbação do solvente ocorre somente quando não há sítios instáveis no sistema. Se o índice vizinho exceder as dimensões da rede, o excesso de energia é dissipado de volta para a solução em vez de excitar qualquer sítio da rede. O gate do canal iônico neste modelo é sensível à média z ("tensão") sobre a rede.

Para simular as transições entre os diferentes estados de condutância do canal, um limiar é determinado para subdividir o sistema em um estado aberto e fechado. Quando a tensão média sobre a rede é maior que esse limiar, assume-se que o canal está no estado aberto, e quando a tensão média é menor que o limiar, o canal está no estado fechado. Durante a simulação, tanto as "*bursts*", transições rápidas, quanto os grandes tempos de permanência do canal num determinado estado surgem naturalmente e o deslocamento do limiar resulta em alteração na relação aberto/fechado.

Durante a modelagem, os tempos médios de permanência nos estados abertos e fechados diminuem com o aumento do parâmetro *e* para todos os números de vizinhos. O aumento do fluxo de energia no sistema naturalmente leva a uma mudança para frequências mais altas na dinâmica de troca da rede, ou seja, o valor  $\langle z \rangle$  ultrapassa o limite com mais frequência e os tempos de permanência tornam-se mais curtos.

Os resultados obtidos através de simulações utilizando o modelo de Brazhe e Maksimov (2006) mostrou que esse modelo é capaz de gerar o comportamento da lei de potência, a presença de correlação de longo prazo e o comportamento fractal na cinética dos canais iônicos.

## 6.4 Modelo Baseado na Caminhada Aleatória Simples

De acordo com Wawrzkiewicz et al. (2012), a correlação de longo prazo exibida pelos canais BK de células epiteliais brônquicas humanas não é uma propriedade inerente dos canais, como foi entendido anteriormente (por exemplo, Nogueira et al. 1995). Em vez disso, a memória longa seria uma propriedade introduzida no sistema por forças resultantes de flutuações na espessura da membrana ao redor do canal. Para confirmar sua hipótese, eles propuseram dois modelos para simular o comportamento cinético desses canais (ver Fig. 3) e tentar reproduzir o efeito das flutuações na espessura da membrana para gerar comportamento de memória.



**Fig. 3** Ilustração esquemática dos modelos de cinética de canais iônicos propostos por Wawrzkiewicz et al. (2012). O espaço conformacional do modelo é subdividido em 20 unidades utilizados como espaço difusivo. O limiar entre o estado aberto e fechado é representado por TP, que dividem o espaço unidimensional em dois subconjuntos que representam os estados fechados e abertos. A parte negativa corresponde aos estados fechados do canal, e uma parte positiva corresponde ao estado aberto. A coordenada de reação *x* representa a conformação real da *gate* do canal. As linhas verde, vermelha e azul são as representações esquemáticas da função potencial associada aos modelos. O perfil de variação de energia nos estados aberto e fechado é específico em cada modelo e pode ser modificado de diferentes formas, pela ação da força de deriva. a. Representação esquemática do Modelo 1. Neste modelo TP é mantido fixo e o espaço unidimensional é limitado pelos dois limites móveis B1 e B2, que simultaneamente diminuem ou expandem o espaço acessível para *x*. b. Ilustração esquemática do Modelo 2. A posição do TP pode ser diferente de zero (permitindo que o espaço conformacional do estado aberto e fechado siferentes, o que não ocorre no modelo 1, e os limites B1 e B2 são mantidos constantes.

O modelo de Wawrzkiewicz et al. (2012) pertence à classe de modelos de difusão. Ele assume que a dinâmica conformacional da ativação do *gate* é semelhante um passeio aleatório discreto realizado pela coordenada de reação x(t) em um espaço conformacional unidimensional. A posição da coordenada da reação simula o ângulo

de abertura real do nanoporo do canal iônico, que é influenciado por flutuações na espessura da bicamada lipídica.

O espaço unidimensional é dividido em dois macroestados, fechado e aberto, delimitados por dois limites,  $B_{MAX}$  e  $B_{MIN}$ . É composto por uma rede com N-unidades, cada um representando um subestado, com cada subestado relacionado a um valor de energia potencial. No modelo 1, x(t) realiza o passeio aleatório no espaço conformacional delimitado pelos extremos,  $B_{MAX}$  e  $B_{MIN}$ , onde a quantidade total de subestados presentes em todo o espaço conformacional é igual a 2  $B_{MAX}$ . No entanto, x(t) só caminha dentro dos limites difusionais, B1 e B2, que se movem de forma aleatória e síncrona em relação a TP, que é sempre mantido em uma posição central em relação a B1 e B2 no espaço unidimensional. T

TP é a posição que determina o limiar entre os estados aberto e fechado, e está relacionada a um maior valor do potencial energético. Quando x(t) está à esquerda de TP (valores negativos), o canal está fechado, quando está à direita de TP (valores positivos), o canal está aberto. Os tempos de residência x(t) em cada um desses estados geram uma série simulada de tempos de permanência nos diferentes estados de condutância do canal, que pode ser analisada pela mesma metodologia utilizada na análise das séries obtidas experimentalmente. A simulação é executada quantas vezes forem necessárias para produzir a série temporal com o tamanho de amostra desejado.

A mudança entre os macroestados é realizada por x(t) em um processo de difusão entre os microestados adjacentes através de um simples passeio aleatório. Durante o esse passeio, a probabilidade de x(t) se mover um para a direita (p) e para a esquerda (q) é:

$$p = \frac{1}{2} - \frac{\Delta U}{4kT}$$
 and  $q = \frac{1}{2} + \frac{\Delta U}{4kT}$ , (21)

onde  $\Delta U$  é a variação de energia potencial da posição atual de x(t), k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta.

Antes do início da simulação, determina-se a posição inicial das variáveis B1, B2 e x(t), e TP igual a zero, sendo um ponto central entre B1 e B2. A variável x(t)caminha aleatoriamente de entre os subestados do espaço unidimensional, variando uma unidade por vez. Nesse modelo computacional, também é necessário estabelecer valores iniciais ótimos para as variáveis do sistema, a partir das quais os dados são obtidos. A definição dessas variáveis ocorre através da Técnica de 95 Otimização de Gradiente, que analisa os erros dos dados obtidos para diferentes valores das variáveis, buscando encontrar uma combinação de variáveis ótimas onde o erro entre os dados experimentais e simulados seja mínimo.

No modelo 1, a propriedade de memória de longo alcance é introduzida na cinética dos canais iônicos através das flutuações sincronizadas das variáveis móveis  $B1 \ e B2$ , diminuindo ou aumentando o número de subestados dentro do espaço conformacional. O movimento de  $B1 \ e B2$  está relacionado a flutuações térmicas na espessura da bicamada lipídica e as forças no interior da proteína, que reduzem as possibilidades de conformação dos estados fechado e aberto.  $B1 \ e B2$  mudam a posição após n transições de x(t) e os n valores são determinados pela seguinte equação que emerge da adaptação aos dados experimentais:

$$D_B = \frac{D_{RC}}{600} , (22)$$

onde  $D_B$  é o coeficiente de difusão de dos limites conformacionais do espaço unidimencional, e  $D_{RC}$  denota o coeficiente de difusão da coordenada de reação.

No modelo 1, as mudanças na espessura da membrana, compressão e relaxamento, atuam nos limites do espaço conformacional do *gate*. Essas variações modifica a densidade de cargas dentro da região da *gate* e, portanto, os átomos têm menos espaço para realizar as mudanças conformacionais necessárias para alternar entre os diferentes estados de condutância. Portanto, o número de subestados dentro dos estados aberto e fechado varia ao longo do tempo.

A compressão da membrana aproxima os limites *B*1 e *B*2 de TP, o que aumenta a probabilidade de troca entre aberto e fechado, e o relaxamento promove o contrário. Portanto, o comportamento determinístico do processo cinético pode ser uma consequência das flutuações sincronizadas dos limites do espaço conformacional do *gate* de ativação.

No modelo 2, por outro lado, o comportamento determinístico introduzido na cinética do canal através de mudanças nas flutuações da densidade da proteína do canal, resulta essencialmente de tensões internas da proteína do canal tendendo a levar a coordenada de reação para locais distantes. Isso acontece devido a presença de uma força de deriva síncrona atuando em x(t), produzindo mudanças sincronizadas na energia dos estados conformacionais da proteína. A relaxação da membrana promove a ocupação de x(t) em subestados próximos ao limiar entre os estados aberto e fechado, aumentando a probabilidade de transição entre os estados.

Por outro lado, a compressão da membrana promove a ocupação de x(t) em subestados próximos aos limites conformacionais, *B*1 e *B*2, aumentando a probabilidade de permanência no estado atual.

A diferença entre os modelos 1 e 2 está na ação oposta da flutuação da espessura da bicamada lipídica sobre a cinética dos canais iônicos. A compressão da membrana promove tempos de permanência mais curtos no modelo 1 e tempos de permanência mais longos no modelo 2. Ambos os modelos podem reproduzir um processo dicotômico presente na cinética dos canais, reproduzindo os valores da corrente iônica ao longo do tempo, transitando entre duas populações de valores de corrente.

Nos resultados das simulações com os modelos 1 e 2, as séries temporais dos tempos de permanência dos estados aberto e fechado apresentam correlação de longo alcance, como a encontrada em dados experimentais de canais BK. No entanto, a distribuição dos tempos de permanência fechados obtidos na análise dos dados simulados pelo modelo 2 não segue uma lei de potência, mas sim uma distribuição exponencial, o que não está de acordo com os dados experimentais.

Miśkiewicz et al. (2020) demonstraram que este modelo poderia simular o processo cinético e a presença de memória de longo prazo não apenas para canais BK. Utilizaram o modelo 1 de Wawrzkiewicz et al. (2012) para simular o sinal de corrente dos canais catiônicos não seletivos de ativação lenta (SV) da membrana vacuolar de *Beta vulgaris*. A reconstrução do processo cinético desses canais com este modelo foi capaz de gerar dados semelhantes aos resultados experimentais com memória longa.

## 7 Origem da Memória

De acordo com Manna et al. (2007), os domínios de *gate* nos canais iônicos são distribuídos por uma grande parte da proteína. Eles são capazes de detectar variações nos potenciais transmembrana que servem de estímulo para a troca entre os diferentes estados conformacionais dos canais. Esse mecanismo de controle do canal iônico requer o movimento de uma grande fração da massa proteica através da bicamada lipídica, que ocorre em resposta a uma voltagem específica. Se a energia deste processo ultrapassar a barreira de energia, o canal iônico alterna entre dois estados conformacionais. Várias forças influenciam o movimento de apenas um

sensor de voltagem: uma força restauradora, devido à propriedade elástica da molécula de proteína; uma força de amortecimento, resultante da viscosidade do ambiente em que o sensor está localizado; e uma força motriz eletrostática, devido às interações entre o sensor e o ambiente. Quando as regiões dos sensores de voltagem começam a se mover a partir da sua conformação inicial, elas experimentam um desequilíbrio na força eletrostática devido às suas interações mútuas. Assim, dependendo das condições iniciais de conformação do sensor de voltagem, flutuações de diferentes amplitudes ocorrem nas regiões dos sensores.

O processo acima pode ser entendido como um oscilador forçado e o movimento de um conjunto de sensores pode ser entendido como osciladores acoplados (Manna et al. 2007). Esses osciladores são gerados energeticamente por duas ou mais forças motrizes presentes no sistema, no ambiente ou em ambos. O comportamento do mecanismo de *gating* funcionando como osciladores acoplados pode gerar a correlação de longo prazo (memória) presente na cinética dos canais iônicos.

É importante ressaltar que as interações entre os sensores de voltagem são independentes da presença ou ausência de um campo elétrico externo. Desta maneira, mesmo em um potencial constante (ou zero) aplicado à membrana, os sensores de voltagem (carga do *gate*) interagem entre si e com o entorno, permitindo o acoplamento. Assim, a correlação de longo alcance é esperada mesmo em tensões constantes ou zero.

Já para Wawrzkiewicz et al. (2012), a origem da memória pode ser atribuída a forças, geradas por flutuações na espessura da membrana lipídica, que atuam sobre a proteína formadora de canais. Wawrzkiewicz e colaboradosres relacionam a presença de memória de longo alcance na cinética dos canais iônicos à ação combinada da bicamada lipídica e da proteína formadora de canais. A ação da bicamada lipídica poderia introduzir a propriedade de memória através de flutuações locais na espessura da membrana que circundam o canal.

Esses autores afirmam que flutuações locais na espessura da membrana que circundam o canal podem modificar a densidade de átomos no domínio de *gate* do canal iônico. Esses autores desenvolveram dois modelos matemáticos e simularam a cinética dos canais iônicos. Nas simulações, as flutuações locais na espessura da membrana podem ser adicionadas no sistema de duas maneiras: através de flutuações síncronas nos limites do espaço conformacional em que uma coordenada de reação descreve um passeio aleatório (tal coordenada é vista como uma variável abstrata), mas que pode estar relacionado ao ângulo de abertura do anel de glicina presente na região da *gate* do canal; ou através de mudanças sincronizadas na estrutura de energia dos estados aberto e fechado. Este modelo foi capaz de reproduzir a propriedade de memória de longo prazo em simulações de canais iônicos do tipo BK de forma semelhante aos resultados experimentais.

Para De La Fuente e colaboradores (2017), a memória de longo alcance encontrada no comportamento cinético dos canais de cloreto ativados por cálcio a memória longa está relacionada a dinâmica da memória metabólica descrita na Teoria da Estrutura Metabólica Celular (CMS) proposta por De La Fuente (2015). De acordo com essa teoria, as células podem processar informações e armazenar memória metabólica. O CMS propõe dois mecanismos para armazenar padrões catalíticos: o primeiro ocorre regulando as atividades enzimáticas pela dinâmica de atratores do tipo Hopfield. Esses atratores armazenam padrões que podem ser recuperados por um estímulo específico; o segundo mecanismo ocorreria através de modificações covalentes pós-traducionais das proteínas, e assim a memória funcional pode ser adicionada reversivelmente através de marcas moleculares estáveis. De acordo com De La Fuente et al. (2013), a propriedade da memória é um requisito fundamental para o processamento eficiente da informação. Eles acreditam que a informação molecular pode ser armazenada e recuperada corretamente por estímulos específicos.

## 8 Conclusões

Compreender o comportamento dos canais iônicos é particularmente importante, pois eles estão envolvidos em diversos processos vitais e são responsáveis pelo surgimento de inúmeras doenças. No entanto, seu funcionamento ainda não é totalmente compreendido, embora metodologias recentes tenham sido aplicadas no estudo da cinética de canais iônicos, como a aquisição simultânea de condutância de canal unitário e fluorescência resultantes de mudanças conformacionais moleculares. No entanto, alguns mecanismos biofísicos operam em uma escala de tempo ainda indetectável pelas metodologias atuais. Assim, o estudo dessas propriedades por meio de modelagem computacional, simulações e aplicação de métodos matemáticos desempenha um importante papel auxiliando numa maior compreensão dos resultados dos estudos experimentais e tem gerado grande parte da compreensão atual dos mecanismos e das bases biofísicas por trás desses processos.

No entanto, é preciso ter em mente que a modelagem e as simulações devem considerar os resultados de estudos experimentais. Muitos pesquisadores já demonstraram que o comportamento cinético de diversos tipos de canais iônicos não é aleatório, mas sim, regido por leis específicas, com um comportamento determinístico apresentando a propriedade de memória de longo alcance ao longo do tempo. O uso de modelos e simulações para o estudo tanto de proteínas formadoras de canais iônicos, quanto dos processos fisiológicos nos quais estes canais estão envolvidos, deve levar em conta esta propriedade e ser capaz de incorporá-la para descrever dados experimentais.

**Agradecimentos** Agradecemos ao Dr. Edbhergue Ventura Lola Costa pela revisão crítica do manuscrito. Os autores agradecem ao Departamento de Morfologia e Fisiologia da UFRPE, ao Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA), do Laboratório de Análise Computacional de Realidades Complexas do Centro de Apoio à Pesquisa – UFRPE (CENAPESQ) e do Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-Tronco Oleg Krasilnikov do Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE pelo suporte técnico.

**Financiamento** Este estudo foi financiado pela agência brasileira de apoio Coordenação para o Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

# Referencias

- Aguiar LAA, Silva IMS, Fernandes TS, Nogueira RA (2015) Long-term correlation of the electrocorticogram as a bioindicator of brain exposure to ionizing radiation. Braz J Med Biol Res 00-00. http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20154473
- Arias-Calluari K, Najafi M, Harré MS, Alonso-Marroquin F (2019) Stationarity of the detrended time series of S&P500. arXiv preprint arXiv:1910.01034.
- Astashev ME, Kazachenko VN, Grigoriev PA (2007) Alamethicin channel kinetics: Studies using fluctuation analysis and multifractal fluctuation analysis. Biochem Moscow Suppl Ser A 1(3):246-252. https://doi.org/10.1134/S1990747807030087
- Baillie RT (1996) Long memory processes and fractional integration in econometrics. Journal of Econometrics 73(1):5-59. https://doi.org/10.1016/0304-4076(95)01732-1

- Bahramian A, Nouri A, Baghdadi G, Gharibzadeh S, Towhidkhah, F, Jafari S (2019) Introducing a chaotic map with a wide range of long-term memory as a model of patch-clamped ion channels current time series. Chaos, Solitons & Fractals 126:361-368. https://doi.org/10.1016/j.chaos.2019.07.018
- Bak P, Tang C, Wiesenfeld K (1988) Self-organized criticality. Physical Review A 38(1):364.
- Bandeira HT, Barbosa CT, Oliveira RC, Aguiar JF, Nogueira RA (2008) Chaotic model and memory in single calcium-activated potassium channel kinetics. Chaos 18(3):033136-033136-6. https://doi.org/10.1063/1.2944980
- Bassil G, Zarzoso M, Noujaim SF (2017) Allometric scaling of electrical excitation and propagation in the mammalian heart. Journal of theoretical biology 419:238-242. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.09.024
- Beran J, Feng Y, Ghosh S, Kulik R (2013) Definition of long memory. In: Beran J, Feng Y, Ghosh S, Kulik R (ed) Long-Memory Processes, Springer, Berlin, Heidelberg, 209-384
- Borys P (2020) Long term Hurst memory that does not die at long observation times— Deterministic map to describe ion channel activity. Chaos, Solitons & Fractals 132: 109560. https://doi.org/10.1016/j.chaos.2019.109560
- Brazhe, A. R., & Maksimov, G. V. (2006). 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 16(3), 033129. https://doi.org/10.1063/1.2355657
- Busha BF, Banis GA (2017) Stochastic and integrative model of breathing. Respiratory Physiology & Neurobiology 237:51-56. https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.12.012
- Castro CROB, Moraes Rb, Silva JRF et al (2014) Detrended Fluctuation Analysis applied to ECG in dogs subjected to physical effort. Exp Clin Cardiol 20(9):5068-5073. https://doi.org/10.16887/87.a1.51
- Chen XJ, Luo CH, Chen MH, Zhou X (2019) Combination of "quadratic adaptive algorithm" and "hybrid operator splitting" or uniformization algorithms for stability against acceleration in the Markov model of sodium ion channels in the ventricular cell model. Med Biol Eng Comput 57(6):1367-1379. https://doi.org/10.1007/s11517-019-01956-5
- D, Hawkes AG (1977) Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. *Proc R Soc Lond B 199*(1135):231-262. https://doi.org/10.1098/rspb.1977.0137
- Colquhoun D, Hawkes AG (1981) On the stochastic properties of single ion channels. Proc R Soc Lond B 211(1183):205-235. https://doi.org/10.1098/rspb.1981.0003
- Colquhoun D, Hawkes AG (1994) The interpretation of single channel recordings. In: Ogden DC (ed) Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook, 2nd edn. The Company of Biologists Ltd., Cambridge, pp 141-188.
- De La Fuente IM (2015) Elements of the cellular metabolic structure. Front Mol Biosci 2:16. https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00016
- De La Fuente IM, Cortes JM, Pelta DA, Veguillas J (2013) Attractor Metabolic Networks. Plos One 8(3):e58284. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058284
- De La Fuente IM, Malaina I, Pérez-Samartín A et al (2017) Dynamic properties of calcium-activated chloride currents in *Xenopus laevis* oocytes. Scientific Reports 7:41791. https://doi.org/10.1038/srep41791
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds) (2000). Principles of neural science, 2nd edn. McGraw-Hill, New York

- Djawad YA, Attwood D, Kiely J, Luxton R (2019) The application of detrended fluctuation analysis to assess physical characteristics of the human cell line ECV304 following toxic challenges. Sensing and Bio-Sensing Research 23(2019):100269. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2019.100269
- Dreyer I, Müller-Röber B, Köhler B (2004) Voltage-gated ion channels. In: Zheng J, Trudeau MC (ed), Annual Plant Reviews, CRC Press 15:169-215 https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0146
- Fermini B (2008) Recent Advances in Ion Channel Screening Technologies. In: Fermini B, Priest BT (Org.) Ion Channel: Top Med Chem, Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1-25. https://doi.org/10.1007/7355\_2008\_024
- Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Brugada J, Brugada R, Campuzano O (2017) Cardiac channelopathies and sudden death: recent clinical and genetic advances. Biology 6(1):7. https://doi.org/10.3390/biology6010007
- Freer S, Simmons S, Laucht A, Muhonen JT, Dehollain JP, Kalra R, ..., Jamieson DN (2017) A single-atom quantum memory in silicon. Quantum Science and Technology 2(1):015009. https://doi.org/10.1088/2058-9565/aa63a4
- Fuliński A, Grzywna Z, Mellor I, Siwy Z, Usherwood PNR (1998) Non-Markovian character of ionic current fluctuations in membrane channels. Physical Review E *58*(1): 919-924. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.58.919
- Furutani K, Docken S, Vorobyov IV et al (2019) A Kinetic Mechanism Underlying hERG Facilitation by a Blocker. Biophys J 116(3):245a. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.1343
- Gallistel CR, King AP (2009) Memory and the computational brain: Why cognitive science will transform neuroscience. Wiley-Blackwell, New York
- Giraitis L, Kokoszka P, Leipus R, Teyssière G (2003). Rescaled variance and related tests for long memory in volatility and levels. Journal of econometrics, *112*(2): 265-294.
- Grandi E, Puglisi JL, Wagner S, Maier LS, Severi S, Bers, DM (2007) Simulation of Ca-calmodulin-dependent protein kinase II on rabbit ventricular myocyte ion currents and action potentials. Biophys J *93*(11):3835-3847
- Gupta V, Mittal M, Mittal V (2020) Chaos Theory: An Emerging Tool for Arrhythmia Detection. Sensing and Imaging 21(1):1-22. https://doi.org/10.1007/s11220-020-0272-9
- Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd edn. Sinauer, Sunderland
- Hu K, Ivanov PC, Chen Z, Carpena P, Stanley HE (2001) Effect of trends on detrended fluctuation analysis. Phys Rev E 64(1):011114-1-011114-19. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.64.011114
- Hudetz AG, Liu X, Pillay S, Boly M, Tononi G (2016) Propofol anesthesia reduces Lempel-Ziv complexity of spontaneous brain activity in rats. Neurosci lett 628:132-135. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.017
- Hughes TA, Lee J (2015) A New Test for Short Memory in Long Memory Time Series. Am Stat 69(3):182-190. https://doi.org/10.1080/00031305.2015.1056829
- Hunt NH (2016) Autocorrelation function, mutual information, and correlation dimension. In: Stergiou N (ed), Nonlinear analysis for human movement variability, FL: CRC Press, Boca Raton, pp 301-342
- Hurst H (1951) Long term storage capacity of reservoirs. Trans Amer Soc Civil Eng 6:770–799
- Hutchings CJ, Colussi P, Clark TG (2019) Ion channels as therapeutic antibody targets. In: MAbs, 11(2):265-296. https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1548232

Juayerk-Herrera KL, Félix-Martínez GJ, Picones, A, Del-Río-Correa JL, and Godínez-Fernández JR (2020) Deterministic modeling of single-channel and whole-cell currents. Journal of Theoretical Biology 508:110459. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2020.110459

- Kantelhardt JW, Koscielny-Bunde E, Rego HH, Havlin S, Bunde A (2001) Detecting long-range correlations with detrended fluctuation analysis. Physica A 295(3-4):441-454
- Kantelhardt JW, Zschiegner SA, Koscielny-Bunde E, Havlin S, Bunde A, Stanley HE (2002) Multifractal detrended fluctuation analysis of nonstationary time series. Physica A 316(1-4):87-114. https://doi.org/10.1016/S0378-4371(02)01383-3
- Kazachenko VN, Kochetkov KV, Astashev ME, Grinevich AA (2004) Fractal properies of gating in potential-dependent K<sup>+</sup>-channels in Lymnaea stagnalis neurons. Biofizika 49(5):852-865.
- Kim J-B (2014) Channelopathies. Korean J Pediatr 57(1):1-18. https://doi.org/10.3345/kjp.2014.57.1.1
- Kim J, Shah D, Potapov I, Latukka J, Aalto-Setälä K, Räsänen E (2019) Scaling and correlation properties of RR and QT intervals at the cellular level. Sci Rep 9(1):1-9. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40247-9
- Kline J, Costantini O (2019) Inherited Cardiac Arrhythmias and Channelopathies. Med Clin 103(5):809-820. https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.05.001
- Kochetkov KV, Kazachenko VN, Aslanidi OV, Chemeris NK, Gapeyev AB (1999) Nonmarkovian gating of Ca 2<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cultured kidney cells Vero. Rescaled range analysis. J Biol Phys 25(2-3):211-222. https://doi.org/10.1023/A:1005167101298
- Kuzmenkin A, Hang C, Kuzmenkina E, Jurkat-Rott K (2007) Gating of the HypoPP-1 mutations: I. Mutant-specific effects and cooperativity. Pflügers Arch-Eur J Physiol 454(3):495-505. https://doi.org/10.1007/s00424-007-0225-3
- Lan TH, Xu BQ, Yuan HJ, Lin JR (2003) Rescaled range analysis applied to the study delayed rectifier potassium channel kinetics. Biophys Chem 106(1):67-74. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00174-1
- Lan TH, Gao ZY, Abdalla AN, Cheng B, Wang S (2008) Detrended fluctuation analysis as a statistical method to study ion single channel signal. Cell Biol Int 32(2):247-252. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.09.001
- Lea, P. V. (2018). U.S. Patent No. 9,996,479. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Lendlein A, Kelch S (2002) Shape-memory polymers. Angew Chem Int 41(12):2034-2057. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020617)41:12<2034::AID-ANIE2034>3.0.CO;2-M
- Li W, Kaneko K (1992) Long-range correlation and partial 1/fα spectrum in a noncoding DNA sequence. Europhys Lett 17(7):655. https://doi.org/10.1209/0295-5075/17/7/014
- Liebovitch LS, Fischbarg J, Koniarek JP (1987) Ion channel kinetics: a model based on fractal scaling rather than multistate Markov processes. Math Biosci 84(1):37-68. https://doi.org/10.1016/0025-5564(87)90042-3
- Liebovitch LS, Toth TI (1991) A model of ion channel kinetics using deterministic chaotic rather than stochastic processes. J Theor Biol 148(2):243-267. https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80343-1
- Lipscombe D, Wyllie DJA (2018) Editorial Overview: Ion Channels (2018).

- Liu W, Caffrey M (2005) Gramicidin structure and disposition in highly curved membranes. Journal of Structural Biology 150(1):23-40. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.12.007
- Makowiec D, Fuliński A (2010) Multifractal detrended fluctuation analysis as the estimator of long-range dependence. Acta Physica Polonica B 41(5): 1025-1050.
- Manna S, Banerjee J, Ghosh S (2007) Breathing of voltage dependent anion channel as revealed by the fractal property of its gating. Physica A 386(1):573-580. https://doi.org/10.1016/j.physa.2007.06.049
- Mandelbrot BB, Wallis JR (1969) Robustness of the rescaled range R/S in the measurement of noncyclic long run statistical dependence. Water Resources Research, 5(5):967-988. https://doi.org/10.1029/WR005i005p00967
- Mandelbrot BB, Wallis JR (1969b) Some long-run properties of geophysical records. Water resources research 5(2):321-340. https://doi.org/10.1029/WR005i002p00321
- Mandelbrot BB, Van Ness JW (1968) Fractional Brownian motions, fractional noises and applications. SIAM Review 10(4):422-437. https://doi.org/10.1137/1010093
- Mandelbrot BB, Wallis JR (1968) Noah, Joseph, and operational hydrology. Water resources research 4(5):909-918. https://doi.org/10.1029/WR004i005p00909
- Matos JA, Gama SM, Ruskin HJ, Al Sharkasi A, Crane M (2008) Time and scale Hurst exponent analysis for financial markets. Physica A 387(15):3910-3915. https://doi.org/10.1016/j.physa.2008.01.060
- Mercik S, Weron K (2001) Stochastic origins of the long-range correlations of ionic current fluctuations in membrane channels. Phys Rev E 63(5):051910-1-051910-10. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.63.051910
- Mercik S, Weron K, Siwy Z (1999) Statistical analysis of ionic current fluctuations in membrane channels. Phys Rev E 60(6):7343-7348. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.60.7343
- Miśkiewicz J, Trela Z, Burdach Z, Karcz W, Balińska-Miśkiewicz W (2020) Long range correlations of the ion current in SV channels. Met3PbCl influence study. Plos One 15(3):e0229433. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229433
- Morettin PA, Toloi CMC (2004) Análise de Séries Temporais. Edgard Blücher LTDA, São Paulo
- Nascimento RS, Araujo LHG, Moraes RB, Barbosa CT, Guedes RC, Nogueira RA, Stošić T (2010) Analysis of signal fluctuations of Cortical Spreading Depression: Preliminary findings. Physica A 389(9):869-1873. https://doi.org/10.1016/j.physa.2010.01.010
- Neher É, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature 260(5554):799-802. https://doi.org/10.1038/260799a0
- Nogueira RA, Varanda WA, Liebovitch LS (1995) Hurst analysis in the study of ion channel kinetics. Braz J Med Biol Res 28(4):491-496
- Oliveira RC, Barbosa CTF, Consoni LHA, Rodrigues ARA, Varanda WA, Nogueira RA (2006) Long-term correlation in single calcium-activated potassium channel kinetics. Physica A 364:13-22. https://doi.org/10.1016/j.physa.2005.08.057
- Peng CK, Buldyrev SV, Havlin S, Simons M, Stanley HE, Goldberger AL (1994) Mosaic organization of DNA nucleotides. Phys Rev E 49(2):1685. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.49.1685
- Peng CK, Havlin S, Stanley HE, Goldberger AL (1995) Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in non-stationary heartbeat time series. Chaos 5(1):82-87. https://doi.org/10.1063/1.166141

- Peng ZY, Lan TH, Yang L, Mei HC, Ping JH, Jie XY, Lin CX (2012) Existence of memory in membrane channels: analysis of ion current through a voltagedependent potassium single channel. Cell Biol Int 36(11):973-979. https://doi.org/10.1042/CBI20110673
- Pradeu T, Du Pasquier L (2018) Immunological memory: What's in a name? Immunol Rev 283(1):7-20. https://doi.org/10.1111/imr.12652
- Rickles D, Hawe P, Shiell A (2007) A simple guide to chaos and complexity. J of Epidemiol Commun H 61(11):933-937. http://dx.doi.org/10.1136/iech.2006.054254
- Sampson KJ, Iyer V, Marks AR, Kass RS (2010) A computational model of Purkinje fibre single cell electrophysiology: implications for the long QT syndrome. J Physiol 588(14):2643-2655. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187328
- Sansom MS, Ball FG, Kerry CJ, McGee R, Ramsey RL, Usherwood PN (1989) Markov, fractal, diffusion, and related models of ion channel gating. A comparison with experimental data from two ion channels. Biophys J 56(6):1229-1243. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82770-5
- Santos R, Ursu O, Gaulton A et al (2017) A comprehensive map of molecular drug targets. Nat Rev Drug Discov 16(1):19. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230
- Schmandt NT, Galán RF (2012) Stochastic-shielding approximation of Markov chains and its application to efficiently simulate random ion-channel gating. Phys Rev Lett 109(11):118101-1-118101-5.

ttps://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.118101

- Siwy Z, Ausloos M, and Ivanova K (2002) Correlation studies of open and closed state fluctuations in an ion channel: Analysis of ion current through a largeconductance locust potassium channel. Physical Review E 65(3):031907. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.65.031907
- Siwy Z, Mercik S, Weron K, Ausloos M (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(1-2):79-96. https://doi.org/10.1016/S0378-4371(01)00194-7
- Stanley HE, Amaral LN, Goldberger A L, Havlin S, Ivanov PC, Peng CK (1999) Statistical physics and physiology: monofractal and multifractal approaches. Physica A 270(1-2):309-324. https://doi.org/10.1016/S0378-4371(99)00230-7
- Szasz O, Vincze G, Szigeti GP, Benyo Z, Szasz A (2018) An allometric approach of tumor-angiogenesis. Med Hypotheses 116:74-78.

https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.03.015

- Varanda WA, Liebovitch LS, Figueiroa JN, Nogueira RA (2000) Hurst analysis applied to the study of single calcium-activated potassium channel kinetics. J Theor Biol 206(3):343-353. https://doi.org/10.1006/jtbi.2000.2131
- Wawrzkiewicz A, Pawelek K, Borys P, Dworakowska B, Grzywna ZJ (2012) On the simple random-walk models of ion-channel gate dynamics reflecting long-term memory. Eur Biophys J, 41(6):505-526. DOI: 10.1007/s00249-012-0806-8
- Wawrzkiewicz-Jałowiecka A, Trybek P, Machura Ł, Dworakowska B, Grzywna ZJ (2018) Mechanosensitivity of the BK Channels in Human Glioblastoma Cells: Kinetics and Dynamical Complexity. J Membr Biol 251(5-6):667-679. https://doi.org/10.1007/s00232-018-0044-9
- Wawrzkiewicz-Jałowiecka A, Trybek P, Borys P, Dworakowska B, Machura Ł, Bednarczyk P (2020b) Differences in Gating Dynamics of BK Channels in Cellular and Mitochondrial Membranes from Human Glioblastoma Cells Unraveled by

Short-and Long-Range Correlations Analysis. Cells 9(10):2305. https://doi.org/10.3390/cells9102305

Wawrzkiewicz-Jałowiecka A, Trybek P, Dworakowska B, Machura, Ł (2020a) Multifractal Properties of BK Channel Currents in Human Glioblastoma Cells. The Journal of Physical Chemistry B 124(12):2382-2391. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c00397

Capítulo 02: Versão em português do manuscrito submetido a revista Acta Biotheoretica:

Análise de memória de longo alcance em canais iônicos formados por αhemolisina *Staphylococcus aureus*
# Análise de memória de longo alcance em canais iônicos formados por α-hemolisina *Staphylococcus aureus*

Silva, M. P<sup>1</sup>; Rodrigues<sup>2</sup>, C.G., Nogueira, R.A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de

Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife,

Pernambuco, Brasil

\*Autor correspondente: nogromildo@gmail.com

## Resumo

Os canais iônicos são estruturas proteicas presentes nas membranas celulares que permitem o fluxo iônico entre os ambientes intra e extracelular, bem como entre as organelas e o citoplasma. Tal fluxo é controlado pelo processo de abertura e fechamento do poro do canal, chamado de cinética do canal iônico. A cinética dos canais iônicos tem sido entendia como um processo aleatório. No entanto, estudos mostraram que em vários canais esse processo é na verdade um fenômeno determinístico, apresentando a propriedade de memória longa. A α-hemolisina de Staphylococcus aureus, α-HL, é uma toxina que atua como um dos principais fatores de virulência de Staphylococcus aureus. Esta toxina modifica a homeostase celular, o que pode levar à lise celular. O α-HL é um peptídeo hidrofílico capaz de se inserir em bicamadas lipídicas formando canais iônicos. Agui, o α-HL foi usado como modelo experimental para estudar a memória. Dois métodos matemáticos foram utilizados para estudar o comportamento cinético deste canal, a Entropia Aproximada para analisar a aleatoriedade da cinética destes canais iônicos e a Análise de Flutuação Destendenciada, para investigar a existência de memória longa na cinética dos canais α-HL. As correntes de canal unitário foram medidas através de experimentos com canais α-HL incorporados em bicamadas lipídicas de difitanoilfosfatidilcolina construídas por aposição de monocamada de duas lipídios a um orifício de uma partição que separa dois compartimentos aquosos. Todos os experimentos foram realizados nas seguintes condições: solução tamponada de NaCl 1M, pH 4,5; potencial transmembranar de +40 mV e temperatura 25±1°C. As correntes iônicas foram registradas em tempo real na memória de um microcomputador acoplado a um conversor A/D e um amplificador patch-clamp. O valor de condutância dos canais a-HL foi de 0,82 ± 0,0025 nS (n=128). Nossos resultados mostraram que a cinética dos canais  $\alpha$ -HL é um processo determinístico, com memória longa ( $DFA_{\alpha}$ = 0,63 ± 0,04). Quando as séries de tempo de permanência foram randomizadas, o expoente médio de DFA foi de 0,51 (±0,03), comprovando que a presença de memória longa é uma característica do processo cinético dos canais e não um artefato da série numérica. Os resultados obtidos, através do método da entropia aproximada, para tempo de permanência aberto (ApEnA = 0,55142  $\pm$  0,28) e fechado (ApEnF = 0,114472  $\pm$ 0,082541) corroboram os resultados do método DFA, eles revelam que há complexidade no tempo de abertura e fechamento série de tempos. Além disso, as séries temporais de permanência aberta e fechada tendem a aumentar sua entropia aproximada após a randomização dos dados, o que demonstra que o comportamento da série apresenta uma repetição de padrões ao longo do tempo, sendo um indicativo da presença de uma dinâmica determinística. Nossos resultados demonstram que mesmo canais iônicos simples que não são formados por grandes domínios de proteínas e não possuem domínios de porta podem apresentar um comportamento determinístico.

**Palavras-chave:** Correlação de Longo Alcance; Análise de Flutuação Destendenciada; Entropia Aproximada, α-hemolisina; Canais Iônicos.

## Introdução

## 1.1 Cinética dos canais iônicos

Os canais iônicos são proteínas transmembranares que permitem o fluxo iônico através das membranas celulares e membranas das organelas. Este fluxo iônico é crucial para manutenção da vida, estando envolvido em vários processos celulares e fisiológicos. Eles participam da geração de potenciais de ação, contração muscular, transmissão de impulsos nervosos, batimentos cardíacos, secreção e controle do volume celular, entre muitos outros processos (Hille 2001; Fermini 2008; Lipscombe, Wyllie 2018). O fluxo iônico através desses canais é determinado pelo gradiente eletroquímico de íons entre os ambientes intracelular e extracelular (Petkov 2009; Roux 2017).

As proteínas formadoras de canais iônicos permitem a passagem de íons através de um poro hidrofílico central por meio de mudanças conformacionais, que geram transições entre diferentes estados abertos para fechados em uma escala de tempo rápida, com um fluxo de 10<sup>8</sup> íons/segundo. Essas mudanças conformacionais, as quais possibilitam que o canal ora permita, ora bloqueie a passagem de íons, são chamadas de cinética do canal iônico (Hille 2001; Bagal et al. 2013; Sychev e Ivanov 2014). A energia usada para transições entre diferentes estados conformacionais é derivada de flutuações térmicas no ambiente ao redor do canal e de estímulos endógenos ou exógenos (Liebovitch, Fischbarg e Koniarek 1987).

A abertura e o fechamento dos canais são realizados através de um mecanismo de *gating*. Este mecanismo pode ser realizado por alguns canais através do filtro de seletividade, porém, em geral, os canais iônicos possuem uma região especializada que desempenha esse papel, o domínio poro-*gate* (Roux 2017). Tais mudanças conformacionais são moduladas por ligantes, variação de voltagem, variação de pH,

entre outros fatores (Moran et al. 2015; Boscardin et al. 2016; Alexander et al. 2017), e assim esses canais podem abrir por um breve momento e fechar novamente (Yellen 2002). Segundo Hille (2001) a cinética de *gating* pode ser descrita através de um diagrama de estados. O diagrama de estados mais simples transita apenas entre dois estados:

## 

No entanto, os canais biológicos não são tão simples e podem ter vários subestados conformacionais para estados abertos e fechados.

## 1.2 Canal iônico de α-hemolisina de Staphylococcus aureus

A  $\alpha$ -hemolisina de *Staphylococcus aureus* ( $\alpha$ -HL) é um peptídeo hidrofílico capaz de oligomerizar e formar nanoporos heptaméricos (Gouaux et al. 1994; Song et al. 1996; Berube e Wardenburg 2013; Wilson et al. 2019; Divyakolu et al. 2019) às membranas lipídicas de uma célula suscetível, onde se oligomeriza para formar um canal aquoso transmembranar (Bhakdi e Tranun-Jensen 1991; Seilie e Wardenburg 2017).

α-HL é um dos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*, onde a toxina se insere na bicamada lipídica da membrana plasmática e forma poros líticos (Fussle et al. 1981; Krasilnikov, et al. 1988; Thomer et al. 2016); Liu et al. 2020) que permanecem abertos e modificam a homeostase celular (Gouaux et al. 1994; Berube e Wardenburg 2013). Este poro é permeável a diferentes íons monovalentes, como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, assim como ao Ca<sup>2+</sup> (Bhakdi e Tranun-Jensen 1991; Walev et al 1993; Eiffler et al 2016) e também a pequenas moléculas orgânicas (Bhakdi e Tranun-Jensen 1991). Segundo Guros, Balijepalli e Klauda (2018), o canal α-HI pode ser seletivo a cátions ou ânions dependendo da composição da membrana lipídica na qual o canal está inserido. Krasilnikov e Sabiróv (1989) mostraram que alterando o pH altera a seletividade aniônica. Esta seletividade aniônica pode ser atribuída à presença de grupos carregados positivamente dentro do poro do canal (Menestrina 1986).

A estrutura do canal iônico α-HL é composta por três regiões quando está inserida na bicamada lipídica, uma no lado extracelular, o domínio cap, outra na base do

domínio cap, o domínio rim, e a terceira, a região troncular que forma o poro β-barril que perfura a membrana (Song et al. 1996; Divyakolu et al. 2019).

Sob condições específicas, canal iônico α-HL transita entre diferentes estados de condutância. Segundo Kasianowicz e Bezrukov (1995), o canal α-HL é sensível ao pH, de maneira que em pH ácido o canal apresenta uma dinâmica de *gating*, transitando entre os estados abertos e fechados. De acordo com Bezrukov e Kasianowicz (1997), a condutância do canal iônico α-HL também muda sob diferentes pH, onde a diminuição do pH leva ao aumento da condutância. Essas alterações podem ser geradas pelas reações de protonação, onde a flutuação é causada pela modulação da condutância pela ionização reversível de resíduos idênticos N dentro do canal.

De acordo com Bonome et al. (2017), o interior dos poros hidrofílicos desses canais possui diversos resíduos de aminoácidos carregados, expostos em direção ao interior do poro, afetando fortemente os fluxos iônicos. Variações de pH na solução eletrolítica alteram a carga de tais resíduos. Em particular, o interior do poro torna-se cada vez mais carregado positivamente ao diminuir o pH, pois o ácido glutâmico e o ácido aspártico podem ser neutralizados, enquanto a histidina, a lisina e a arginina podem adquirir uma carga positiva. Eles mostraram, por dinâmica molecular, que o interior dos poros fica cada vez mais carregado positivamente ao diminuição do pH induz a protonação de resíduos expostos dentro do poro

## 1.3 Memória Longa

O comportamento cinético do canal iônico foi entendido classicamente como um processo aleatório até as décadas de 1990 (Nogueira et al. 1995). No entanto, hoje já se sabe que esse processo possui uma dinâmica determinística, sendo correlacionado no tempo (Nogueira et al. 1995; Silva et al. 2021). A propriedade de memória de longo alcance, ou memória longa, no comportamento cinético dos canais iônicos pode ser entendida como a capacidade de "lembrar" um padrão de comportamento anterior e de repetir tal padrão no futuro. Isso significa que se o tempo de abertura ou fechamento do canal no instante *t* foi longo, esse comportamento pode se repetir no futuro, o contrário também é verdade, a cinética do canal iônico pode ser entendida como histórico-dependente (Silva et al. 2021).

Canais iônicos complexos presentes tanto na membrana plasmática quanto na bicamada lipídica de algumas organelas, que possuem grandes subunidades proteicas, e a presença de um mecanismo de *gating*, têm sido investigados e tem sido demonstrado que tais canais têm a propriedade de memória em seu comportamento cinético (Nogueira et al. 1995; Varanda et al. 2000; Siwy et al. 2001; Lan et al. 2003; Oliveira et al. 2006; Lan et al. 2008; Wawrzkiewicz et al. 2012; Miskiewicz et al. 2020; Wawrzkiewicz-Jalowiecka et al. 2020a). No entanto, a origem dessa propriedade ainda é controversa; entretanto, alguns autores atribuem a origem da memória como consequência do movimento das regiões proteicas durante as mudanças conformacionais ao abrir e fechar o canal, outros autores atribuem a uma ação de forças inserida nos domínios de *gating* do canal iônico produzidos pelas flutuações na espessura da bicamada lipídica em torno do canal (Manna et al. 2007; Wawrzkiewicz et al. 2012; Borys 2020; Silva et al. 2021).

A detecção da propriedade de memória longa pode ser realizada através de diferentes métodos matemáticos não lineares como análise Hurst R/S, DFA (Dentrended Flutuation Analysis), MD-DFA (Multifratal Dentrended Flutuation Analysis), entre outros (Silva et al. 2021) e a escolha do método depende das propriedades do canal alvo da pesquisa.

Os canais iônicos são estruturas envolvidas em muitos processos relacionados à manutenção da vida (Hille 2001; Petkov 2009). Alterações no funcionamento desses canais podem levar a doenças, chamadas de canalopatias. O estudo dos canais iônicos tem auxiliado na descoberta de fármacos para o tratamento de inúmeras doenças, fármacos utilizados como anestésicos locais, gerais, bem como, na descoberta de fármacos para o tratamento do câncer (Bagal et al. 2013; Alexander et al. 2017; Hutchings et al. 2019; Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. 2020b; Koivisto et al. 2021), bem como na elucidação da gênese de inúmeras doenças decorrentes da disfunção desses canais (Ashcroft 2000). Borys (2020) afirma que se conseguirmos entender a origem da memória longa na cinética dos canais iônicos e qual o seu significado para a fisiologia do organismo vivo, podemos utilizar essa propriedade como alvo para pesquisas de novas drogas.

No presente trabalho investigamos a complexidade e existência de memória longa nas séries temporais dos tempos de permanência nos diferentes estados de condutância dos canais iônicos formados pela α-hemolisina produzida por *Staphylococcus aureus* através do método da Entropia Aproximada e do método DFA.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

A α-hemolisina de *S. aureus* foi adquirida de List Biological Laboratories (Campbell, CA). A difitanoilfosfocolina (DPhPC) foi adquirida da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). O NaCl foi adquirido da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os produtos químicos e solventes eram de grau analítico e foram utilizados como recebidos, sem purificação adicional. A água de alta pureza foi obtida após um tratamento com Milli-Q plus (Billerica, EUA).

## 2.2 Métodos

## 2.2.1 Registros de canais unitários

As bicamadas lipídicas planas livres de solvente (BLPs), foram formadas pela técnica de aposição de monocamada lipídica Montal e Mueller (1972), em um orifício de 60 µm de diâmetro presente em uma partição de Politetrafluoretileno (Teflon®) que separa a câmara de Teflon em dois compartimentos. As BLPs foram formadas por difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC). Cada hemicâmera, denominada *Cis* e *Trans*, continha um volume final de 1,2 ml de solução eletrolítica.

Quando a membrana foi estabilizada, os canais unitários foram formados pela adição de 0,2–0,5 µl da solução contendo  $\alpha$ -HL foi adicionado à solução padrão (1 M NaCl, 2,5 mM Hepes, pH 4,5), no compartimento *Cis* da câmara experimental, para fornecer concentrações finais que formam apenas canal unitário. Todas as experiências foram realizadas a 24 (± 1°C). As correntes iônicas dos canais  $\alpha$ -HL foram obtidas aplicando um potencial transmembranar de 40 mV.

Os experimentos foram realizados utilizando um amplificador patch clamp (Axon Instruments, Foster City, CA) em modo *voltage clamp* conectado a uma câmara de Teflon através de eletrodos Ag/AgCl em pontes salinas Agar-KCl 3M (3% p/v). A saída do amplificador estava conectada a um microcomputador onde foram executados programas computacionais que permitiram a aquisição e monitoramento dos

registradores de corrente. As correntes iônicas foram filtradas por um filtro Bessel passa-baixa Bessel (Modelo 9002, Frequency Devices, Haverhill, MA) a 2 kHz. A frequência de amostragem foi de 100 kHz.

Após a obtenção dos registros das correntes iônicas, os dados foram processados e idealizados no Clampfit (versão 10.5). Para obter a série temporal com os tempos de residência do canal α-HL nos tempos aberto e fechado, utilizamos o método de meia amplitude no software QuB (versão 2.0.0.34). Este método considera eventos abertos apenas aqueles que possuam valores de corrente superiores a 50% do valor total da corrente do canal único, e o inverso para detecção de tempos de permanência em eventos fechados.

2.2.2 Análise de Dados

## Análise de Flutuações Destendenciadas (DFA)

DFA é um método matemático não linear utilizado para detecção de correlações de longo alcance em séries temporais não estacionárias. Ele é capaz de identificar a memória longa nessas séries evitando a detecção de memória de longo alcance espúria quando sua presença é devido a artefatos da não estacionaridade dos dados (Peng et al. 1994).

O método DFA tem sido utilizado em muitas áreas de pesquisa para analisar diferentes fenômenos, como respiração humana, cinética de canais iônicos, dados do mercado de ações, eletrocardiograma e eletrocorticograma a resposta das células a diferentes toxinas (Nascimento et al. 2010; Peng et al. 2012; Castro et al. 2014; Aguiar et al. 2015; Busha e Banis 2017; Arias-Calluari et al. 2019; Djawad et al. 2019; Kim et al. 2019).

Esse método consiste basicamente em analisar as flutuações de uma série integrada de dados após a remoção das tendências, analisando assim a presença ou ausência de um processo de autossimilaridade dentro da série temporal (Stanley et al. 1999; Hu et al. 2001). A remoção das tendências é uma etapa importante que possibilita evitar que qualquer ruído, vindo de fora do sistema, seja analisado juntamente com os dados. Segundo Hu (2001), é comum a presença de tendências em séries temporais geradas por sistemas biológicos ou físicos.

O algoritmo DFA consiste em analisar a série temporal após a remoção da tendência e as etapas da análise DFA consistem primeiramente em obter uma série integrada, y(k) a partir da série temporal original de acordo com a equação abaixo:

$$y(k) = \sum_{i}^{k} [y(i) - \bar{y}],$$
 (1)

where y(i) são os elementos da série original e  $\bar{y}$  é sua média. Em seguida, a série temporal integrada de tamanho N é subdividida em janelas não sobrepostas de comprimento em N/n. A tendência local  $y_n(k)$  para cada janela é obtida através de um ajuste linear através do método do mínimos quadrados. Em seguida, a retirada da tendência dos dados é feita calculando a diferença entre a série integrada y(k) e a tendência local  $y_n(k)$  de cada janela. Após o destendenciamento dos dados, é calculando F(n), a flutuação quadrática média, como segue:

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

O procedimento acima é repetido para diferentes escalas de tempo, ou seja, diferentes valores de *n*, para fornecer uma relação entre F(n) e os diferentes tamanhos de caixa *n*. Em seguida, é gerado um gráfico duplo-log de F(n) versus *n*. O coeficiente de regressão linear do gráfico double-log da função  $F(n) \sim n^a$  é o parâmetro DFA,  $\alpha$ , que indica a presença ou ausência de correlação de longo alcance (memória) na série original.

### Entropia Aproximada

O método de entropia aproximada (ApEn) é tipicamente usado em séries com N entre 75 e 5000 pontos. Como parâmetros de entrada, o algoritmo compara a distância entre subgrupos de dados analisando a similaridade entre eles, desta forma é possível analisar se um processo tem uma dinâmica aleatória ou se tem um comportamento determinístico (Pincus 1994).

Para a análise da entropia aproximada ApEn(i, t, N) de uma dada série temporal de tamanho N, é necessário inicialmente definir dois parâmetros de entrada: valores i e t (Pincus 1994). O parâmetro i é um valor inteiro positivo que estipula o tamanho dos subgrupos de dados para comparação de similaridade e o t é o limite de tolerância para aceitar essa similaridade (Pincus e Goldberger 1994; WU et al. 2016).

A análise de dados usando o ApEn(i, t, N) de uma determinada série temporal  $\{x(n)\}$  de tamanho N consiste em definir inicialmente uma sequência de vetores  $u^1(n), u^2(n), ..., u^{(N-i+1)}(n)$ , onde cada vetor  $u^i(n)=[x(n), x(n+1), ..., x(n+i-1)]$  consiste em valores consecutivos x pertencentes ao sinal e serve como padrão para comparação com os demais vetores da série temporal analisada. Então, a distância máxima  $d[u^i(j), u^i(k)], 1 \le j, k \le N - i + 1$ , entre os componentes escalares que formam os vetores  $^i(j)$  e  $u^i(k)$  é calculado através da equação:

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

A sequência de vetores x(n), x(n+1),...,x(n+i-1) é utilizado para calcular  $C_j^I(t)$ , a propabilidade de K satisfazer a condição de a distância  $d[u^i(j), u^i(k)]$  ser menor que t e é calculada através da equação abaixo:

 $C_I^I(t) = n$ úmero de k que satisfaz d $[u^i(j), u^i(k)] \le t/N - i + 1$ 

O valor de  $C_j^I(t)$  indica a frequência de similaridade entre o vetor  $u^i(k)$ ) de janela de comprimento *i* e um dado padrão  $u^i(j)$  dentro da tolerância limiar *t*.

Após a obtenção dos valores de  $C_J^I(t)$ , a média dos logaritmos naturais de  $C_J^I(t)$ é calculada,  $\phi^i(t)$ :

$$\phi^{i}(t) = \frac{\sum_{j=1}^{N-i+1} \log_e C_j^I(t)}{N-i+1}$$

e a entropia aproximada para séries finitas é dada por:

$$ApEn (i, t, N) = |\emptyset^{i}(t) - \emptyset^{i+1}(t)|$$
$$= \left[ \frac{\sum_{j=1}^{N-i+1} \log_{e} C_{j}^{I}(t)}{N-i+1} \right] - \left[ \frac{\sum_{j=1}^{N-i+1} \log_{e} C_{j}^{I}(t)}{N-1} \right]$$

Valores menores de ApEn (*i*, *t*, *N*) indicam que a série temporal possui um alto grau de regularidade e valores altos indicam uma alta complexidade (maior irregularidade ou aleatoriedade) em um determinado sinal (Wu et al., 2016; Wu et al. 2017). Em suma, valores de ApEn próximos de 0 indicam a presença de padrões que se repetem ao longo da série e, inversamente, valores altos de ApEn indicam um comportamento aleatório (Pincus e Goldberger 1994).

## 3. Resultados e Discussão

# 3.1 Caracterização cinética do canal formado pela α-hemolisina de Staphylococcus aureus em bicamada lipídica plana

A registro das correntes iônicas mostrado na Fig. 1 ilustra a formação dos canais formados por  $\alpha$ -HL em DPhPC BLP na presença de NaCl (1M, 40 mV e pH = 4,5), onde cada salto discreto na condutância do canal observado, indica a incorporação de um novo canal na bicamada.



FIGURA 01: Formação de canais iônicos em DPhPC após a adição de solução de α-hemolisina de *Staphylococcus aureus* no lado *Cis* da câmara. Voltagem igual a +40 mV e solução eletrolítica de NaCl 1M, pH 4,5. Cada salto no valor da condutância é devido à abertura de um novo canal iônico na membrana.

Sob condições experimentais específicas, os canais formados por α-HL formam um poro com corrente iônica constante (Júnior et al. 2019), ou seja, não apresentam uma dinâmica de abertura e fechamento do canal. Nossos resultados mostraram que variações das condições no ambiente que circunda o canal, tais como concentração da solução eletrolítica que banha o canal, voltagem e pH leva o canal a transitar entre os diferentes estados de condutância, condição necessária para nossas análises. Na Fig. 2 é possível observar a variação no processo cinético desses canais devido variações das condições experimentais.



FIGURA 02: Registros de correntes iônicas através de canais unitários formados por α-hemolisina de *Staphylococcus aureus* em diferentes condições experimentais onde é possível observar a mudança na dinâmica da cinética desses canais ocasionadas por variações nas condições experimentais. A. 40 mV, NaCl 1M, pH 7,0; B. 40 mV, KCl 1M, pH 7,4; C. 200 mV, NaCl 1M, pH 7,0; D. 40 mV, NaCl 1M, pH 4,5.

Todos os registros de canais unitários utilizados nas nossas análises foram obtidos sob as seguintes condições experimentais: 40 mV, NaCl 1M, pH 4,5. Nessa condição experimental o canal iônico formado pela α-HL possui uma dinâmica de gating que apresenta maior número de transições entre os diferentes estados, gerando séries temporais com elevado número de eventos, condição necessária para a aplicação dos métodos matemáticos DFA e ApEn. O registro típico sob essa condição experimental pode ser visto na Fig. 3, onde podemos observar as transições entre os diferentes estados de condutância do canal através de um único canal.



FIGURA 03: Corrente iônica típica de canal unitário da α-hemolisina de *Staphylococcus aureus* utilizado nas nossas análises. A. Corrente iônica observada em maior escala de tempo; B. Corrente iônica observada em menor escala de tempo e C. Estado fechado observado em uma curta escala de tempo (na ordem de milissegundos). Condições experimentais: solução eletrolítica - NaCl 1M (pH 4,5) e 40 mV.

O canal iônico da  $\alpha$ -HL apresentou condutância média igual a 0,82 nS (±0,0025). Em pH 4,5 os canais  $\alpha$ -HL apresentaram transições entre os estados aberto e fechado (Fig. 04). O histograma de uma condutância de canal único pode ser visto na Fig. 3.



FIGURA 04: Histograma da condutância dos canais iônicos formados por *Staphylococcus aureus* αhemolisina em bicamada lipídica planar de DPhPC em Hexano (1M NaCl e 40 mV)

Na presença de soluções eletrolíticas com alta concentração, pH neutro e em voltagens específicas a frequência de fechamentos é praticamente nula, permanecendo aberto durante todo o experimento, sem transitar entre os estados aberto e fechado (Fig. 2) Mas sob condições experimentais específicas o canal iônico  $\alpha$ -HL transita entre diferentes estados de condutância. De acordo com Kasianowicz e Bezrukov (1995) em pH ácido a probabilidade do canal transitar para estados fechados aumenta. Dessa forma, realizamos nossos experimentos em pH 4,5, de modo que a dinâmica do *gating* está sendo modulada pelo pH.

Canais complexos, formados por grandes subunidades e com um mecanismo de *gating* bem desenvolvido, também são sensíveis ao pH. Chen e Aldrich (2011), analisando o canal BK, observaram que além das alterações de voltagem e aumentos no Ca<sup>2+</sup> intracelular, a variação do pH no lado intracelular também pode ativar o canal. De acordo com Hou et al. (2009), o H<sup>+</sup> acelera a cinética de ativação dos canais de Ca2+ de grande condutância e canais Slo1 BK dependentes de voltagem.

De acordo com Delisle e Satin (2000), o pH modifica o *gating* de ativação em estado estacionário, em canais de cálcio do tipo T. Esses autores afirmam que essa

mudança se deve principalmente à modificação na protonação no domínio de gate do canal.

De acordo com Bezrukov e Kasianowicz (1997), a condutância do canal α-HL também muda sob diferentes valores de pH, onde uma diminuição no pH leva a um aumento na condutância. Bonome et al. (2017) mostraram que o interior dos poros desses canais fica cada vez mais carregado positivamente à medida que o pH diminui. Além disso, a diminuição do pH induz a protonação dos resíduos expostos no interior do poro, afetando o fluxo iônico.

Hoje entende-se que a cinética do canal iônico é um processo determinístico, porém a origem desse comportamento não é um consenso. Para alguns autores, o comportamento determinístico se origina do movimento de sequências de aminoácidos pertencentes aos domínios gating dentro de um ambiente onde diferentes forças atuam em conjunto gerando um comportamento fractal (Manna et al. 2007). Para outros autores, o comportamento pode decorrer de ações inseridas por flutuações na espessura da bicamada lipídica atuando nos domínios de gating dos canais iônicos (Wawrzkiewicz et al. 2012; Borys 2020).

Assim, escolhemos os canais iônicos de  $\alpha$ -hemolisina de *Staphylococcus aureus* como modelo experimental para investigar o comportamento da memória em canais iônicos devido ao fato de que este canal pode apresentar um mecanismo de *gating* muito simples, quando comparados a outros canais mais complexos, que apresentam memória, como os canais de potássio e de cloreto, dentre outros. Este canal, possui uma dinâmica de *gating* dependente da voltagem, do pH e das concentrações da solução eletrolítica que banha o canal, podendo apresentar-se como um nanoporo de diâmetro fixo, sem nenhum sistema de *gating* ou apresentar um sistema de *gating*, mesmo que seja bastante simples em relação a outros canais. Dessa forma, nós acreditamos que o canal  $\alpha$ -HL pode ser utilizado como um modelo para estudos sobre memória longa e se essa memória pode ser modulada por variações no ambiente que circunda o canal.

## 3.2 Análise de Flutuações Destendenciadas (DFA)

As séries temporais com os tempos de permanência nos diferentes estados de condutância foram analisados em três condições: séries formadas por toda a atividade

do canal (que é uma superposição de dois processos alternados, dinâmica de estado fechado e aberto); séries compostas apenas flutuações de estado fechado e apenas aberto.

Os resultados da análise DFA mostraram que a cinética do canal  $\alpha$ -HL é um processo determinístico, com memória longa persistente ( $DFA_{\alpha}$ = 0.63 ±0.04). Os valores de  $DFA_{\alpha}$  de cada série original e das séries após randomização dos dados podem ser vistos na tabela 01.

Registros	Ν	$DFA_{\alpha}$	$DFA_{lpha a lea \acute{o}rio}$
1	442	0.6314	0.4874
2	487	0.6603	0.5522
3	949	0.6258	0.4845
4	549	0.6353	0.4853
5	713	0.5458	0.4824
6	461	0.5977	0.5233
7	781	0.6329	0.5509
8	1917	0.7039	0.5320
9	649	0.6884	0.4744
10	579	0.6247	0.5206

Tabela 01. Coeficiente de Hurst (método DFA) da série de tempo de permanência nos estados abertofechado do canal α-HL.

De acordo com Peng e cols. 1994, um  $\alpha > 0,5$  indica a presença de memória persistente na série temporal, ou seja, há uma maior probabilidade de que um curto tempo de permanência seja seguido por outro curto; o mesmo vale para valores altos.

Wawrzkiewicz e colaboradores (2012) afirmam que mudanças na espessura da membrana, geradas por variações de temperatura, alteram a densidade de carga na região do canal responsável pelo mecanismo de abertura e fechamento do canal e que forças inseridas no sistema, geradas por essas mudanças poderiam dar origem à propriedade de memória longa. De acordo com Guros et al. (2018) os lipídios da membrana não restringem diretamente o fluxo de íons através do  $\alpha$ -HL, mas afetam indiretamente a corrente iônica alterando a estrutura do canal  $\alpha$ -HL, alterando o diâmetro interno do canal. Talvez as flutuações naturais na espessura da bicamada lipídica ao redor do canal também alterem a dinâmica do *gating* dos canais  $\alpha$ -HL e

sejam responsáveis pelo comportamento determinístico do canal observado em nossas análises

## 3.3 Entropia Aproximada

Os resultados das análises da complexidade obtida através da entropia aproximada demostram que existem diferenças nas dinâmicas de aberto e fechado (ApEnA=0,55142  $\pm$  0,28; ApEnF=0,114472  $\pm$ 0,082541). Na análise do ApEn, utilizamos os parâmetros *i* e *t* iguais a 2 e 0,15x do desvio padrão da série, respectivamente. Os resultados do *ApEn* podem ser vistos na tabela 2.

Tabela 02: Entropia aproximada das séries dos tempos de permanência do canal α-HL nos estados aberto e fechado antes e depois da randomização das séries.

Séries	ApEn <sub>A</sub>	ApEn <sub>Aaleatório</sub>	ApEn <sub>s</sub>	ApEn <sub>Faleatório</sub>
1	1.0704	1.244	0.1299	0.1481
2	0.1806	1.0772	0.1136	0.123
3	0.5029	1.3285	0.1199	0.1752
4	0.7659	1.2124	0.2602	0.2614
5	0.4622	1.3781	0.2285	0.2368
6	0.7823	1.2343	0.01822	0.0274
7	0.5501	1.4919	0.0159	0.0212
8	0.2849	1.1125	0.0394	0.0508
9	0.2371	1.1653	0.1423	0.2189
10	0.6778	1.3199	0.0768	0.0846
Média	0.5514 (±0.28)	1.2564 (±0.13)	0.1144 (±0.08)	0.1374 (±0.09)

Em nossas análises observamos que o estado fechado apresentou eventos muito semelhantes entre si, não sendo possível detectar se tais valores são uma característica intrínseca da cinética dos canais ou se é um artefato do introduzido pelo sistema de aquisição. Assim, talvez a dinâmica de estado fechado não seja um dado robusto que possamos usar para análise de memória.

Dessa forma, separamos as séries temporais iniciais, formadas pela alternância dos tempos de permanência nos estados aberto e fechado, para análise pelo método ApEn, gerando dois tipos de séries, uma formada apenas com os tempos no estado fechado e outra contendo apenas os tempos de permanência no estado aberto. Nossos resultados da entropia aproximada obtidos para o estado aberto mostram que a complexidade da série original tende a aumentar após a randomização dos dados, o que demonstra que o comportamento da série original tem uma repetição de padrões ao longo do tempo, que se perde após a aleatorização, sendo um indicativo da presença de uma dinâmica determinística no comportamento do estado aberto (Fig. 5, esquerda), corroborando a análise pelos métodos DFA.



Figura 05: Valores de ApEn da série original do canal a-HL nos estados aberto e fechado e valores de ApEn dessas séries após a randomização dos dados (teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5%).

Quando analisamos a entropia da série temporal de estado fechado antes e após a randomização dos dados, não foram observadas diferenças significativas entre os valores de entropia aproximada antes e após a randomização dos dados (Fig. 4, à direita) e isso pode ser resultado de a série original possuir valores muito semelhantes entre si.

Não podemos inferir que a memória longa presente na série total é consequência da dinâmica presente no estado aberto. Sugere-se que novas análises precisam ser realizadas para obter séries temporais do estado fechado para que possamos analisá-las adequadamente.

### 4. Conclusões

Em conclusão, as análises não lineares de nossos experimentos demonstraram que a cinética dos canais iônicos formados pela α-hemolisina de *Staphylococcus aureus* é um processo determinístico, com presença de memória longa e que a

dinâmica do estado aberto possui uma baixa complexidade, o que pode ser um indicativo de repetições de um padrão na série temporal ao longo do tempo, o que corrobora com os resultados obtidos através do método DFA.

## Agradecimentos

Agradecemos à Dra. Dijahah Cota Machado, à Dra. Gesilda Florenço das Neves e ao Dr. Ramón Enrique Ramayo González pela colaboração na análise dos dados. Os autores agradecem também ao Departamento de Morfologia e Fisiologia da UFRPE, à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA), ao Laboratório de Análise Computacional de Realidades Complexas do Centro de Apoio à Pesquisa - UFRPE (CENAPESQ) e ao Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-Tronco Oleg Krasilnikov do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE pelo suporte técnico.

## Financiamento

Este estudo foi financiado pela agência brasileira de apoio Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Referências

- Alexander SP, Peters JA., Kelly E, Marrion, NV, Faccenda, E, Harding, SD, ... & CGTP Collaborators. (2017) The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18: Ligandgated ion channels. British Journal of Pharmacology, 174, S130-S159.
- Arias-Calluari K, Najafi M, Harré MS, Alonso-Marroquin F (2019) Stationarity of the detrended time series of S&P500. arXiv preprint arXiv:1910.01034.

Ashcroft FM (1999). Ion channels and disease. Academic press.

- Bagal SK, Brown AD, Cox PJ, Omoto K, Owen RM, Pryde DC., ... & Swain NA (2013) Ion channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective. Journal of medicinal chemistry, 56(3), 593-624.
- Bhakdi S, Tranum-Jense, J (1991) Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. Microbiological reviews, 55(4), 733-751.
- Bezrukov SM, Kasianowicz JJ (1997) The charge state of an ion channel controls neutral polymer entry into its pore. European biophysics journal, 26(6), 471-476.
- Berube BJ, Wardenburg JB (2013) *Staphylococcus aureus* α-toxin: nearly a century of intrigue. Toxins, 5(6), 1140-1166.

- Bonome EL, Cecconi F, Chinappi M (2017) Electroosmotic flow through an αhemolysin nanopore. Microfluidics and Nanofluidics, 21(5), 96.
- Borys P (2020) Long term Hurst memory that does not die at long observation times— Deterministic map to describe ion channel activity. Chaos, Solitons & Fractals 132: 109560. https://doi.org/10.1016/j.chaos.2019.109560
- Busha BF, Banis GA (2017) Stochastic and integrative model of breathing. Respiratory Physiology & Neurobiology 237:51-56. https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.12.012
- Castro CROB, Moraes Rb, Silva JRF et al. (2014) Detrended Fluctuation Analysis applied to ECG in dogs subjected to physical effort. Exp Clin Cardiol 20(9):5068-5073. https://doi.org/10.16887/87.a1.51
- Chen X, Aldrich RW (2011) Charge substitution for a deep-pore residue reveals structural dynamics during BK channel gating. Journal of General Physiology, 138(2), 137-154.
- Delisle BP, Satin J (2000) pH modification of human T-type calcium channel gating. Biophysical Journal, 78(4), 1895-1905.
- Divyakolu S, Chikkala R, Ratnakar KS, Sritharan V (2019) Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy. Advances in Infectious Diseases, 9(2), 80-104.
- Djawad YA, Attwood D, Kiely J, Luxton R (2019) The application of detrended fluctuation analysis to assess physical characteristics of the human cell line ECV304 following toxic challenges. Sensing and Bio-Sensing Research 23(2019):100269. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2019.100269
- Eiffler I, Behnke J, Ziesemer S, Müller C, Hildebrandt JP (2016) *Staphylococcus aureus* α-toxin-mediated cation entry depolarizes membrane potential and activates p38 MAP kinase in airway epithelial cells. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 311(3), L676-L685.
- Fermini B (2008) Recent Advances in Ion Channel Screening Technologies. In: Fermini B, Priest BT (Org.) Ion Channel: Top Med Chem, Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1-25. https://doi.org/10.1007/7355\_2008\_024
- Füssle R, Bhakdi S, Sziegoleit A, Tranum-Jensen JÖRGEN, Kranz T, Wellensiek HJ (1981) On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Journal of Cell Biology, 91(1), 83-94.
- Gouaux JE, Braha O, Hobaugh MR, Song L, Cheley S, Shustak C, Bayley H (1994) Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(26), 12828-12831.

- Guros NB, Balijepalli A, Klauda JB (2018) The role of lipid interactions in simulations of the α-hemolysin ion-channel-forming toxin. Biophysical journal, 115(9), 1720-1730.
- Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd edn. Sinauer, Sunderland
- Hou S, Horrigan FT, Xu R, Heinemann SH, Hoshi T (2009) Comparative effects of H+ and Ca2+ on large-conductance Ca2+-and voltage-gated Slo1 K+ channels. Channels, 3(4), 250-260.
- Hutchings CJ, Colussi P, Clark TG (2019) Ion channels as therapeutic antibody targets. In: MAbs, 11(2):265-296. https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1548232
- Júnior JJS *et al.* (2019) Alpha-hemolysin nanopore allows discrimination of the microcystins variants. RSC advances, 9(26) 14683-14691.
- Kasianowicz JJ, Bezrukov SM (1995) Protonation dynamics of the alpha-toxin ion channel from spectral analysis of pH-dependent current fluctuations. Biophysical Journal, 69(1), 94-105.
- Krasilnikov OV, Sabirov RZ, Ternovsky VI, Merzliak PG, Tashmukhamedov BA (1988) The structure of *Staphylococcus aureus* a-toxin-induced ionic channel. Gen. Physiol. Biophys, 7, 467-473.
- Kim J, Shah D, Potapov I, Latukka J, Aalto-Setälä K, Räsänen E (2019) Scaling and correlation properties of RR and QT intervals at the cellular level. Sci Rep 9(1):1-9. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40247-9
- Koivisto AP, Belvisi MG, Gaudet R, Szallasi A (2021) Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. Nature Reviews Drug Discovery, 1-19.
- Lan TH, Xu BQ, Yuan HJ, Lin JR (2003) Rescaled range analysis applied to the study delayed rectifier potassium channel kinetics. Biophys Chem 106(1):67-74. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00174-1
- Lan TH, Gao ZY, Abdalla AN, Cheng B, Wang S (2008) Detrended fluctuation analysis as a statistical method to study ion single channel signal. Cell Biol Int 32(2):247-252. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.09.001
- Liebovitch LS, Fischbarg J, Koniarek JP (1987) Ion channel kinetics: a model based on fractal scaling rather than multistate Markov processes. Math Biosci 84(1):37-68. https://doi.org/10.1016/0025-5564(87)90042-3
- Liebovitch LS, Krekora P (2002) The physical basis of ion channel kinetics: the importance of dynamics. In: Layton HE, Weinstein AM (ed) Membrane Transport and Renal Physiology, The IMA Volumes in Mathematics and Its Applications, Minneapolis, pp 27-52

Lipscombe D, Wyllie DJA (2018) Editorial Overview: Ion Channels (2018).

- Manna S, Banerjee J, Ghosh S (2007) Breathing of voltage dependent anion channel as revealed by the fractal property of its gating. Physica A 386(1):573-580. https://doi.org/10.1016/j.physa.2007.06.049
- Liu J, Kozhaya L, Torres VJ, Unutmaz D, Lu M (2020) Structure-based discovery of a small-molecule inhibitor of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* virulence. Journal of Biological Chemistry, 295(18), 5944-5959.
- Menestrina G. (1986) Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations. The Journal of membrane biology, 90(2), 177-190.
- Miśkiewicz J, Trela Z, Burdach Z, Karcz W, Balińska-Miśkiewicz W (2020) Long range correlations of the ion current in SV channels. Met3PbCl influence study. Plos One 15(3):e0229433. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229433
- 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(12), 3561-3566.
- Moran Y, Barzilai MG, Liebeskind BJ, Zakon HH (2015) Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. Journal of Experimental Biology, 218(4), 515-525.
- Nascimento RS, Araujo LHG, Moraes RB, Barbosa CT, Guedes RC, Nogueira RA, Stošić T (2010) Analysis of signal fluctuations of Cortical Spreading Depression: Preliminary findings. Physica A 389(9):869-1873. https://doi.org/10.1016/j.physa.2010.01.010
- Nogueira RA, Varanda WA, Liebovitch LS (1995) Hurst analysis in the study of ion channel kinetics. Braz J Med Biol Res 28(4):491-496
- Oliveira RC, Barbosa CTF, Consoni LHA, Rodrigues ARA, Varanda WA, Nogueira RA (2006) Long-term correlation in single calcium-activated potassium channel kinetics. Physica A 364:13-22. https://doi.org/10.1016/j.physa.2005.08.057
- Peng CK, Buldyrev SV, Havlin S, Simons M, Stanley HE, Goldberger AL (1994) Mosaic organization of DNA nucleotides. Phys Rev E 49(2):1685. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.49.1685
- Peng ZY, Lan TH, Yang L, Mei HC, Ping JH, Jie XY, Lin CX (2012) Existence of memory in membrane channels: analysis of ion current through a voltagedependent potassium single channel. Cell Biol Int 36(11):973-979. https://doi.org/10.1042/CBI20110673

Petkov GV (2009) Ion channels. In: Pharmacology. Academic Press, p. 387-427.

Pincus SM, Goldberger AL (1994) Physiological time-series analysis: what does regularity quantify? American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 266(4), H1643-H1656.

- Pincus S (1995) Approximate entropy (ApEn) as a complexity measure. Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science, 5(1), 110-117.
- Roux B (2017) Ion channels and ion selectivity. Essays in biochemistry, 61(2), 201-209.
- Seilie ES, Wardenburg JB (2017) Staphylococcus aureus pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. In Seminars in cell & developmental biology (Vol. 72, pp. 101-116). Academic Press.
- Silva MP, Rodrigues CG, Varanda WA, Nogueira RA (2021) Memory in Ion Channel Kinetics. Acta Biotheoretica, 1-26.
- Siwy Z, Mercik S, Weron K, Ausloos M (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(1-2):79-96. https://doi.org/10.1016/S0378-4371(01)00194-7
- Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE (1996) Structure of staphylococcal α-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. Science, 274(5294), 1859-1865.
- Sychev SV, Ivanov VT (2014) Large scale conformational transitions in β-structural motif of gramicidin A: kinetic analysis based on CD and FT-IR data. Journal of Peptide Science, 20(8), 657-667.
- Thomer L, Schneewind O, Missiakas D (2016) Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 11, 343-364.
- Varanda WA, Liebovitch LS, Figueiroa JN, Nogueira RA (2000) Hurst analysis applied to the study of single calcium-activated potassium channel kinetics. J Theor Biol 206(3):343-353. https://doi.org/10.1006/jtbi.2000.2131
- Walev IWAN et al. (1993) Staphylococcal alpha-toxin kills human keratinocytes by permeabilizing the plasma membrane for monovalent ions. Infection and immunity, 61(12), 4972-4979.
- Wawrzkiewicz A, Pawelek K, Borys P, Dworakowska B, Grzywna ZJ (2012) On the simple random-walk models of ion-channel gate dynamics reflecting long-term memory. Eur Biophys J, 41(6):505-526. DOI: 10.1007/s00249-012-0806-8
- Wawrzkiewicz-Jałowiecka A, Trybek P, Borys P, Dworakowska B, Machura Ł, Bednarczyk P (2020a) Differences in Gating Dynamics of BK Channels in Cellular and Mitochondrial Membranes from Human Glioblastoma Cells Unraveled by Short-and Long-Range Correlations Analysis. Cells 9(10):2305. https://doi.org/10.3390/cells9102305
- Wawrzkiewicz-Jałowiecka A, Trybek P, Borys P, Dworakowska B, Machura Ł, Bednarczyk, P (2020b) Differences in Gating Dynamics of BK Channels in

Cellular and Mitochondrial Membranes from Human Glioblastoma Cells Unraveled by Short-and Long-Range Correlations Analysis. Cells, 9(10), 2305.

- Wilson JW, Rolland AD, Klausen GM, Prell JS (2019) Ion mobility-mass spectrometry reveals that α-hemolysin from *Staphylococcus aureus* simultaneously forms hexameric and heptameric complexes in detergent micelle solutions. Analytical chemistry, 91(15), 10204-10211.
- Wu Y, Chen P, Luo X, Huang H, Liao L, Yao Y, ..., Rangayyan RM (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.
- Yellen G (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. nature, 419(6902), 35-42.

## Considerações Finais

Os resultados teóricos e experimentais mostraram que a memória longa é uma propriedade ubíqua dos canais iônicos, podendo ser observadas em diferentes tipos de canais iônicos, desde canais mais complexo quanto canais formados por peptídeos produzidos por microrganismos. Estudos futuros serão desenvolvidos para avaliar a possibilidade de modelar a memória dos canais iônicos formados pela α-hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus* através de fatores externos como variação de pH e tipo de solução eletrolítica que permeia os canais iônicos.

Anexos

**Anexo 01:** Artigo publicado na Revista Acta Biotheoretica intitulado "Memory in Ion Channel Kinetics".

#### **REVIEW ESSAY**



## Memory in Ion Channel Kinetics

M. P. Silva<sup>1</sup> · C. G. Rodrigues<sup>2</sup> · W. A. Varanda<sup>3</sup> · R. A. Nogueira<sup>1</sup>

Received: 1 September 2020 / Accepted: 20 May 2021 © Springer Nature B.V. 2021

### Abstract

Ion channels are transport proteins present in the lipid bilayers of biological membranes. They are involved in many physiological processes, such as the generation of nerve impulses, hormonal secretion, and heartbeat. Conformational changes in the ion channel-forming protein allow the opening or closing of pores to control the ionic flux through the cell membranes. The opening and closing of the ion channel have been classically treated as a random kinetic process, known as a Markov process. Here the time the channel remains in a given state is assumed to be independent of the condition it had in the previous state. More recently, however, several studies have shown that this process is not random but a deterministic one, where both the open and closed dwell-times and the ionic current flowing through the channel are history-dependent. This property is called long memory or long-range correlation. However, there is still much controversy regarding how this memory originates, which region of the channel is responsible for this property, and which models could best reproduce the memory effect. In this article, we provide a review of what is, where it is, its possible origin, and the mathematical methods used to analyze the long-term memory present in the kinetic process of ion channels.

**Keywords** Long-term correlation  $\cdot$  Memory effect  $\cdot$  Ion channel  $\cdot$  Hurst coefficient  $\cdot$  Detrended fluctuation analysis  $\cdot$  Modeling memory

R. A. Nogueira nogromildo@gmail.com

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Department of Physiology-Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (Retired), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

### 1 Introduction

From a neuroscience point of view, memory is the capability of acquiring, storing, and retrieving information (Kandel et al. 2000), as well as the capacity to transport it (Gallistel and King 2009). From the perspective of computational science, memory is the device sets that allow a computer to store data and to have access to these data again in the future. In other words, it could be understood as the capacity of the computer's memory to preserve the information (Lea 2018). From a chemical point of view, shape-memory, for instance, is the ability of a material to return to previous shape or condition after a given change in its state (Lendlein and Kelch 2002). Even if the concept is analyzed from other different point of views such as in immunology, physics, molecular biology, as well as in the area of statistics the meaning may vary somewhat, but always refers to the ability to store and recall information (Beran et al. 2013; De La Fuente 2015; Freer et al. 2017; Pradeu and Du Pasquier 2018).

From a mathematical perspective, long-term memory can be understood as the persistence of autocorrelation in a data set, that decays slower than the exponential rate associated with the stochastic process, as an Auto-Regressive Moving Average (Baillie 1996). The presence of long-term memory in a given process means that there is a particular pattern that repeats itself throughout the time of observation of the phenomenon (Li and Kaneko 1992).

The presence of long-term memory, or long-range correlation, in a time series, means that distant time points are correlated, that this correlation persists over time and decreases slowly (Hughes and Lee 2015). According to Morettin and Toloi (2004), this long-memory process can be characterized by a slow hyperbolic decay of the autocorrelation function to zero, and its spectral density function is not limited at zero frequency.

Markov process had been used to describe ion channel kinetics for a long time. It assumes discrete conductance states, in which the probabilities of switching between these different states depend only on the present state and not on the previous behavior; in other words, the ion channel kinetics is viewed as a purely random process (Liebovitch and Krekora 2002). Nowadays, this model is still used to describe the ion channel kinetics (Schmandt and Galan 2012; Chen et al. 2019).

Many authors have demonstrated that different physiological processes do not behave randomly, but that they are governed by deterministic laws. They are chaotic, fractal, or in some way a deterministic process, such as the growth of organisms, the animal's heart rate, brain activity, cell metabolism, tumor growth, among others (Castro et al. 2014; Aguiar et al. 2015; Bassil et al. 2017; Szasz et al. 2018; Gupta et al. 2020). Deterministic laws have also been demonstrated to govern the behavior of ion channels, where the ion channel kinetics is taken as a process that displays long-term correlation (Nogueira et al. 1995; Varanda et al. 2000; Siwy et al. 2001; Bandeira et al. 2008; De La Fuente et al. 2017; Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. 2018). The presence of correlation in the kinetics of ion channels means that the open or closed states do not occur randomly.

The presence of long-term memory in a time series indicates a persistent dependence amongst the data points composing the time series (Giraitis et al. 2003). In some systems the presence of long-term memory can be analyzed as a time-correlated process (Nogueira et al. 1995), that is, the system has the propensity to replicate its current behavior (persistent) or the opposite behavior (anti-persistent), in the future. For example, the presence of persistent memory in the ion channel kinetics means that a long time spent in an open or closed event, at time t, has a greater probability of being followed by another long time in the future (the same is true for short time values). Long-range correlations have been observed in both the open/ closed dwell-time single series and also in the separated closed and open dwell-time series.

However, Siwy et al. (2001), showed that the open state sequences have a smaller Hurst exponent than that found for closed dwell-times. Siwy et al. (2002) suggested that the memory effect present in the open-closed dwell-time sequence of the BK channels of extensor tibiae fibers of *Schistocerca gregaria* is determined by the correlation properties of the closed state. Similar results were also reported by Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. (2020a) in BK channels of human glioblastoma cells through multifractal analysis.

The purpose of this review is to discuss arguments for the presence of long-term memory in the kinetics of ion channels, the probable origins of this behavior, mathematical approaches, and models used for the analysis of this phenomenon.

### 2 Importance of Memory

Ionic currents through cell membranes play a crucial role in a wide range of physiological processes required for the maintenance of life, e. g., the excitability of nerve and muscle, generation of action potentials, effects of second messengers, and cell secretion (Lipscombe and Wyllie 2018). Such ion fluxes occur along specific protein pathways (channels), and use the electrochemical energy stored in the transmembrane ion gradients, to generate ionic currents (Hille 2001).

Alterations in the structure and function of channel-forming proteins can lead to channelopathies, such as in diabetes mellitus, epilepsy, long QT syndrome, and other heart diseases. Mutations in the ion channel-forming protein may alter the dwell-time that the channels spend in the closed or open state, as in Hypokalemic Periodic Paralysis type 1, leading to changes in the macroscopic behavior, i.e., muscle paralysis (Kuzmenkin et al. 2007). Therefore, understanding the structure, activity, and functioning of ion channels is of enormous importance for both biology and medicine (Fermini 2008; Kim 2014; Lascano et al. 2016; Fernández-Falgueras et al. 2017; Kline and Costantini 2019).

Approximately one-third of the entire genome codes for membrane proteins and, over two-thirds of the drugs on the market have membrane proteins as targets (Liu and Caffrey 2005). Ion channel-forming proteins are the second most abundant class of membrane proteins involved in drug discovery (Hutchings et al. 2019). Approximately 18% of small molecule drugs, registered in the chemical database of bioactive molecules (ChEMBL Database), is targeted towards ion channels (Santos et al. 2017), with global sales around US\$ 12 billion (Hutchings et al. 2019). Therefore,

this is a great practical motivation to gain more knowledge about their structure and mechanism of action.

Although the studies of single channels both at the molecular and macroscopic levels have advanced in past years, there are still some methodological issues that do not allow a full experimental analysis of some of their fundamental properties. Much of the information describing ion channel behavior, in many physiological processes, were generated through computer modelling and simulations based on Markov process (Grandi et al. 2007; Sampson et al. 2010; Schmandt and Galán 2012; Furutani et al. 2019), i.e., the kinetic of opening/closing of ion channels is taken as a purely random process.

Nevertheless, a new paradigm, assuming a deterministic behavior of ion channels is also possible. It should be considered in modeling and simulations of ion channel dynamics to explain macroscopic processes, such as action potential and hormone release, intrinsically controlled by the opening and closing of ion channels. Thus, we suggest that the memory property could be added to the simulations, becoming a new tool to explore the intrinsic characteristics of the ion channel.

### 3 How to Identify Memory in the Ion Channel Kinetics?

Conformational changes in the structure of the protein nanopore control the ionic flux by inducing transitions between different conductance states (Liebovitch and Krekora 2002), a process called gating. Switching between the conductance states occurs in response to stimuli, such as voltage changes, mechanical stress, temperature, pH changes, chemical ligands, among others, which results in the opening or closing of the permeation pathway through the channel (Hille 2001; Dreyer et al. 2004). The energy used for the transitions between different conformational states is derived from the thermal fluctuations in the environment around the channel and endogenous or exogenous stimuli (Liebovitch et al. 1987). This type of behavior is traditionally seen as a random process in which the transition between states is entirely probabilistic. In other words, the "opening" or "closing" events are not influenced by a past event and depend only on the present state (if it is open, it is possible to calculate the probabilities that channel will remain open or will switch to a closed state) (Colquhoun and Hawkes 1981; Hille 2001; Liebovitch and Krekora 2002).

A physical model of an ion channel kinetics, based on a Markovian process, assumes that the ion channel switches between discrete states, separated by high and discrete energy barriers. The transition probabilities between the open- and closed- conformations are considered time-independent (Colquhoun and Hawkes 1977; Liebovitch et al. 1987; Liebovitch and Krekora 2002). Because of this type of behavior, the traditional Markovian model predicts that the dwell-times of the channel in the open or closed state follows an exponential distribution (Colquhoun and Hawkes 1994), or the sum of exponentials in the case that the open or closed states are composed of more than one sub-state (Liebovitch and Toth 1991).

However, several studies have shown that the distribution of dwell-times is better described by a stretched exponential or a power law (Liebovitch et al. 1987; Sansom 1989; Mercik and Weron 2001; Wawrzkiewicz et al. 2012). Moreover, purely

random models fail to simulate specific properties present in the gating process, such as the long-term memory observed in the open and closed dwell-times of channels (Varanda et al. 2000; Oliveira et al. 2006; Lan et al. 2008).

High-resolution measurements of ion currents across a single-channel with the patch-clamp technique (Neher and Sakmann, 1976), has been widely used to obtain the time series representing the channel dwell-time in different states of conductance. The time series can be analyzed by mathematical methods to study several biophysical properties, such as the time constants, the behavior of the distribution of probability density function, as well as the presence or not of repetition patterns in the series. From the statistical analysis, it is possible to conclude whether the ion channel kinetics results from a random or a deterministic behavior (Colquhoun and Hawkes 1981; Liebovitch and Krekora 2002).

Several reports have shown that the opening/closing process, at least in alamethicin, BK, voltage-dependent potassium, calcium, chloride, and non-selective cations channels (Nogueira et al. 1995; Fuliński et al. 1998; Kochetkov et al. 1999; Mercik et al. 1999; Varanda et al. 2000; Siwy et al. 2001; Lan et al. 2003; Kazachenko et al. 2004; Manna et al. 2007; Astashev et al. 2007; Bandeira et al. 2008; Lan et al. 2008; Peng et al. 2012; Wawrzkiewicz et al. 2012; De La Fuente et al. 2017; Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. 2018; Miśkiewicz et al. 2020) has memory. Nevertheless, the origin of memory is a subject not completely understood.

#### 4 Formal Methods to Assess Memory

Manna et al. (2007) pointed out that evaluating the behavior of ion channel kinetics based on the statistical properties of dwell time histograms, and other traditional analyzes, implies accepting the premise that the process is linear, stationary and in equilibrium. Those authors emphasized that this type of analysis is not satisfactory to understand the mechanisms that govern this nonlinear, non-stationary, and at non-equilibrium process. Lan et al. (2003) have observed that even for a simple two-state ion channel with memory, the closed and open dwell-time distributions can be fitted by two exponentials.

Several mathematical methods exist for investigating the presence of long-term memory in time series, such as Hurst Analysis, Autocorrelation Function, Detrended Fluctuation Analysis (DFA) and Multifractal Analysis. The choice of method depends on the data properties of the time series being analyzed (Hurst 1951; Peng et al. 1994; Nogueira et al. 1995; Siwy et al. 2001; Astashev et al. 2007; Hudetz et al. 2016).

#### 4.1 Hurst Analysis

Hurst R/S analysis is a method proposed by Hurst (1951) to determine the optimum design of the construction of a reservoir in the Nile River in Egypt. The belief preceding Hurst's analysis was that a stochastic process determined the water flow. Hurst analyzed the records of Nile floods that occurred for nine centuries and showed that the process was not random, being deterministic and presenting a long-term correlation.

This method has been used to investigate the existence of long-range statistical dependence in time series by Mandelbrot and collaborators (Mandelbrot and Ness 1968; Mandelbrot and Wallis 1968; Mandelbrot and Wallis 1969a, b). They analyzed different simulated time series and showed that the R/S analysis is a robust statistical method to disclose the presence of long-term dependence in temporal series.

The Hurst coefficient for ion channel kinetics can be obtained by analyzing the time series of the fluctuations of ionic current through the channel, i.e., the dwell-time sequences in the different conductance states obtained either experimentally, or through computer simulations.

The Hurst exponent for a given time series, T = 1, 2, ..., N is calculated by subdividing the time series into subseries  $I_m$  (m = 1,...,z), whose elements in each one are denoted as  $t_{m,k}(k = 1, ..., n)$ . The mean value  $\bar{t}$  and the standard deviation S are obtained for each subseries and the cumulative deviations series in relation to the mean  $(\bar{t})$  is obtained according to:

$$Y_{m,k} = \sum_{j=1}^{k} (t_{m,k} - \bar{t})$$
(1)

The *R/S* value is the "range"  $R_m = max(Y_{m,k}) - min(Y_{m,k})$  of the  $Y_{m,k}$  normalized by the standard deviation. Then, the  $(R/S)_{mean}$  is calculated for the *n*-length series. This procedure is done for different scales. First, it is calculated for the whole data set. Next, the set is divided into two equal subsets. Then, the procedure of R/S calculation is repeated for different subsets. The length of the subseries is obtained by dividing the series the total series into *n* elements, where *n* is equal to  $N/\tau$ , and  $\tau = 1, 2, 4, 8, ..., N/2$ .

Hurst (1951) observed that the R/S range has the following empirical relationship:  $(R/S)_{mean} = (n/2)^H$ , where H is defined as the Hurst exponent with values in the range  $0 \le H \le 1$ . Then, the slope of a double-log plot of  $(R/S)_{mean}$ versus n, obtained by the least-squares linear regression method, is the Hurst exponent, the parameter that is used to identify long-term memory.

The value of the Hurst exponent (H) may indicate three possible different regimes in a process. H=0.5 means that there is no similarity between the elements of the data sequence; that is, the system behaves randomly. Values between 0 and 0.5 indicate that the process is deterministic with the presence of an anti-persistent long-term memory, i.e., an increase of the values in the time series in the present will tend to be followed by a decrease in the future (and vice-versa). And finally, values  $0.5 < H \le 1.0$  are indicative of the presence of persistent long-term memory where a high value in the time series will tend to be followed by a high value in the future (and vice-versa) (Matos et al. 2008).

#### 4.2 Detrended Fluctuation Analysis (DFA)

DFA is a method proposed by Peng et al. (1994) for quantifying long-range correlations in non-stationary time series. It has an advantage over other methods because it avoids the detection of spurious long-term correlations when it is due to artefacts of non-stationarity. The DFA method has been used in the analysis of various phenomena, such as ion channel kinetics, human breathing, stock market data, the response of cells to different toxins, electrocardiogram and electrocorticogram (Nascimento et al. 2010; Peng et al. 2012; Castro et al. 2014; Aguiar et al. 2015; Busha and Banis 2017; Arias-Calluari et al. 2019; Djawad et al. 2019; Kim et al. 2019).

The presence of trend may not be an intrinsic feature of the data; instead, a consequence of external effects. The data analysis without considering the spurious trends may lead to the identification of false correlation (Kantelhardt et al. 2001). The removal of trending is essential because it prevents any external noise from affecting the system behavior. According to Hu et al. (2001), the presence of trends is common in time series generated by biological or physical systems.

DFA consists of analyzing the time series after trend removal and search for the presence or absence of self-similarity within the time series (Stanley et al. 1999; Hu et al. 2001). The steps followed by the DFA method are the following (Peng et al. 1994, 1995):

(a) Obtain an integrated series, y (k), from the original time series according to:

$$y(k) = \sum_{i=1}^{k} [y(i) - \overline{y}],$$
(2)

where y(i) are the elements of the original series and  $\overline{y}$  is its average.

- (b) Divide the integrated time series of length *N* into *N/n* non-overlapping boxes.
- (c) Obtain the local trend  $y_n(k)$  in each box through a linear least-squares fit.
- (d) Detrend the data by calculating the difference between the integrated series y(k) and the local trend  $y_n(k)$  in each box and calculate F(n), the root-mean-square fluctuation, as follows:

$$F(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^{N} [y(k) - y_n(k)]^2}$$
(3)

- (e) Repeat the procedures above for different scales, different n values, to provide a relationship between F(n) and the different box sizes n.
- (f) Finally, making a double-log plot of F(n) versus *n*. The linear regression coefficient of the double-log plot of the function  $F(n) \sim n^{\alpha}$  is the DFA parameter,  $\alpha$ , which indicates the presence or absence of long-term correlation (memory) in the original series.

An  $\alpha$ =0.5 indicates a random behavior of the series. Values between 0 and 0.5 indicate the presence of anti-persistent memory; that is, series are more likely to alternate, where low values are more likely to be followed by high values and vice-versa. Values of  $\alpha$  between 0.5 and 1.0 indicate the presence of persistent memory, i.e., there is a higher likelihood that one short dwell time will be followed by another short one; the same is true for high values (Peng et al. 1994). Figure 1 shows the  $\alpha$ -DFA of the opening and closing dwell time sequence (b) (time series with memory) and of the randomized opening and closing dwell time sequence (c) (memory-less time series). These results were obtained by our group and not published yet.

#### 4.3 Multifractal Analysis

Long-term memory can be detected by the DFA method in series that showing monofractal scaling properties. However, many time-series do not exhibit a simple monofractal scaling behavior in the fluctuations over time. In this case, different scaling exponents are needed for different segments of the series. Thus, a multifractal analysis could be applied. The multifractal DFA method (MF-DFA) was proposed by Kantelhardt et al. (2002) and can identify the multifractal scaling



Fig. 1 Determination of the  $\alpha$ -DFA coefficient in the kinetics of BK channel in Leydig cell. **a** Shows the single-channel record; **b** Shows  $\alpha$ -DFA of the opening and closing dwell time sequence (time series with memory) and **c** The  $\alpha$ -DFA of the randomized opening and closing dwell time sequence (memoryless time series). Single channel ion current was recorded in the outside-out configuration, from Leydig cell of mice, held at -60 mV, and a calcium concentration [Ca<sup>2+</sup>]=0.05  $\mu$ M. Arrow denotes the closed state of the channel

behavior of the time series. Makowiec and Fuliski (2010) proposed a protocol to use the multifractal analysis in the study of the ion channel kinetics as a method to disclose the long-term correlation in the dwell-time sequences.

The MF-DFA algorithm (Kantelhardt et al. 2002) quantifies the long-range correlation as follows:

(a) First, obtain an integrated series, y(k), from the original time series x(i):

$$Y(k) = \sum_{i=1}^{k} [x(i) - \bar{x}]$$
(4)

where  $\overline{x}$  is the average of the x(i) series.

(b) Next, the integrated series Y(k) is divided into Ns non-overlapping sub-series of size s.

Then, the steps a and b are repeated from the end to the beginning of the series. Thus,  $2N_s$  segments are obtained. This procedure is necessary because the length N of the series is often not a multiple of the time scale s. Thus, when s divides N such that  $Ns \times s < N$ , this step would lead to a loss of some data from the record. To solve this issue, the algorithm analyzes adjacent boxes in the series taking one from the left and one from the right sequentially.

- (c) The local trend  $y_n$  is calculated, in each segment, by a linear or polynomial least-square fit of the series.
- (d) In each segment, the variance is calculated:
- (1) For each segment  $v, v = 1, ..., N_s$ :

$$F^{2}_{(v,s)} \equiv \frac{1}{s} \sum_{i=1}^{s} \left\{ Y[(v-1)s+i] - y_{v}(i) \right\}^{2}$$
(5)

And.

(2) For each segment  $v = N_s + 1, \dots, 2N_s$ :

$$F^{2}_{(v,s)} \equiv \frac{1}{s} \sum_{i=1}^{s} \left\{ Y \left[ N - \left( v - N_{s} \right) s + i \right] - y_{v}(i) \right\}^{2}, \tag{6}$$

where  $y_v(i)$  is the fitting polynomial in segment v. The time series is detrended by subtracting the polynomial fits from the integrated series. (e) The average value of the segments is calculated, obtaining the qth order fluctuation function:

$$F_q(s) \equiv \left\{ \frac{1}{2N_s} \sum_{\nu=1}^{2N_s} \left[ F^2(\nu, s) \right]^{q/2} \right\}^{1/q},\tag{7}$$

- (f) Then, the above procedure is repeated for different scales *s*.
- (g) Finally, for each value of q is generated a log-log graph of  $F_a$  (s) versus s.

When  $F_q$  (s) increases, for large values of *s*, as the power-law  $F_q(s) \sim s^{h(q)}$ , that indicates the presence of long-range correlation in the series x(i). If q=2, the DFA method is applied. For q=0 the exponent h(q) is not determined using the equation above, instead the logarithmic averaging procedure is applied,

$$F_0(s) \equiv exp\left\{\frac{1}{4N_s} \sum_{\nu=1}^{2N_s} ln[F^2(\nu, s)]\right\} \sim s^{h(0)}$$
(8)

In monofractal processes h(q) is independent of q, its scaling behavior of the variances  $F^2(v, s)$  is similar for all segments, and  $F_q(s)$  will present the same scaling behavior for all values of q. Different scaling behaviors can be obtained depending on the value of q in series with a multifractal behavior.

#### 4.4 Autocorrelation Function

According to Hunt (2016), the autocorrelation function (*ACF*) measures the correlation between data in each time series with themselves. The autocorrelation analysis of the time series x(i),  $i = x_1, x_2, ..., x_N$ , with mean  $\bar{x}$ , is given by the following procedure:

- (a) Initially, data pairs belonging to the time series are formed: (x1, x1+k), (x2, x2+k), ..., (xn, xn+k), where k is a delay between the elements of the series used for forming the pairs of elements;
- (b) The r(k), autocorrelation function, is defined:

$$r(k) = \frac{\sum_{i=1}^{N-r} (x_i - \bar{x}) (x_{i+k} - \bar{x})}{\sum_{i=1}^{N} (x_i - \bar{x})^2}$$
(9)

where the function r(k) is defined for different values of k.

(c) The behavior of the autocorrelation function is obtained by plotting r(k) versus k.

Except for r(0), where the value of the autocorrelation function is equal to 1, the r(k) value must be zero when the time series originates from a random process.
Series that have their data correlated in time show r(k) values significantly different from zero.

According to Mercik et al. (1999), the autocorrelation function can be applied as a test for the presence of long-range memory. The autocorrelation function exponents are parameters that indicate the speed of correlation loss throughout the process.

### 5 Is Ion Channel Memory a Ubiquitous Property?

The presence of memory in ion channel kinetics was observed for the first time by Nogueira et al. (1995) in single calcium-activated potassium channels (BK channels) from mice Leydig cells, using different calcium concentrations and transmembrane voltages. The presence of long-term memory in the ion channel dwell-time series of the open and closed states was disclosed by using the R/S Hurst analysis. Other studies of the kinetics of BK and other types of ion channels have been performed since then and have corroborated our results (Fuliński et al. 1998; Varanda et al. 2000; Siwy et al. 2001; Bandeira et al. 2008; Wawrzkiewicz et al. 2012; De La Fuente et al. 2017; Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. 2018).

The property of memory has already been shown to be present in several types of channels, ranging from antimicrobial peptides (Astashev et al. 2007) to complex channels formed by multiple subunits, such as potassium, calcium, chloride, and non-selective cations channel (Varanda et al. 2000; Lan et al. 2003; Kazachenko et al. 2004; Wawrzkiewicz et al. 2012; Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. 2020a).

Moreover, long-term correlation has also been found in ion channels present in membranes of organelles. Wawrzkiewicz-Jałowiecka et al. (2020b) observed long-term correlation in BK channels of mitochondrial membranes of human glioblas-toma cells. Long-range correlations were also observed in the current time series of ion channels present in the vacuolar membranes of red beets (*Beta vulgaris* L.) (Miśkiewicz et al. 2020). Therefore, it seems that long-term memory is a ubiquitous property of ion channels.

## 6 Modelling Long Memory

### 6.1 Chaotic Model

A chaotic system has a behavior that seems to be random. However, it is a simple process, governed by a specific function and strongly dependent on the initial conditions of the system (Rickles et al. 2007). A chaotic model of ion channel kinetics was initially proposed by Liebovitch and Toth (1991). This model is an iterated map composed of a piecewise linear function and assumes that the transitions between the different conductance states are not random. For the above authors, such transitions are generated by deterministic forces, where the current values (*i*) at time *t* is x(n), and the value of *i* at time  $t + \Delta t$  is x(n+1) a function of the value of *i* at time

*t*. Thus, the random variables x can be determined as a function of the values in the previous instants and the current values over time. However, it was shown by Bandeira and collaborators (2008), in our laboratory, that this model does not reproduce the memory observed in the experimental data.

Some recent chaotic models have been proposed to incorporate the memory effect in the system (Bahramian et al. 2019; Borys 2020; Juayerk-Herrera et al. 2020). Bahramian model is based on a chaotic map that considers ion channels as deterministic systems. This model describes the dwell-time series of the ion channel as a chaotic process and reproduce both the property of long-term memory present in the ion channel kinetics and the variability of the voltage dependent opening probability  $(P_{o})$ , observed in experimental data recorded with the patch-clamp technique.

In this model, the ion channel switches between two states, open and closed, where the ionic current values at time t are equal to  $x_{(n)}$  and the current value at time t + 1 is  $x_{(n+1)}$ , and the shape of the general one-dimensional map is given by:

$$x_{(n+1)} = f(x_{(n)}).$$
(10)

In modeling, the current value that delimits the open and closed states, *T*, is defined: if  $x_{(n)} < T$ , the channel is in the closed state; if  $x_{(n)} > T$ , the channel is in the open state.

The fluctuation of the current values has a bell-shaped behavior, and the modelling parameters of this chaotic map are  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\lambda$ , and  $\omega$ . Where  $\lambda$  represents the center of the curve,  $\alpha$  is the maximum amplitude of the curve,  $\beta$  represents the variance of y in relation to the mean, given by:

$$y = \frac{\alpha}{\left(1 + \left(\beta(x - \lambda)\right)^{\omega}\right)},\tag{11}$$

 $\omega$  is a value that affects the form of the curve. The map consists of four terms and a step function: The Upper part, represents the open state; the Bottom part, represents the closed state (see Fig. 2); the part that connects the Bottom to the Upper part, B - > U, and the fourth part U - > B term, that connects the Upper to the Bottom part; and a step function that is applied to shape a map function with the desired behavior.

The parameters  $\alpha_0$ ,  $\beta_0$ ,  $\lambda_0$  and  $\omega_0$  correspond to the Upper part; the parameters  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\lambda_1$ , and  $\omega_1$  shape the Bottom part; the parameters  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$ ,  $\lambda_2$ , and  $\omega_2$  correspond to B-> U, and finally, the parameters  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\lambda_3$ , and  $\omega_3$  correspond to U-> B in the map function. Then, the Bahramian et al. (2019) chaotic map is described as follows:

$$\begin{aligned} x_{(n+1)} &= \frac{\alpha_0}{\left(1 + \left(\beta_0 \left(x_{(n)} - \lambda_0\right)\right)^{\omega_0}\right)} + \frac{\alpha_1}{\left(1 + \left(\beta_1 \left(x_{(n)} - \lambda_1\right)\right)^{\omega_1}\right)} \\ &+ \frac{\alpha_2}{\left(1 + \left(\beta_2 \left(x_{(n)} - \lambda_2\right)\right)^{\omega_2}\right)} + \frac{\alpha_3}{\left(1 + \left(\beta_3 \left(x_{(n)} - \lambda_3\right)\right)^{\omega_3}\right)} \end{aligned}$$
(12)  
+ 0.75 \* step (x<sub>(n)</sub> - 0.7)

Adjustments in the  $\beta_2$  and  $\beta_3$  parameters allow the model to simulate time series with different values of the Hurst exponent and different P<sub>o</sub> values, properties that are present in the experimental data. According to the authors, lower values for  $\beta_2$ 



Fig. 2 Chaotic Map of the Bahramian et al. (2019) model. The Bottom part represents the closed state, and the Upper part represents the open state. The red line is a bisector of the first quadrant

cause an expansion in the B-> U part, and it is responsible for changing  $x_{(n)}$ , which changes to the open state in a short time. The increase in the value of  $\beta_3$  makes the U-> B part of the map narrower, which makes  $x_{(n)}$  to remain in the open state, the upper part of the map, for an extended time. Changes in the values of  $\beta_2$  and  $\beta_3$  can be related to the variations in the experimental data, such as voltage, and also modify the dwell-time in the open state, the open channel probability.

The model of Bahramian et al. (2019) was the first chaotic model able to simulate the dynamic behavior of an ion channel with the presence of long-term memory. It reproduces time series with different values of the Hurst exponent and the wide range of dwell time ratio like the time series found in the experimental data.

Borys (2020) observed that the Bahramian model is not able to return a persistent Hurst coefficient independent of the time scale. Instead, the chaotic map of this model produces a Hurst coefficient consistent with memory on a limited time scale, i. e., large time scales simulation of the series shows that the value of the Hurst exponent does not persist, tending to values close to 0.5, which is indicative of data randomness. Borys (2020) proposed a deterministic chaotic map to simulated the kinetic process of ion channels with a Hurst coefficient consistent with memory persisting for very long periods of observation. The limited-scale Hurst effect opens an important question which is worth investigating: do biological systems display real or limited Hurst effect (limited e.g., by the lifetime)?

The Borys model is a deterministic map composed by two regions, the positive region corresponds to the open state, and the negative region to the closed state. The variable  $x_{(n+1)} = F(x_n)$  fluctuates in the range of the entire domain of real numbers, and is composed by an integer part related to the long-term correlation, and a rational part, related to the chaotic behavior. A variable  $W_n$  (window size) is defined as dependent on the time spent in the dwell-time correlation. This variable imposes the condition that the longer the correlation the less likely it is to be interrupted. The probability that the channel changes the conductance state conserving the correlation is  $\alpha$ , and for changing the state losing the correlation is  $(1-\alpha)$ , thus the  $\alpha$  parameter controls the Hurst effect.

Borys (2020) proposed a possible biological interpretation of the Hurst effect consistent with the chaotic map. According to him, the gate undergoes stronger and stronger van der Waals interactions with the surrounding, over time. To switch from one state to another, it needs a large fluctuation, which may eject it from the initial state to the terminal state with higher energy, ensuring strong binding in that opposite state. Thus, a long dwell-time is expected again. Alternatively, the gate may change in a long stepwise process. This process would involve the partial transition of the gate and slow increasing of the binding strength in the opposite state.

#### 6.2 Dichotomous Stationary Process with Long-Range Correlations

Mercik and Weron (2001) have modeled the kinetic behavior of ion channels based on the experimental data of BK channels of *Schistocerca gregaria* muscle fibers. Those authors understood the ion channel dynamics as a dichotomous stochastic signal, being the presence of memory a consequence of the long-tail properties of the closed-time distribution. The values of the ionic current of the ion channel are distributed between two populations. The population closest to zero corresponds to the closed conductance state and the population with the highest values corresponds to the open state. Thus, the channel can be modeled as a dichotomous 0–1 signal.

Simulation of the ion current signal uses the results of the statistical analysis of the experimental data, such as the mean dwell-times and standard deviations in each conductance state and average ionic current values over time. The probability distributions of the residence time in each conductance state were constructed according to the experimental data, the open dwell-times are distributed according to an exponential, and the closed dwell-times are distributed according to the power-tailed Pareto law. The distribution of the simulated values of the current follows the same experimental behavior, a Gaussian distribution.

The modeling of the current signal has the following steps:

Initially, a series of random variables is generated:

$$\left\{T_k\right\}_{k=0,1,2,\dots} = \left\{\tau, \tau + \sum_{i=1}^k \left(T_{c,i} + T_{o,i}\right), k = 1,2\dots\right\}$$
(13)

representing the time instants in which the channel opens; the variable  $\tau$  represents a delay time, that could be open or closed, between the start of the reconstructed signal and the start of consecutive transitions between open and closed states.  $T_{c,i}$  and  $T_{o,i}$  are the closed and open times, respectively. The variable  $\tau$  is defined as follows:

$$\tau = (T_o^{(0)} + T_{c,0})B + T_c^{(0)}(1 - B),$$
(14)

where  $T_o^{(0)}$  and  $T_c^{(0)}$  are the open and closed times during the delay period, respectively, during the delay period, B is the Bernoulli random variable and  $\tau$  has the following probability distribution:

$$P\{\tau < t\} = \frac{1}{\langle T_c \rangle + \langle T_o \rangle} \int_0^t \{1 - [F_c * F_o](s)\} ds,$$
(15)

where  $F_c$  and  $F_o$  are the cumulative distribution functions for the periods of closed and open states, respectively, and the term  $[F_c * F_o](t)$  represents the convolution of the functions  $F_c$  and  $F_o$ , assuring that the series  $({T_k}_{k=1,2,3...})$ , is a stationary process.

Having done the previous step, we have the variables that describe the appearance of the open and closed state. So, it is possible to define the dichotomous process L(t):

$$L(t) = B1_{[0,T_{o,0})}(t) + \sum_{n=0}^{\infty} 1_{[T_n,T_n+T_{o,n+1})}(t),$$
(16)

where 1 is the indicator function, defined as

$$1_{[a,b)}(x) = \begin{cases} 1 \text{ if } x \in [a,b) \\ 0 \text{ if } x \notin [a,b) \end{cases}.$$

$$(17)$$

The dichotomous process L(t) is responsible for switching the system between the two conductance levels, open and closed states.

Based on the dichotomous sequence of opening and closing, the ionic current record is reconstructed. The independent random variables  $\{I_{o,n}\}_{n=1,2,3,...}$  and  $\{I_{c,n}\}_{n=1,2,3,...}$  are the ionic current values for the open and closed state, respectively, and with identical distribution with mean equal to  $\langle I_c \rangle = m$  and  $\langle I_O \rangle = M$ .

Finally, the *n*th current record is defined by:

$$I(n) = L(n\Delta t)I_{o,n} + [1 - L(n\Delta t)]I_{c,n},$$
(18)

where  $\Delta t = 1/f_{ex}$  and  $f_{ex}$  is the frequency at which the ionic current is modeled.

The fluctuation of the current values over time, I(t), is a stationary process with an autocorrelation function decreasing with a power-law determined by the power-tail exponent  $D_c$  of the closed dwell-time distribution.

The model proposed by Mercik and Weron (2001) was able to reproduce a system with long-term memory property. The results of the Hurst analysis, detrended fluctuation analysis, and Orey index showed mean values close to the experimental values. Also, the autocorrelation function of the simulated data presented results similar to those of the experimental data.

Although the proposed model can reproduce the presence of memory in the kinetic process of the ionic channels, one aspect that can be questioned is the fact that it reproduces only a system with stationary behavior. However, for some types of ion channels, such as voltage-dependent anion channels (Manna et al. 2007), the

current signal is not a stationary process. Thus, it is not a model that can be applied to simulate the behavior of all ion channels.

#### 6.3 Ion Channel Kinetics Model Based on Self-organized Criticality.

The self-organized criticality is a phenomenon that appears in systems subjected to a permanent disturbance, which naturally evolves over time to a critical state, without adjustments in external parameters and without sensitivity to initial conditions. However, in this critical state, the system is highly susceptible to small changes or noise, which can cause unpredictable reactions. The critical point in dynamic systems is an attractor reached by starting far from equilibrium. When the critical state is reached, the behavior of the system follows a power law (Bak et al. 1988).

An ion channel kinetics model based on self-organized criticality was proposed by Brazhe and Maksimov, in 2006. This model assumes that the ion channel is a dissipative complex system that can reach a self-organized critical state. At this point a local conformational disturbance can spread throughout the system, eventually resulting in a great conformational change. The model shows that self-organized criticality, and its statistical and fractal properties, fit the experimental data of BK channels.

The model assumes the amino acid residues of the ion channel protein as a hexagonal lattice, with matrix dimension of  $256 \times 256$ .

In the simulation, an arbitrary  $z_c$  ( $z_c \ge 0$ ) is initially determined, and a system site (*i*, *j*) is chosen randomly and disturbed (by the Brownian movement of the solvent):

$$z_{i,j} \to z_{i,j} + e, \tag{19}$$

where  $z_{i,j}$  is the conformational "tension" of the chosen location, and *e* is the parameter that describes the flux of energy in the system.

After the disturbance, if  $z_{i,j} > z_c$ , the site relaxes and disturbs the neighboring units:

$$z_{i,j} \to z_{i,j} - n, \left\{ z'_k \right\}_{i,j} \to \left\{ z'_k \right\}_{i,j} + 1, k = 1, ..., n,$$
(20)

where  $\{z'_k\}_{i,j}$  is the conformation of the neighboring units, and *n* is the neighbor number. Each unit in the system is related from 3 up to 6 neighboring units. If n < 6, the protein is simulated in a shape looser than the native protein. The  $z_{i,j}$  relaxation is repeated until  $z_{i,j} \le z_c$ . This is applied to all the neighbors that have become unstable. The perturbation from the solvent comes only when there are not any unstable sites in the system. If the neighbor index exceeds lattice dimensions, the excess of energy is dissipated back to the solution instead of exciting any lattice site.

The ion channel gate in this model is sensitive to the mean z ("tension") over the lattice. A threshold is stipulated that subdivide the system into an open and closed state. When the mean tension over the lattice is higher than the threshold the channel is assumed to be in the open state, and when the mean tension in smaller than

threshold, the channel is in the closed state. Both bursts and large dwell times arise quite naturally. Shifting the threshold will result in the change of open/closed ratio.

In the Brazhe and Maksimov (2006) model the mean dwell times decrease with the increase in e and for all numbers of neighbors. The increase in the energy flux into the system naturally leads to a shift to higher frequencies in the exchange dynamics of the lattice, that is, the value  $\langle z \rangle$  crosses the threshold more often, and the dwell-times become smaller. These authors showed that the model was able to generate the power-law behavior, the presence of long-term correlation, and fractal behavior in the system.

#### 6.4 Simple Random-Walk Models

According to Wawrzkiewicz et al. (2012), the long-term correlation exhibited by BK channels of human bronchial epithelial cells is not an inherent property of the channels, as it was earlier understood (e.g., Nogueira et al. 1995). Instead, a property introduced into the system by forces resulting from fluctuations in membrane thickness around the channel. To confirm their theory, they proposed two models to simulate the kinetic behavior of these channels (see Fig. 3) and tried to reproduce the effect of the fluctuations in the thickness of the membrane to generate memory behavior.

This model belongs to the class of diffusion models. It assumes that the conformational dynamics of gate activation is a discrete random walk carried out by the reaction coordinate x(t) on a unidimensional conformational space. The reaction coordinate position simulates the real opening angle of the nanopore of the ion channel, which is influenced by fluctuations in the lipid bilayer thickness.

The one-dimensional space is divided into two macro-states, closed and open. It is limited by two boundaries,  $B_{MAX}$  and  $B_{MIN}$ . It is composed of a lattice with N-nodes, each one representing a sub-state, with each sub-state related to a potential energy value. In model 1, x(t) performs the random walk in the conformational space delimited by the extremes,  $B_{MAX}$  and  $B_{MIN}$ , where the total amount of substates present in the entire conformational space is equal to 2  $B_{MAX}$ . However, x(t)only walks within the diffusional boundaries, B1 and B2, that move randomly and synchronously concerning TP, which is always kept in a central position concerning B1 and B2 on the one-dimensional space. TP is the position that determines the boundary between the open and closed states, and is related to a higher value of the energy potential. When x(t) is to the left of TP (negative values), the channel is closed, when it is to the right TP (positive values), the channel is open. The x(t)residence times in each of these states generate a simulated dwell-times series that can be analyzed through the same methodology used in the analysis of the series obtained experimentally. The simulation is run several times required to produce the time series with the desired sample size.

The switching between the macro-states is carried out by x(t) in a process of diffusion between the adjacent microstates through a simple random walk. During the walk, the probability of x(t) to move one to the right (p) and the left (q) is:



**Fig. 3** Schematic illustration of the ion channel kinetics models proposed by Wawrzkiewicz et al. (2012). The conformational space has 20 nodes used as the diffusive space, where the negative part corresponds to the closed states of the channel, and the positive nodes correspond to the open state. *TP* (threshold points) divide the one-dimensional space into sets of closed and open states. The reaction coordinate *x* represents the actual conformation of the activation gate. The green, red and blue lines are the schematic representations of the potential function associated with models. The energy variation profile in the open and closed states is specific in each model and can be modified in different ways, by the action of the drift force. a. Schematic representation of Model 1. In this model TP is kept fixed and the one-dimensional space is limited by the two mobile boundaries *B1* and *B2*, which simultaneously decreasing or expanding the accessible place to *x*. b. Schematic illustration and closed state to have different sizes, which does not occur in model 1), and the boundaries *B1* and *B2* are kept constant. (Color figure online)

$$p = \frac{1}{2} - \frac{\Delta U}{4kT} and q = \frac{1}{2} + \frac{\Delta U}{4kT},$$
(21)

where  $\Delta U$  is the potential energy difference of the current position of x(t), k is the Boltzmann constant and T is the absolute temperature.

Before the simulation begins, the initial position of variables B1, B2, and x(t) are determined, and TP fixed as equal to zero, is a central point between B1 and B2. The x(t) walks randomly from node to node, one sub-state at a time.

In this computational model, it is also necessary to establish optimal initial values for the system variables, from which the data are obtained. The definition of these variables occurs through the Gradient Optimization Technique, which analyzes the errors of the data obtained for different values of the variables, seeking to find a combination of optimal variables where the error between the experimental and simulated data is minimal. In model 1, the long-term memory property in the ion channel kinetics is introduced by the synchronized fluctuations of the moveable variables B1 and B2, decreasing or increasing the number of sub-states within the conformational space. The movement of B1 and B2 is related to thermal fluctuations in the lipid bilayer thickness and internal forces inside the protein, which reduce the conformational space of the closed and open states. B1 and B2 change the position after *n* transitions of the x(t) and the *n* values is determined by the following equation which emerges from fitting to the experimental data:

$$D_B = \frac{D_{RC}}{600},\tag{22}$$

where  $D_B$  is the boundary diffusion coefficient, and  $D_{RC}$  denotes the diffusion coefficient of the reaction coordinate.

In model 1, the changes in membrane thickness, squeezing and relaxation, act on the gate conformational space boundaries. It modifies the density of charges within the gate region, and thus the atoms have less space to perform the conformational changes necessary to switch among the different conductance states. Therefore, the number of sub-states within the open and closed macro states varies over time. Membrane squeezing favors the channel to close *TP*, which increases the switching probability between open and closed, and relaxation promotes the opposite. Therefore, the deterministic behavior of the kinetic process may be a consequence of the synchronized fluctuations of the activation gate conformational space boundaries.

In model 2, on the other hand, the deterministic behavior is introduced on the channel kinetics through changes in the channel protein density fluctuations, which results essentially from internal tensions of the channel protein tending to eject the gating elements to distant locations. This is accomplished by a synchronous drifting force acting on x(t) producing synchronized changes in the energy of the conformational states of the protein. The membrane relaxation promotes the occupancy of x(t) in sub-states near the threshold, increasing the switching probability between the closed and open states. On the other hand, the membrane compression promotes the occupancy of x(t) in sub-states near the conformational boundaries, increasing the probability of staying in the same state.

The difference between models 1 and 2 is in the opposite action of the fluctuation in the thickness of the lipid bilayer on the ion channels kinetics. Membrane compression promotes shorter dwell-time in model 1 and longer dwell-times in model 2.

Both models can reproduce a dichotomous process that mimics the value of the ionic current over time, transiting between two populations of current values. The dwell-times of the open and closed states present long-range correlation, like that found in experimental data of BK channels. However, the distribution of the closed-state dwell-times obtained in the analysis of data simulated by model 2 does not follow a power law, but rather an exponential tail, which is not in agreement with the experimental data.

Miśkiewicz et al. (2020) demonstrated that this model could simulate the kinetic process and the presence of long-term memory not only for BK channels. They used model 1 of Wawrzkiewicz et al. (2012) to simulate the current signal of the

non-selective slow activated cationic channels (SV) of the vacuolar membrane of *Beta vulgaris*. The reconstruction of the kinetic process of these channels with this model was able to generate data similar to the experimental results with long memory.

### 7 Memory Source

The gating domains in ion channels are distributed over a large portion of the protein. They are capable of sensing variations in transmembrane potentials that serve as a stimulus for the exchange between the different conformational states of the channels. This ion channel gating mechanism requires the movement of a large fraction of the protein mass across the lipid bilayer, which occurs in response to a specific voltage. If the energy from this process overcomes the energy barrier, the ion channel switches between two conformational states. Several forces influence the movement of only one voltage-sensor: a restoring force, due to the elastic property of the protein molecule; a damping force, resulting from the viscosity of the environment in which the sensor is located; and an electrostatic driving force, due to the interactions between the sensor and the environment. When regions of the voltage-sensors begin to move from their initial positions, they experience an imbalance in electrostatic force due to their mutual interactions. Hence, depending on the initial conditions of the voltage sensor conformation, fluctuations of different amplitudes occur in the regions of the sensors. This process can be understood as a forced oscillator and the movement of a set of sensors could be understood as coupled oscillators (Manna et al. 2007). These oscillators are energetically generated by two or more driving forces present in the system, in the environment, or both. These coupled oscillators can generate the long-term correlation (memory) present in the channels.

It is important to emphasize that the interactions between voltage sensors are independent of the presence or absence of an external electric field. In this way, even at a constant potential (or zero) applied to the membrane, voltage sensors (gate charge) interact with each other and with the surrounding, allowing coupling. Thus, long-term correlation is expected even at constant or zero voltages.

Wawrzkiewicz et al. (2012) assign the origin of memory to forces, generated by fluctuations in the thickness of the lipid membrane, which act on the channel-forming protein. They attribute the presence of long-term memory in the ion channels kinetics to the combined action of the lipid bilayer and the channelforming protein. The action of the lipid bilayer could introduce the property of memory through local fluctuations in the thickness of the membrane surrounding the channel, as discussed above. These fluctuations could modify the density of atoms in the gating domain of the ion channel through two ways: through synchronous fluctuations at the limits of the conformational space in which a reaction coordinate describes a random walk (such coordinate is seen as an abstract variable) but that may be related to the opening angle of the glycine ring present in the region of the channel gate; or through synchronized changes in the energy structure of open and closed states. This model was able to reproduce the property of long-term memory in simulations of ion channels of the BK type in a way similar to the experimental results.

De La Fuente et al. (2017) related the long-term memory found in the kinetic behavior of calcium-activated chloride channels to the metabolic memory dynamics described in the Cellular Metabolic Structure Theory (CMS) proposed by De La Fuente (2015). According to this theory, cells can process information and store metabolic memory. The CMS proposes two mechanisms to store catalytic patterns: the first occurs by regulating the enzymatic activities by the dynamics of Hopfield-like attractors. These attractors store patterns that can be retrieved by a particular stimulus; the second mechanism would occur through covalent post-translational modifications of the enzymes, and thus the functional memory can be reversibly added through stable molecular marks. According to De La Fuente et al. (2013), the property of memory is a fundamental requirement for efficient information process-ing. They believe that molecular information can be stored and retrieved correctly by specific stimuli.

# 8 Conclusions

Understanding the behavior of ion channels is particularly important because they are involved in several life processes and are responsible for the emergence of numerous diseases. However, their functioning is not yet fully understood, even though recent methodologies have been applied in the study of ion channel kinetics, such as the simultaneous recording of single-channel conductance and fluorescence resulting from molecular conformational changes. Nevertheless, some biophysical mechanisms operate on a time scale that is still undetectable by current methodologies. Thus, the study of these properties through computational modeling, simulations, and application of mathematical methods plays an important supporting role to experimental studies. It has generated much of the current understanding of the mechanisms and the biophysical bases behind these processes.

However, it is necessary to keep in mind that modeling and simulations must consider the results from experimental studies. Many researchers have already shown that the kinetic behavior of several types of ion channels is not random, but rather, governed by specific laws, with a deterministic behavior presenting the property of long-term memory over time. The use of models and simulations for the study of both ion channel-forming proteins, as well as the physiological processes in which ion channels are involved, must take this property into account and be able to incorporate it to describe experimental data.

Acknowledgements We are grateful to Dr Edbhergue Ventura Lola Costa for critical review of the manuscript. The authors would like to thank the Morphology and Physiology Department of UFRPE, the Coordination of the Animal Bioscience Post Graduate Program (PPGBA), the Laboratory of Computational Analysis of Complex Realities of the Research Support Center—UFRPE (CENAPESQ), and Laboratory of Membrane Biophysics and Stem Cell Oleg Krasilnikov of the Biophysics and Radiobiology Department of UFPE for providing technical support. **Funding** This study was supported by the Brazilian support agency Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

# References

- Aguiar LAA, Silva IMS, Fernandes TS, Nogueira RA (2015) Long-term correlation of the electrocorticogram as a bioindicator of brain exposure to ionizing radiation. Braz J Med Biol Res. https://doi.org/ 10.1590/1414-431X20154473
- Arias-Calluari K, Najafi M, Harré MS, Alonso-Marroquin F (2019) Stationarity of the detrended time series of S&P500. arXiv preprint
- Astashev ME, Kazachenko VN, Grigoriev PA (2007) Alamethicin channel kinetics: Studies using fluctuation analysis and multifractal fluctuation analysis. Biochem Moscow Suppl Ser A 1(3):246–252. https://doi.org/10.1134/S1990747807030087
- Bahramian A, Nouri A, Baghdadi G, Gharibzadeh S, Towhidkhah F, Jafari S (2019) Introducing a chaotic map with a wide range of long-term memory as a model of patch-clamped ion channels current time series. Chaos, Solitons Fractals 126:361–368. https://doi.org/10.1016/j.chaos.2019.07.018
- Baillie RT (1996) Long memory processes and fractional integration in econometrics. J Econometric 73(1):5–59. https://doi.org/10.1016/0304-4076(95)01732-1
- Bak P, Tang C, Wiesenfeld K (1988) Self-organized criticality. Phys Rev A 38(1):364
- Bandeira HT, Barbosa CT, Oliveira RC, Aguiar JF, Nogueira RA (2008) Chaotic model and memory in single calcium-activated potassium channel kinetics. Chaos 18(3):033136-033136–6. https://doi. org/10.1063/1.2944980
- Bassil G, Zarzoso M, Noujaim SF (2017) Allometric scaling of electrical excitation and propagation in the mammalian heart. J Theor Biol 419:238–242. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.09.024
- Beran J, Feng Y, Ghosh S, Kulik R (2013) Definition of long memory. In: Beran J, Feng Y, Ghosh S, Kulik R (eds) Long-Memory Processes. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 209–384
- Borys P (2020) Long term Hurst memory that does not die at long observation times—Deterministic map to describe ion channel activity. Chaos, Solitons Fractals 132:109560. https://doi.org/10.1016/j. chaos.2019.109560
- Brazhe AR, Maksimov GV (2006) Self-organized critical gating of ion channels: on the origin of longterm memory in dwell time series. Chaos: An Interdisc J Nonlinear Sci 16(3):033129. https://doi. org/10.1063/1.2355657
- Busha BF, Banis GA (2017) Stochastic and integrative model of breathing. Respir Physiol Neurobiol 237:51–56. https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.12.012
- Castro CROB, Moraes Rb, Silva JRF et al (2014) Detrended fluctuation analysis applied to ECG in dogs subjected to physical effort. Exp Clin Cardiol 20(9):5068–5073
- Chen XJ, Luo CH, Chen MH, Zhou X (2019) Combination of "quadratic adaptive algorithm" and "hybrid operator splitting" or uniformization algorithms for stability against acceleration in the Markov model of sodium ion channels in the ventricular cell model. Med Biol Eng Comput 57(6):1367–1379. https://doi.org/10.1007/s11517-019-01956-5
- Colquhoun D, Hawkes AG (1977) Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. Proc R Soc Lond B 199(1135):231–262. https://doi.org/10.1098/rspb.1977. 0137
- Colquhoun D, Hawkes AG (1981) On the stochastic properties of single ion channels. Proc R Soc Lond B 211(1183):205–235. https://doi.org/10.1098/rspb.1981.0003
- Colquhoun D, Hawkes AG (1994) The interpretation of single channel recordings. In: Ogden DC (ed) Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook, 2nd edn. The Company of Biologists Ltd., Cambridge, pp 141–188
- De La Fuente IM (2015) Elements of the cellular metabolic structure. Front Mol Biosci 2:16. https://doi. org/10.3389/fmolb.2015.00016
- De La Fuente IM, Cortes JM, Pelta DA, Veguillas J (2013) Attractor Metabolic Networks Plos One 8(3):e58284. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058284
- De La Fuente IM, Malaina I, Pérez-Samartín A et al (2017) Dynamic properties of calcium-activated chloride currents in *Xenopus laevis* oocytes. Sci Rep 7:41791. https://doi.org/10.1038/srep41791

- Djawad YA, Attwood D, Kiely J, Luxton R (2019) The application of detrended fluctuation analysis to assess physical characteristics of the human cell line ECV304 following toxic challenges. Sens Bio-Sens Res 23(2019):100269. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2019.100269
- Dreyer I, Müller-Röber B, Köhler B (2018) Voltage-gated ion channels. In: Zheng J, Trudeau MC (Ed) Annual Plant Reviews, vol 15. CRC Press, pp 169–215. https://doi.org/10.1002/9781119312994. apr0146
- Fermini B (2008) Recent Advances in Ion Channel Screening Technologies. In: Fermini B, Priest BT (Org.) Ion Channel: Top Med Chem, Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–25. https://doi.org/10.1007/ 7355\_2008\_024
- Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Brugada J, Brugada R, Campuzano O (2017) Cardiac channelopathies and sudden death: recent clinical and genetic advances. Biology 6(1):7. https://doi. org/10.3390/biology6010007
- Freer S, Simmons S, Laucht A, Muhonen JT, Dehollain JP, Kalra R, Jamieson DN (2017) A single-atom quantum memory in silicon. Quantum Sci Technol 2(1):015009. https://doi.org/10.1088/2058-9565/ aa63a4
- Fuliński A, Grzywna Z, Mellor I, Siwy Z, Usherwood PNR (1998) Non-Markovian character of ionic current fluctuations in membrane channels. Phys Rev E 58(1):919–924. https://doi.org/10.1103/ PhysRevE.58.919
- Furutani K, Docken S, Vorobyov IV et al (2019) A Kinetic Mechanism Underlying hERG Facilitation by a Blocker. Biophys J 116(3):245a. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.1343
- Gallistel CR, King AP (2009) Memory and the computational brain: Why cognitive science will transform neuroscience. Wiley-Blackwell, New York
- Giraitis L, Kokoszka P, Leipus R, Teyssière G (2003) Rescaled variance and related tests for long memory in volatility and levels. J Econometr 112(2):265–294
- Grandi E, Puglisi JL, Wagner S, Maier LS, Severi S, Bers DM (2007) Simulation of Ca-calmodulindependent protein kinase II on rabbit ventricular myocyte ion currents and action potentials. Biophys J 93(11):3835–3847
- Gupta V, Mittal M, Mittal V (2020) Chaos theory: an emerging tool for arrhythmia detection. Sens Imaging 21(1):1–22. https://doi.org/10.1007/s11220-020-0272-9
- Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes, 3rd edn. Sinauer, Sunderland
- Hu K, Ivanov PC, Chen Z, Carpena P, Stanley HE (2001) Effect of trends on detrended fluctuation analysis. Phys Rev E 64(1):011114-1-0111141–9. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.64.011114
- Hudetz AG, Liu X, Pillay S, Boly M, Tononi G (2016) Propofol anesthesia reduces Lempel-Ziv complexity of spontaneous brain activity in rats. Neurosci Lett 628:132–135. https://doi.org/10.1016/j. neulet.2016.06.017
- Hughes TA, Lee J (2015) A new test for short memory in long memory time series. Am Stat 69(3):182– 190. https://doi.org/10.1080/00031305.2015.1056829
- Hunt NH (2016) Autocorrelation function, mutual information, and correlation dimension. In: Stergiou N (ed), Nonlinear analysis for human movement variability. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 301–342
- Hurst H (1951) Long term storage capacity of reservoirs. Trans Amer Soc Civil Eng 6:770-799
- Hutchings CJ, Colussi P, Clark TG (2019) Ion channels as therapeutic antibody targets. Mabs 11(2):265–296. https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1548232
- Juayerk-Herrera KL, Félix-Martínez GJ, Picones A, Del-Río-Correa JL, Godínez-Fernández JR (2020) Deterministic modeling of single-channel and whole-cell currents. J Theor Biol 508:110459. https:// doi.org/10.1016/j.jtbi.2020.110459
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds) (2000) Principles of neural science, 2nd edn. McGraw-Hill, New York
- Kantelhardt JW, Koscielny-Bunde E, Rego HH, Havlin S, Bunde A (2001) Detecting long-range correlations with detrended fluctuation analysis. Phys A 295(3–4):441–454
- Kantelhardt JW, Zschiegner SA, Koscielny-Bunde E, Havlin S, Bunde A, Stanley HE (2002) Multifractal detrended fluctuation analysis of nonstationary time series. Phys A 316(1–4):87–114. https://doi. org/10.1016/S0378-4371(02)01383-3
- Kazachenko VN, Kochetkov KV, Astashev ME, Grinevich AA (2004) Fractal properies of gating in potential-dependent K<sup>+</sup>-channels in Lymnaea stagnalis neurons. Biofizika 49(5):852–865
- Kim J-B (2014) Channelopathies. Korean. J Pediatr 57(1):1–18. https://doi.org/10.3345/kjp.2014.57.1.1
- Kim J, Shah D, Potapov I, Latukka J, Aalto-Setälä K, Räsänen E (2019) Scaling and correlation properties of RR and QT intervals at the cellular level. Sci Rep 9(1):1–9. https://doi.org/10.1038/ s41598-019-40247-9

- Kline J, Costantini O (2019) Inherited cardiac arrhythmias and channelopathies. Med Clin 103(5):809–820. https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.05.001
- Kochetkov KV, Kazachenko VN, Aslanidi OV, Chemeris NK, Gapeyev AB (1999) Non-markovian gating of Ca 2<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cultured kidney cells Vero Rescaled Range Analysis. J Biol Phys 25(2–3):211–222. https://doi.org/10.1023/A:1005167101298
- Kuzmenkin A, Hang C, Kuzmenkina E, Jurkat-Rott K (2007) Gating of the HypoPP-1 mutations: I. Mutant-specific effects and cooperativity. Pflügers Arch-Eur J Physiol 454(3):495–505. https:// doi.org/10.1007/s00424-007-0225-3
- Lan TH, Xu BQ, Yuan HJ, Lin JR (2003) Rescaled range analysis applied to the study delayed rectifier potassium channel kinetics. Biophys Chem 106(1):67–74. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00174-1
- Lan TH, Gao ZY, Abdalla AN, Cheng B, Wang S (2008) Detrended fluctuation analysis as a statistical method to study ion single channel signal. Cell Biol Int 32(2):247–252. https://doi.org/10.1016/j. cellbi.2007.09.001
- Lascano AM, Korff CM, Picard, (2016) Seizures and epilepsies due to channelopathies and neurotransmitter receptor dysfunction: a parallel between genetic and immune aspects. Mol Syndromol 7(4):197–209. https://doi.org/10.1159/000447707
- Lea PV (2018) Encryption of executables in computational memory. U.S. Patent No. 9,996,479. U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC
- Lendlein A, Kelch S (2002) Shape-memory polymers. Angew Chem Int 41(12):2034–2057. https:// doi.org/10.1002/1521-3773(20020617)41:12%3c2034::AID-ANIE2034%3e3.0.CO;2-M
- Li W, Kaneko K (1992) Long-range correlation and partial 1/fα spectrum in a noncoding DNA sequence. Europhys Lett 17(7):655. https://doi.org/10.1209/0295-5075/17/7/014
- Liebovitch LS, Krekora P (2002) The physical basis of ion channel kinetics: the importance of dynamics. In: Layton HE, Weinstein AM (eds) Membrane Transport and Renal Physiology, The IMA Volumes in Mathematics and Its Applications, Minneapolis, pp 27–52
- Liebovitch LS, Toth TI (1991) A model of ion channel kinetics using deterministic chaotic rather than stochastic processes. J Theor Biol 148(2):243–267. https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05) 80343-1
- Liebovitch LS, Fischbarg J, Koniarek JP (1987) Ion channel kinetics: a model based on fractal scaling rather than multistate Markov processes. Math Biosci 84(1):37–68. https://doi.org/10.1016/ 0025-5564(87)90042-3
- Lipscombe D, Wyllie DJA (2018) Editorial Overview: Ion Channels. Current Opinion in Physiology
- Liu W, Caffrey M (2005) Gramicidin structure and disposition in highly curved membranes. J Struct Biol 150(1):23–40. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.12.007
- Makowiec D, Fuliński A (2010) Multifractal detrended fluctuation analysis as the estimator of longrange dependence. Acta Phys Pol, B 41(5):1025–1050
- Mandelbrot BB, Van Ness JW (1968) Fractional Brownian motions, fractional noises and applications. SIAM Rev 10(4):422–437. https://doi.org/10.1137/1010093
- Mandelbrot BB, Wallis JR (1968) Noah, Joseph, and operational hydrology. Water Resour Res 4(5):909–918. https://doi.org/10.1029/WR004i005p00909
- Mandelbrot BB, Wallis JR (1969a) Robustness of the rescaled range R/S in the measurement of noncyclic long run statistical dependence. Water Resour Res 5(5):967–988. https://doi.org/10.1029/ WR005i005p00967
- Mandelbrot BB, Wallis JR (1969b) Some long-run properties of geophysical records. Water Resour Res 5(2):321–340. https://doi.org/10.1029/WR005i002p00321
- Manna S, Banerjee J, Ghosh S (2007) Breathing of voltage dependent anion channel as revealed by the fractal property of its gating. Phys A 386(1):573–580. https://doi.org/10.1016/j.physa.2007. 06.049
- Matos JA, Gama SM, Ruskin HJ, Al Sharkasi A, Crane M (2008) Time and scale Hurst exponent analysis for financial markets. Phys A 387(15):3910–3915. https://doi.org/10.1016/j.physa.2008. 01.060
- Mercik S, Weron K (2001) Stochastic origins of the long-range correlations of ionic current fluctuations in membrane channels. Phys Rev E 63(5):051910-1-051910–10. https://doi.org/10.1103/ PhysRevE.63.051910
- Mercik S, Weron K, Siwy Z (1999) Statistical analysis of ionic current fluctuations in membrane channels. Phys Rev E 60(6):7343–7348. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.60.7343

- Miśkiewicz J, Trela Z, Burdach Z, Karcz W, Balińska-Miśkiewicz W (2020) Long range correlations of the ion current in SV channels. Met3PbCl influence study. Plos One 15(3):e0229433. https:// doi.org/10.1371/journal.pone.0229433
- Morettin PA, Toloi CMC (2004) Análise de Séries Temporais. Edgard Blücher LTDA, São Paulo
- Nascimento RS, Araujo LHG, Moraes RB, Barbosa CT, Guedes RC, Nogueira RA, Stošić T (2010) Analysis of signal fluctuations of cortical spreading depression: preliminary findings. Phys A 389(9):869–1873. https://doi.org/10.1016/j.physa.2010.01.010
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature 260(5554):799–802. https://doi.org/10.1038/260799a0
- Nogueira RA, Varanda WA, Liebovitch LS (1995) Hurst analysis in the study of ion channel kinetics. Braz J Med Biol Res 28(4):491–496
- Oliveira RC, Barbosa CTF, Consoni LHA, Rodrigues ARA, Varanda WA, Nogueira RA (2006) Longterm correlation in single calcium-activated potassium channel kinetics. Phys A 364:13–22. https://doi.org/10.1016/j.physa.2005.08.057
- Peng CK, Buldyrev SV, Havlin S, Simons M, Stanley HE, Goldberger AL (1994) Mosaic organization of DNA nucleotides. Phys Rev E 49(2):1685. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.49.1685
- Peng CK, Havlin S, Stanley HE, Goldberger AL (1995) Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in non-stationary heartbeat time series. Chaos 5(1):82–87. https://doi.org/10. 1063/1.166141
- Peng ZY, Lan TH, Yang L, Mei HC, Ping JH, Jie XY, Lin CX (2012) Existence of memory in membrane channels: analysis of ion current through a voltage-dependent potassium single channel. Cell Biol Int 36(11):973–979. https://doi.org/10.1042/CB120110673
- Pradeu T, Du Pasquier L (2018) Immunological memory: What's in a name? Immunol Rev 283(1):7– 20. https://doi.org/10.1111/imr.12652
- Rickles D, Hawe P, Shiell A (2007) A simple guide to chaos and complexity. J of Epidemiol Commun H 61(11):933–937. https://doi.org/10.1136/jech.2006.054254
- Sampson KJ, Iyer V, Marks AR, Kass RS (2010) A computational model of Purkinje fibre single cell electrophysiology: implications for the long QT syndrome. J Physiol 588(14):2643–2655. https:// doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187328
- Sansom MS, Ball FG, Kerry CJ, McGee R, Ramsey RL, Usherwood PN (1989) Markov, fractal, diffusion, and related models of ion channel gating. A comparison with experimental data from two ion channels. Biophys J 56(6):1229–1243. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82770-5
- Santos R, Ursu O, Gaulton A et al (2017) A comprehensive map of molecular drug targets. Nat Rev Drug Discov 16(1):19. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230
- Schmandt NT, Galán RF (2012) Stochastic-shielding approximation of Markov chains and its application to efficiently simulate random ion-channel gating. Phys Rev Lett 109(11):118101-1-11810– 15. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.118101
- Siwy Z, Mercik S, Weron K, Ausloos M (2001) Application of dwell-time series in studies of longrange correlation in single channel ion transport: analysis of ion current through a big conductance locust potassium channel. Phys A 297(1–2):79–96. https://doi.org/10.1016/S0378-4371(01) 00194-7
- Siwy Z, Ausloos M, Ivanova K (2002) Correlation studies of open and closed state fluctuations in an ion channel: Analysis of ion current through a large-conductance locust potassium channel. Phys Rev E 65(3):031907. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.65.031907
- Stanley HE, Amaral LN, Goldberger AL, Havlin S, Ivanov PC, Peng CK (1999) Statistical physics and physiology: monofractal and multifractal approaches. Phys A 270(1–2):309–324. https://doi. org/10.1016/S0378-4371(99)00230-7
- Szasz O, Vincze G, Szigeti GP, Benyo Z, Szasz A (2018) An allometric approach of tumor-angiogenesis. Med Hypotheses 116:74–78. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.03.015
- Varanda WA, Liebovitch LS, Figueiroa JN, Nogueira RA (2000) Hurst analysis applied to the study of single calcium-activated potassium channel kinetics. J Theor Biol 206(3):343–353. https://doi. org/10.1006/jtbi.2000.2131
- Wawrzkiewicz A, Pawelek K, Borys P, Dworakowska B, Grzywna ZJ (2012) On the simple random-walk models of ion-channel gate dynamics reflecting long-term memory. Eur Biophys J 41(6):505–526. https://doi.org/10.1007/s00249-012-0806-8
- Wawrzkiewicz-Jałowiecka A, Trybek P, Machura Ł, Dworakowska B, Grzywna ZJ (2018) Mechanosensitivity of the BK Channels in human glioblastoma cells: kinetics and dynamical complexity. J Membr Biol 251(5–6):667–679. https://doi.org/10.1007/s00232-018-0044-9

- Wawrzkiewicz-Jałowiecka A, Trybek P, Borys P, Dworakowska B, Machura Ł, Bednarczyk P (2020a) Differences in gating dynamics of BK channels in cellular and mitochondrial membranes from human glioblastoma cells unraveled by short-and long-range correlations analysis. Cells 9(10):2305. https://doi.org/10.3390/cells9102305
- Wawrzkiewicz-Jałowiecka A, Trybek P, Dworakowska B, Machura Ł (2020b) Multifractal properties of BK channel currents in human glioblastoma cells. J Phys Chem B 124(12):2382–2391. https://doi. org/10.1021/acs.jpcb.0c00397

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.