

UM MODELO MATEMÁTICO-COMPUTACIONAL DO PAPEL DO CÁLCIO NA
DOENÇA DE ALZHEIMER

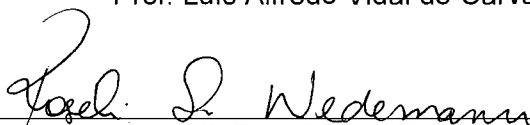
Fábio Barreto

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA DE
SISTEMAS E COMPUTAÇÃO.

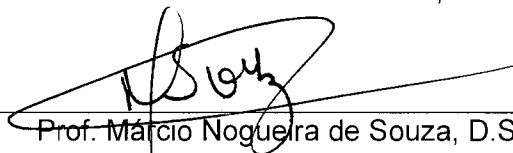
Aprovada por:



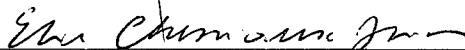
Prof. Luís Alfredo Vidal de Carvalho, D.Sc.



Prof.^a Roseli Suzi Wedemann, D.Sc.



Prof. Márcio Nogueira de Souza, D.Sc.



Prof. Elie Cheniaux Júnior, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

ABRIL DE 2005

BARRETO, FÁBIO

Um Modelo Matemático-Computacional
do Papel do Cálcio na Doença de
Alzheimer [Rio de Janeiro] 2005

VII,101 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ,
M.Sc., Engenharia de Sistemas e
Computação)

Tese – Universidade Federal do Rio de
Janeiro, COPPE

1. Doença de Alzheimer

2. Modelo do cálcio intracelular

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

UM MODELO MATEMÁTICO-COMPUTACIONAL DO PAPEL DO CÁLCIO NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Fábio Barreto

Abril/2005

Orientador: Luís Alfredo Vidal de Carvalho

Programa: Engenharia de Sistemas e Computação

Este trabalho desenvolve um modelo matemático computacional do papel do cálcio na doença de Alzheimer. A modelagem consiste em criar diagramas que representam processos neuronais ligados a doença de Alzheimer, como excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, alteração da membrana plasmática causada pelo influxo de cálcio, etc.. Com tais diagramas, nos conseguimos construir equações algébricas ou diferenciais que representa matematicamente os processos neurofisiológicos. Além disso, desenvolvemos parte de um sistema que resolve tais equações. Foi simulado um neurônio normal observando somente os processos relevantes para Doença de Alzheimer. Depois disto, provocamos danos nas estruturas envolvidas na doença para ver o comportamento das mesmas.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

A MATHEMATICAL-COMPUTACIONAL MODEL OF THE ROLE OF CALCIUM IN
ALZHEIMER'S DISEASE

Fábio Barreto

April/2005

Advisor: Luís Alfredo Vidal de Carvalho

Department: Engineering of Systems and Computation

This work develops a mathematical-computational model of the role of calcium in Alzheimer's disease. The model consists of creating diagrams that represent neuronal processes. Based on such diagrams we build algebraic or differential equations that represent mathematically neurophysiologic processes. Moreover, we develop part of a system that solves such equations. A normal neuron was simulated observing only the important processes involved in Alzheimer's disease. After this we provoked damages in the structures involved in the disease and observed their behavior.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)	3
2.1. CARACTERÍSTICAS DA DOENÇA DE ALZHEIMER	4
3. A IMPORTÂNCIA DO CÁLCIO NO CÉREBRO	7
3.1. O CÁLCIO NO CÉREBRO	8
3.2. O CÁLCIO NO ENVELHECIMENTO DO CÉREBRO	8
4. O METABOLISMO DO CÁLCIO	10
4.1. MANUTENÇÃO DOS NÍVEIS DE CÁLCIO	10
4.1.1. <i>Ativação dos Canais de Cálcio Regulados por Voltagem</i>	<i>12</i>
4.1.2. <i>Canais de Cálcio Regulados por Ligantes</i>	<i>15</i>
4.1.2.1. Receptores NMDA.....	17
4.1.2.2. Receptores AMPA.....	18
4.1.2.3. Receptores GABA.....	19
4.1.2.4. Receptores Metabotrópicos.....	20
4.1.3. <i>Cálcio no Reticulo Endoplasmático</i>	<i>21</i>
4.1.4. <i>Cálcio Ligado a Proteína</i>	<i>22</i>
4.1.5. <i>Cálcio na Mitocôndria</i>	<i>22</i>
4.2. MITOCÔNDRIA	25
4.3. BOMBAS ELETROQUÍMICAS DE CÁLCIO	27
4.4. POTENCIAL DA MEMBRANA	28
4.5. NÍVEIS DE GLICOSE	29

4.6.	LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES	30
5.	O CÁLCIO NA DOENÇA DE ALZHEIMER	32
5.1.	HIPÓTESE DA FORMAÇÃO DE CANAIS DE CÁLCIO POR PROTEÍNA B AMILÓIDE	32
5.2.	HIPÓTESE DAS ESPÉCIES REATIVAS DO METABOLISMO DO OXIGÊNIO	33
5.3.	HIPÓTESE DO MAL FUNCIONAMENTO DA MITOCÔNDRIA	34
5.4.	HIPÓTESE DA EXCITOTOXICIDADE NEURONAL.....	36
5.5.	HIPÓTESE DO ENVELHECIMENTO JUNTO COM AB E O EQUILÍBRIO DO CÁLCIO.....	39
5.6.	HIPÓTESE DAS ALTERAÇÕES NA MEMBRANA CAUSADA PELA PROTEÍNA QUINASE	40
6.	A MODELAGEM DO CA²⁺ NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	41
6.1.	METABOLISMO DO CÁLCIO.....	42
6.1.1.	<i>Manutenção dos Níveis de Cálcio</i>	<i>43</i>
6.1.2.	<i>Equilíbrio Potencial da Membrana Celular.....</i>	<i>44</i>
6.1.3.	<i>Acionamento das Bombas de Cálcio</i>	<i>46</i>
6.1.4.	<i>Níveis de Glicose.....</i>	<i>47</i>
6.1.5.	<i>Liberação de Neurotransmissor</i>	<i>49</i>
6.1.6.	<i>Mitocôndria.....</i>	<i>50</i>
6.2.	MANUTENÇÃO DOS NÍVEIS DE CÁLCIO.....	51
6.2.1.	<i>Ativação dos Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem.....</i>	<i>52</i>
6.2.2.	<i>Cálcio Ligado a Proteína.....</i>	<i>52</i>
6.2.3.	<i>Ativação do Sistema Fosfoinositídeo</i>	<i>53</i>
6.2.4.	<i>Acúmulo de Cálcio no Reticulo Endoplasmático</i>	<i>55</i>
6.2.5.	<i>Acumulo de Cálcio Livre.....</i>	<i>56</i>
6.2.6.	<i>Receptores Ionotrópicos.....</i>	<i>56</i>
6.2.6.1.	<i>Ativação do Receptores NMDA</i>	<i>56</i>
6.2.6.2.	<i>Ativação do Receptores AMPA.....</i>	<i>58</i>
6.2.6.3.	<i>Ativação dos Receptores GABA</i>	<i>58</i>
6.2.7.	<i>Ativação dos Receptores Metabotrópicos</i>	<i>59</i>
6.3.	MITOCÔNDRIA	60

6.3.1.	<i>PTPM</i>	61
6.3.2.	<i>Cálcio Mitocondrial</i>	63
6.3.3.	<i>Equilíbrio do Potencial da Mitocôndria</i>	63
6.3.4.	<i>pH</i>	63
6.3.5.	<i>Síntese do ATP</i>	64
7.	RESULTADOS	65
7.1.	<i>Simulação de uma célula normal</i>	65
7.2.	<i>Simulação de uma célula doente</i>	79
8.	CONCLUSÃO	99
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1. Introdução

A população idosa vem aumentando em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento. O Brasil, como os demais países, está apresentando um processo de envelhecimento populacional. Estima-se que o número de idosos ultrapassará 30 milhões de indivíduos no ano de 2025, o que corresponderá a 15% do total da população brasileira, colocando o Brasil em 6º lugar na classificação dos países com as maiores populações de idosos do mundo (RAMOS, VERAS et al., 1987).

O processo de envelhecimento normal traz consigo um declínio gradual das funções cognitivas. Entretanto, desorientação, perda de memória e outras alterações podem sinalizar o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, não-transmissíveis, como a demência.

A idade exerceu importante influência sobre resultados de pesquisas envolvendo prevalência de demência que variam de 1,17% na faixa de 65-69 anos, a 54,83% na faixa acima de 95 anos. A prevalência média de demência acima dos 65 anos de idade foi de 7,1% na América do Sul. A Doença de Alzheimer (DA) foi mais predominante do que a demência vascular (DV) em todas regiões pesquisadas, principalmente no Brasil, que apresentou um resultado 2 a 3 vezes maior do que em outras regiões do mundo (LOPES & BOTTINO, 2002).

Dada a importância desses dados, podemos avaliar quanto esse assunto tem atraído pesquisadores, na sua maioria da área neurofisiológica. No entanto outros campos da ciência têm abordado assuntos que com a união de várias áreas, tem obtido resultados significantes. Um exemplo disso é a área de Neurociência Computacional, onde se tem a união de neurofisiologistas e cientistas da computação com o fim de modelar computacionalmente processos neurocelulares. Muitas dessas parcerias mostraram que a união do conhecimento a fim de um bem comum pode ajudar a solucionar problemas que objetivamos. Este trabalho tem como objetivo um

tal tipo de modelagem. Neste caso um processo específico na Doença de Alzheimer, o papel do cálcio para ser mais exato.

A modelagem consiste em criar diagramas que representam processos neuronais. Com tais diagramas conseguimos construir equações algébricas ou diferenciais que representam matematicamente o processo em questão. Sendo que após isto implementamos um programa ou sistema que resolva tais equações.

Aqui neste trabalho conseguimos modelar e simular um neurônio normal observando somente os processos relevantes para Doença de Alzheimer. Depois disto provocamos danos nas estruturas envolvidas na doença para observar o comportamento das mesmas.

A tese está dividida em 7 capítulos onde:

Capítulo 1 - Faz uma introdução sobre a doença, a motivação do trabalho e uma introdução sobre o mesmo.

Capítulo 2 - Descreve as principais características da Doença de Alzheimer que estão relacionadas com o cálcio.

Capítulo 3 - Explana a importância do cálcio na célula neural.

Capítulo 4 - Aborda as hipóteses na doença de Alzheimer relacionadas com o cálcio.

Capítulo 5 - Explica o metabolismo do cálcio.

Capítulo 6 - Aborda a modelagem de todo o processo envolvendo cálcio na doença de Alzheimer.

Capítulo 7 - Apresenta os resultados das simulações no sistema de reações implementado.

Capítulo 8 - Conclusões sobre o trabalho.

2. Doença de Alzheimer (DA)

Apresentada em 1906 em Tübingen na Alemanha pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer (1864-1915) a doença foi batizada com seu nome e diagnosticada depois de ele ter examinado o cérebro de Auguste D. morta em 1906, em estado de alienação mental.

Uma em cada 10 pessoas maiores de 80 anos desenvolverá a Doença de Alzheimer. A mesma probabilidade vale para 1 a cada 100 pessoas maiores de 70 e 1 a cada 1000 pessoas maiores de 60 anos. Esta é a avaliação de 1999, feita pela Federação Espanhola de Associações de Familiares de Enfermos de Alzheimer (RITCHIE & KILDEA, 1995).

Existem atualmente em todo o mundo entre 17 e 25 milhões de pessoas com a Doença de Alzheimer. E essa doença representa 70% do conjunto das doenças que afetam a população geriátrica. Assim, a Doença de Alzheimer é a terceira causa de morte nos países desenvolvidos, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares e para o câncer. Os pacientes de Alzheimer já são quatro milhões, nos Estados Unidos. No Brasil, não há dados precisos, mas estima-se que a confusão mental atinja por volta de meio milhão de idosos. A habilidade de reconhecer pessoas e de se comunicar é completamente perdida nos estágios finais da doença.

Os pacientes com Doença de Alzheimer perdem o controle da bexiga, e necessitam, eventualmente, de cuidados constantes. Este estágio da dependência completa pode durar anos antes de o paciente morrer. O tempo médio do diagnóstico à morte costuma ser de 4 a 8 anos, embora possa haver casos de 20 anos ou mais.

O paciente com DA experimenta deterioração progressiva, persistente, em muitas áreas, incluindo cognição (memória, julgamento, percepção, solução de

problemas, planejamento e execução de tarefas), linguagem, comunicação e capacidade visoespacial.

A causa da DA ainda não foi descoberta. Portanto, avanços nessa área têm sido substanciais nos últimos 20 anos, particularmente depois da identificação do peptídeo β amilóide ($A\beta$) e microtúbulos associados a proteína tau como um dos principais componentes das placas senis e emaranhados neurofibrilares no cérebro com DA (PAPPOLLA, SMITH et al., 2002).

2.1. Características da Doença de Alzheimer

A perda da capacidade intelectual com a idade é considerada um processo normal, do qual a velocidade e a extensão são muito variáveis. A doença de Alzheimer foi originalmente definida como demência pré-senil, mas parece agora que a mesma patologia fundamenta a demência, sem consideração com a idade do início. A DA refere-se à demência que não tem uma causa antecedente como o derrame, trauma cerebral ou alcoolismo. Até recentemente a demência relacionada com a idade era considerada resultado da perda constante de neurônios que normalmente ocorre durante a vida, possivelmente acelerada por um defeito no suprimento sanguíneo, associado com arteriosclerose. Contudo, estudos desde meados dos anos 80 têm revelado mecanismos genéticos e moleculares específicos subjacentes à DA que abriram novas oportunidades terapêuticas (SELKOE, 1993).

A DA está relacionada com a atrofia cerebral e perda localizada de neurônios, principalmente no hipocampo e no prosencéfalo basal. Dois aspectos microscópicos são característicos da doença: as placas senis, consistindo de depósitos extracelulares amorfos da proteína β -amilóide ($A\beta$); e emaranhados neurofibrilares intraneuronais, compreendendo filamentos de uma forma fosforilada de uma proteína

(Tau) associada com microtúbulos (estruturas tubulares delgadas da célula, que formam parte do esqueleto celular e que estão envolvidas no transporte axonal nos neurônios). Isto aparece também em cérebros normais, embora em número menor. O aparecimento precoce dos depósitos amilóides precede o desenvolvimento da DA, embora os sintomas possam não se desenvolver por muitos anos. O processamento alterado da proteína amilóide a partir de seu precursor, a Proteína Precursora Amilóide (PPA), é agora reconhecido como um fato importante para a patogênese da DA.

A PPA é uma proteína transmembrana (que atravessa a emembrana plasmática) de aproximadamente 770 aminoácidos. A β P é um peptídeo de 39 a 42 aminoácidos derivados por clivagem proteolítica do terminal C no final da PPA. Este peptídeo forma um depósito insolúvel extracelular. A PPA pode ser clivada aparentemente por no mínimo duas diferentes proteinases. A primeira chamada secretase produz um fragmento solúvel contendo somente parte da A β P. A segunda, um protease lisossomal, gera um fragmento contendo uma seqüência inteira de A β P; esse fragmento precipita extracelularmente e causa as placas neuríticas e outras características histopatológicas da DA.

Os fragmentos contendo A β P são diretamente ou indiretamente neurotóxicos. Existem evidências de que a exposição do neurônio a A β P pode aumentar sua concentração intracelular de cálcio, disparando vários processos intracelulares dependentes de cálcio. Entre eles as proteínas quinase que estão envolvidas na fosforilação (adição de fosfato) do tau. Deste modo, o aumento do cálcio pode levar à hiperfosforilação do tau e formação de filamentos helicoidais presentes nos emaranhados neurofibrilares.

Não se sabe ao certo como o acúmulo de A β P causa neurodegeneração (YANKNER, 1996). Há alguma evidência de que as células morrem por apoptose (morte programada), embora também seja evidente uma resposta inflamatória.

Tem sido sugerida uma correlação entre a densidade de placas senis e/ou emaranhados neurofibrilares e a gravidade clínica da doença de Alzheimer. Em trabalhos mais antigos, o número de placas senis foi relacionado com a severidade da doença (DODD, SCOTT et al., 1994). Porém, estudos mais recentes acharam evidências de que a contagem de placas não poderia ser utilizada para distinguir indivíduos dementes de não dementes, já que indivíduos envelhecidos normais também mostram cognição alterada e distúrbios de memória. Uma melhor correlação foi encontrada entre a densidade dos emaranhados neurofibrilares e a severidade da doença de Alzheimer (DODD, SCOTT et al., 1994).

O outro principal fator no estágio bioquímico é a Tau, a proteína da qual a malha neurofibrilar é composta. É incerto o seu papel na neurodegeneração, embora “taopatias” semelhantes ocorram em muitas condições neurodegenerativas (LEE, GOEDERT et al., 2001). A proteína Tau é um constituinte normal dos neurônios, e está associada aos microtúbulos intracelulares. Na DA e outras “taopatias”, esta proteína se torna anormalmente fosforilada (fosforilação adicionais – hiperfosforilações) e é depositada dentro das células como filamentos helicoidais pareados, com uma aparência microscópica característica. Quando as células morrem, estes filamentos se agregam como emaranhados neurofibrilares extracelulares. É possível, mas não provado, que a fosforilação da proteína Tau é aumentada pela presença das placas A β P. Não é certo se a hiperfosforilação e o depósito intracelular de Tau prejudicam a célula, embora seja conhecido que a fosforilação da Tau impeça o transporte axonal rápido, um processo que depende dos microtúbulos (RANG, DALE et al., 2004).

Alterações dos sinais regulatórios da Tau, provocadas por razões ainda desconhecidas, fazem com que essa proteína deixe de cumprir seu papel na manutenção da estabilidade do citoesqueleto e adquira a capacidade aberrante de

associar-se consigo mesma para formar polímeros. Tais polímeros organizam-se em estruturas altamente resistentes, os filamentos pareados helicoidais.

Várias pesquisas têm revelado hiperfosforilações da Tau por quinases – enzimas que controlam as reações de fosforilação dentro das células – ativadas por drogas que também causam multiplicação celular e por outros mecanismos, como acúmulo de cálcio no interior da célula.

A fosforilação irregular na região carboxiloterminial da Tau, estariam relacionadas às mudanças neuropatológicas produzidas no início da Doença de Alzheimer. Assim, tais fosforilações contribuiriam para a atividade anormal de auto-agregação da Tau (MACCIONI & RODRIGUES, 1995).

3. A importância do Cálcio no Cérebro

Para compreender a importância do cálcio para o nosso organismo, é necessário antes entender duas características fundamentais:

- O cálcio é capaz de se ligar e se desligar de proteínas muito rapidamente;
- A quantidade de cálcio fora das células é mais de 10 bilhões de vezes maior que em seu interior.

Quando o cálcio se liga a uma proteína, esta pode mudar sua forma (conformação) e também seu funcionamento. Devido à grande quantidade de íons de cálcio (Ca^{2+}) no exterior da célula, quando se abre um canal condutor de íons de cálcio, presente na membrana plasmática, imediatamente ocorre a entrada destes íons (HOTTA, 2003).

3.1. O Cálcio no Cérebro

Em uma das extremidades do neurônio é recebido um estímulo que, se for forte o suficiente, é transportado como um sinal elétrico que vai até o outro extremo da célula. O sinal elétrico que percorre um neurônio, ao atingir suas pontas finas promove a abertura de canais de cálcio na membrana, permitindo a entrada deste íon na célula, onde ativa proteínas que fazem com que compartimentos cheios de neurotransmissores se abram para o exterior, liberando tais neurotransmissores, que são captados por outro neurônio, gerando novo sinal elétrico (HOTTA, 2003). Portanto, o cálcio é o principal mensageiro secundário mediando mudanças adaptativas na neuroarquitetura em resposta a sinais, como, por exemplo, neurotransmissores. O cálcio regula a plasticidade estrutural nos neurônios, influenciando o citoesqueleto e está associado a proteínas de modo específico. Dentro de certa concentração de cálcio citoplasmático ($[Ca^{2+}]_c$), a neuroarquitetura é regulada adaptativamente. Essas funções para níveis de cálcio livre intracelular foram mostradas em estudos de invertebrados e mamíferos (MATTSON, 1994). Portanto, quando $[Ca^{2+}]_c$ torna-se muito alta, por um longo período de tempo, ocorre uma degradação adaptativa inadequada de componentes celulares. Desta forma, a perda da homeostase da $[Ca^{2+}]_c$ está certamente relacionada com severas condições degenerativas e muito provavelmente representa um papel importante em patologêneses crônicas incluindo a Doença de Alzheimer (MATTSON, 1994).

3.2. O Cálcio no Envelhecimento do Cérebro

Mudanças na homeostase do cálcio são consideradas como uma das principais alterações na fisiologia neuronal, possivelmente contribuindo para deterioração da

transmissão sináptica relacionada com a idade e plasticidade neuronal. Dizer que essas mudanças na homeostase do cálcio são também responsáveis pela neurodegeneração do envelhecimento, seria muito prematuro, pois este ainda é assunto em debate. Essa visão é mais complicada pelo fato de que elevação do Ca^{2+} citoplasmático teria diferentes efeitos: um aumento moderado seria neuroprotetor, enquanto uma elevação acentuada parece ser neurotóxica. A relação entre a concentração interna de cálcio e a morte celular é interessante, pois o cálcio pode levar a uma disfunção mitocondrial devido à abertura de canais mitocondriais, cuja ativação afeta a sobrevivência neuronal. Como exemplo, tem sido observado um aumento, dependente da idade, na atividade de fosfatases dependentes do Ca^{2+} que são induzidas pelo aumento da concentração intracelular de cálcio (ANNUNZIATO, PANNACCIONE et al., 2002).

Estudos têm mostrado que o aumento na atividade de canais de cálcio dependente de voltagem pode ser responsável pela alta vulnerabilidade de neurônios do hipocampo em relação à idade. Por outro lado, o aumento da ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem não parece ser um fenômeno geral, ocorrendo com a idade em toda a população de neurônios. Por isso não podemos, apesar de algumas evidências, estabelecer uma relação entre modificações de canais iônicos induzidas pelo estresse oxidativo e neurodegeneração associada com a idade, pois há controvérsias, conflitos de resultados e, em muitos casos, uma falta de estudos mais abrangentes. Além disso, o estudo do envelhecimento normal é complicado pelo fato de não estar clara a diferença entre o que é normal e o que é patológico (ANNUNZIATO, PANNACCIONE et al., 2002).

4. O Metabolismo do Cálcio

4.1. Manutenção dos Níveis de Cálcio

A concentração de íons de cálcio livre no citoplasma de cada célula é extremamente baixa, da ordem de 10^{-7} M, enquanto que sua concentração no líquido extracelular ($\sim 10^{-3}$ M) é alta. Assim, existe um gradiente que tende a enviar Ca^{2+} para o interior da célula (citoplasma) através da membrana plasmática (GANONG, 1993). Quando um sinal transitório abre os canais de cálcio dessa membrana, o cálcio passa rapidamente para o citoplasma aumentando drasticamente a sua concentração e disparando as proteínas que respondem ao Ca^{2+} na célula. A concentração de cálcio no interior da célula é criticamente importante como regulador da função celular (ALBERTS, BRAY et al., 1997).

Uma outra função para os íons de cálcio no interior da célula seria a ativação da proteína quinase C, que vai fosforilar um número de proteínas importante para o funcionamento celular (PATTON, FUCHS et al., 1989b).

Devido a essa grande diferença de concentração, os íons de cálcio estão permanentemente “vazando” para o interior da célula através dos canais de cálcio. Mais ainda, a célula dispõe de depósitos substanciais de cálcio no retículo endoplasmático e mitocôndrias, o que sem dúvida contribui para esse vazamento. Não obstante, a célula mantém essa baixíssima concentração citoplasmática de cálcio à custa de um grupo de transportadores de cálcio dependentes de ATP. Esse potente sistema de recaptção de cálcio faz com que, mesmo sob estímulo hormonal, as alterações do cálcio citoplasmático durem apenas alguns microssegundos e permaneçam restritas a microambientes celulares (AIRES, 1991).

A regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ envolve três mecanismos principais:

- controle da entrada do Ca^{2+} ;

- troca do Ca^{2+} entre o citoplasma e a reservas intracelulares.
- controle da extrusão do Ca^{2+} .

Mecanismos de Entrada do cálcio:

- canais de cálcio regulados por voltagem;
- canais de cálcio regulados por ligantes;

O mecanismo de entrada de cálcio é feito principalmente pelos canais iônicos seletivos a cálcio. Esses canais são necessários devido à composição da membrana plasmática de todas as células, inclusive das células neurais, que são formadas de lipídios e de proteínas.

A membrana celular é constituída de lipídios que não se misturam com a água. Os íons, pelo contrário, atraem moléculas de água. O átomo de oxigênio da água tende a atrair elétrons enquanto os átomos de hidrogênio tendem a perder elétrons e com isso os cátions (íons positivos) são atraídos pelo oxigênio da água, enquanto os ânions (íons negativos) são atraídos pelo hidrogênio da água. Portanto os íons ficam circundados pela água. Como a membrana plasmática é hidrofóbica, é improvável que um íon consiga atravessar a membrana. Assim a membrana é quase impermeável aos íons. Os íons só conseguem atravessar a membrana através de poros ou condutos existentes na estrutura da membrana chamados canais iônicos que são formados por proteínas que atravessam toda a membrana celular (KANDEL, SCHWARTZ et al., 1997).

4.1.1. Ativação dos Canais de Cálcio Regulados por Voltagem

Os canais de cálcio dependentes de voltagem permitem uma entrada significativa de Ca^{2+} no interior da célula. São canais específicos que estão presentes nas células excitáveis e permitem a entrada do Ca^{2+} na célula sempre que a membrana estiver despolarizada (RANG, DALE et al., 2004).

Em alguns tecidos excitáveis, onde o potencial de ação apresenta um componente lento, como os músculos cardíaco e liso visceral, o fluxo de corrente por esses canais tem grande participação no processo da excitação (despolarização da célula), embora sua participação na excitação de estruturas neurais seja mínima (AIRES, 1991).

Constituído de multiproteínas os canais possuem 4 subunidades. Estão envolvidos em várias funções neurais fisiológicas e patofisiológicas tais como transmissão sináptica, *spike* dendrítico, liberação de neurotransmissores, expressão gênica e morte celular. Os canais são divididos em canais dependentes de alta voltagem, que abrem em resposta a uma forte despolarização da membrana plasmática, e canais ativados por uma pequena despolarização e, portanto conhecidos como canais dependentes de voltagem, ativados por baixa voltagem. Os canais ativados por alta voltagem sustentam um grande influxo de cálcio em resposta a uma ativação neuronal e são responsáveis pela liberação dos neurotransmissores (ANNUNZIATO, PANNACCIONE et al., 2002; CHRISTIE, ELIOT et al., 1995; IWASAKI, MOMIYAMA et al., 2000; STOTZ & ZAMPONI, 2001). Mudanças na atividade desses canais têm sido relacionadas à morte neuronal que ocorre no processo de envelhecimento e em muitas doenças neurodegenerativas, tais como derrame, Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, doença de Huntington,

síndrome de Down, doenças de prions e esclerose lateral (VERKHRATSK & TOESCU, 1998).

Um canal de K^+ ativado por cálcio também é ativado pela despolarização, mas sua sensibilidade à voltagem é função da concentração intracelular de Ca^{2+} . Assim, para que esse canal se abra, é necessário um aumento de seu Ca^{2+} interno (mediado pelos canais cálcio dependentes de voltagem) e uma despolarização.

O influxo de Ca^{2+} pelos canais de cálcio dependentes de voltagem é limitado por dois processos que ajudam a repolarização: o aumento do efluxo de K^+ e a diminuição do influxo de Ca^{2+} (KANDEL, SCHWARTZ et al., 1997).

Cada canal iônico aberto contribui para a geração de uma diferença de potencial elétrico entre as duas faces da membrana. Por exemplo, o Ca^{2+} , que está presente com concentração mais alta fora da célula, tende a fluir para dentro da célula. Esse fluxo leva a uma efetiva separação de cargas através da membrana, resultando em diferença de potencial elétrico. Uma fonte de potencial elétrico é chamada de força eletromotriz, e uma força eletromotriz gerada por diferença de potencial químico é chamada de bateria. Podemos, assim, representar o potencial elétrico através de cada canal de Ca^{2+} como uma bateria. O potencial gerado por essa bateria é igual a E_{Ca} que, tipicamente é da ordem de 55mV.

Obviamente uma célula contém muitos canais de Ca^{2+} , e todos esses canais podem ser combinados em um mesmo circuito equivalente (Figura 1), constituindo um condutor em série com uma bateria. Nesse circuito equivalente, a condutância total para todos os canais de Ca^{2+} (g_{Ca}), isto é, a condutância ao Ca^{2+} da membrana celular é igual ao número dos canais de Ca^{2+} (N_{Ca}), multiplicado pela condutância de um canal único de Ca^{2+} (γ_{Ca}).

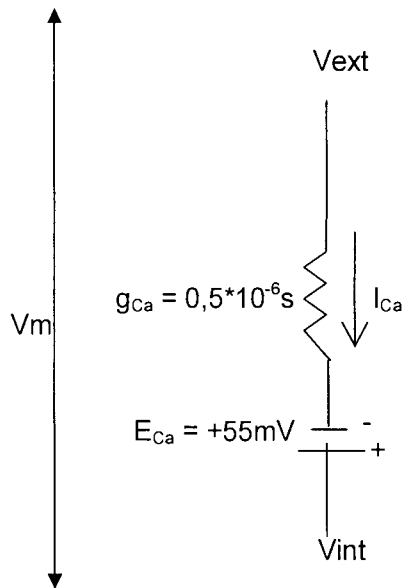


Figura 1: Circuito equivalente

$$g_{Ca} = N_{Ca} * \gamma_{Ca} \quad (1)$$

Os canais dependentes de voltagem para o Ca^{2+} , se abrem em resposta à despolarização da membrana causada pela ativação dos receptores NMDA. Embora os íons cálcio tenham forte gradiente eletroquímico, que os impulsiona para dentro da célula, na maior parte das circunstâncias, o influxo de Ca^{2+} contribui muito pouco para a fase crescente do potencial de ação, visto que a condutância para o Ca^{2+} é muito menor que a condutância para o Na^{+} .

A melhor maneira de se estudar o movimento dos íons responsáveis pelo potencial pós-sináptico excitatório (PPSE) é medir o potencial de inversão para o PPSE. A maioria das células nervosas tem um potencial de repouso de membrana em torno de -65mV. Quando o potencial de membrana da célula nervosa é diminuído de -65mV até -70mV, o PPSE aumenta de amplitude. Isto ocorre porque flui mais corrente para dentro pelos canais sinápticos quando a força motriz ($V_m - E_{PPSE}$, força propulsora) é aumentada.

À medida que a membrana é progressivamente despolarizada, entretanto, o PPSE diminui, até que desaparece próximo de 0mV. Nesse ponto a corrente de Na^+ que flui pelos canais sinápticos é reduzida porque o potencial de membrana está agora mais perto de $E_{\text{Na}}(+55\text{mV})$, e a corrente de K^+ é aumentada porque está mais longe do $E_{\text{K}}(-75\text{mV})$. A corrente de Na^+ para dentro é, assim, contrabalançada pela corrente de K^+ para fora, com o resultado de não haver fluxo de corrente pelos canais sinápticos. A despolarização (além de 0mV) produz PPSE hiperpolarizante. A corrente de K^+ para fora agora torna-se maior que a corrente de Na^+ para dentro, resultando numa corrente iônica efetiva para fora porque o potencial de membrana está mais próximo do E_{Na} que do E_{K} .

4.1.2. Canais de Cálcio Regulados por Ligantes

Os canais de cálcio regulados por ligantes são ativados por neurotransmissores excitatórios. No entanto, o elemento mais importante para o nosso estudo é o receptor de glutamato, um canal regulado por ligante que exibe permeabilidade particularmente alta a Ca^{2+} , constituindo um importante fator contribuinte da captação de Ca^{2+} pelos neurônios pós-sinápticos no Sistema Nervoso Central (SNC) (RANG, DALE et al., 2004).

Glutamato Aminoácido Excitatório

O glutamato do Sistema Nervoso Central provém principalmente da glicose através do ciclo de Krebs ou da glutamiona. Dentre os neurotransmissores, o glutamato pode ser considerado a chave no crescimento e plasticidade sináptica. Encontrado com uma concentração maior no SNC do que em outros tecidos, o

glutamato pode estabilizar o crescimento de dendritos e promover formação de sinapse no desenvolvimento dos neurônios do hipocampo. Além disso, o mecanismo de aprendizagem e memória no homem (hipocampo) é muito dependente da transmissão glutamatérgica (MATTSON, 1994).

Há vários tipos de receptores de glutamato, e alguns deles têm subtipos adicionais. Os receptores do glutamato podem ser divididos em duas categorias: os que controlam diretamente os canais iônicos (receptores ionotrópico) e os que controlam os canais indiretamente por meio de segundos mensageiros (receptores metabotrópicos) (KANDEL, SCHWARTZ et al., 1997).

Os receptores ionotrópicos são ativados pela ligação dos neurotransmissores ao canal. Esses canais são independentes ou apenas fracamente dependentes do potencial da membrana. Esses receptores são responsáveis pela transmissão sináptica rápida no SNC. Além da ativação dos receptores ionotrópicos, os neurotransmissores, como glutamato, também se ligam ativando receptores acoplados a proteína G, freqüentemente designados como receptores metabotrópicos. Os receptores metabotrópicos tendo a proteína G como segundo mensageiro, modulam os canais regulados por voltagem. Essa interação pode correr totalmente no interior da membrana. Nesse caso, a proteína G interage diretamente com o canal iônico regulado por voltagem. Em geral, dois tipos de canais iônicos regulados por voltagem estão envolvidos nessa forma de sinalização: os canais de cálcio e os canais de potássio. Quando as proteínas G interagem com os canais de cálcio, elas inibem a função do canal. Esse mecanismo explica a inibição pré-sináptica que ocorre quando são ativados os receptores metabotrópicos pré-sinápticos. Em contraste, quando os receptores são pós-sinápticos, eles determinam a abertura dos canais de potássio, resultando em inibição pós-sináptica lenta. Ao contrário do efeito de curta duração dos

receptores ionotrópicos, os efeitos da ativação dos receptores metabotrópicos podem durar dezenas de segundos a minutos (KATZUNG, 2003).

Ativação de receptores de glutamato pode levar ao influxo de Ca^{2+} através de vários portais, incluindo canais dependentes de ligantes na membrana plasmática, canais de cálcio dependentes de voltagem, e liberação de cálcio de armazenamento internos resultado da ativação de receptores metabotrópicos (MATTSON, 1994).

A exemplo de outros transmissores, o glutamato é armazenado em vesículas sinápticas e liberado por exocitose dependente do cálcio.

A ação do glutamato é interrompida principalmente pela sua recaptação mediada por transportadores nas terminações nervosas e astrócitos vizinhos. Em certas circunstâncias (por exemplo despolarização por aumento de K^+ extracelular), esse transporte pode operar de modo inverso, constituindo uma fonte de liberação de glutamato, um processo que pode ocorrer em condições patológicas, como na isquemia cerebral.

Dentre os principais tipos de receptores de glutamato estão: os receptores NMDA e o AMPA (receptores ionotrópicos – regulados por ligantes – designados de acordo com seus agonistas específicos) (FURUKAWA & MATTSON, 1995; RANG, DALE et al., 2004).

4.1.2.1. Receptores NMDA

Os receptores de glutamato do tipo NMDA exibem permeabilidade alta ao Ca^{2+} , constituindo um importante fator para a captação de Ca^{2+} pelos neurônios pós-sinápticos no sistema nervoso central. Porém, no potencial de membrana de repouso (-65mV), o acesso aos receptores NMDA é bloqueado por íons de magnésio (Mg^{2+}) e, portanto, não contribui muito para o potencial sináptico normal. Assim, o Potencial

Pós-sináptico Excitatório (PPSE) que é gerado em repouso depende, sobretudo, da ativação dos receptores não-NMDA (AMPA). Entretanto, à medida que a despolarização do neurônio aumenta, o Mg^{2+} é expulso da entrada dos receptores NMDA ativados pelo glutamato. Com isso mais canais se abrem, e a corrente que flui por esses canais aumenta. Desta forma dizemos que os receptores NMDA além de serem ativados pelo glutamato, dependem da voltagem, pois só serão desbloqueados a partir de certo grau de despolarização da membrana plasmática. Acredita-se que a entrada de Ca^{2+} pelo canal ative vários processos de segundos mensageiros dependentes de cálcio. Esses processos são importantes no desencadeamento de alterações bioquímicas.

Os receptores NMDA se abrem e se fecham muito lentamente em resposta ao glutamato. Por isso, contribuem com uma fase tardia característica para o PPSE (ENOKI, KIUCHI et al., 2004; KANDEL, SCHWARTZ et al., 1997).

4.1.2.2. Receptores AMPA

Os receptores de glutamato do tipo AMPA exibem permeabilidade alta ao Na^+ . Uma vez que o glutamato é ligado ao receptor AMPA, o canal é aberto e permite a entrada de íons de sódio, principalmente através da membrana plasmática. Os receptores AMPA são ativados muito rapidamente, sendo responsáveis assim por uma despolarização breve (KOCH, 1999; KOCH & SEGEV, 1998).

Com uma atividade sináptica normal, apenas os receptores AMPA são ativados, pois não há quantidade suficiente de glutamato para ativar os receptores metabotrópicos e os receptores NMDA são bloqueados pelo Mg^+ . Após uma série de estímulos, ocorre uma liberação de glutamato suficiente para ativar os receptores metabotópicos e, devida uma despolarização sustentada, os receptores NMDA são

desbloqueados do Mg^+ . Desta forma há um aumento na concentração de cálcio interno, que ativa a proteína quinase (PKC) e a óxido nítrico sintetase (NOS). A PKC fosforila diversas proteínas, incluindo os receptores AMPA, facilitando a ação do transmissor. A liberação de óxido nítrico (NO) facilita a liberação de glutamato, fazendo a sinalização retrógrada, também conhecida como retorno do NO (RANG, DALE et al., 2004).

Ácido Gama-Aminobutírico (GABA)

O GABA é o principal transmissor inibitório no cérebro, possuindo uma distribuição bastante uniforme por todo ele, porém ocorrendo em quantidades muito pequenas nos tecidos periféricos.

O GABA é formado a partir do glutamato pela ação da GAD (ácido glutâmico descarboxilase). Sua ação é interrompida principalmente pela sua recaptção, mas também por desaminação, que é catalisada pela GABA transaminase (EDWARDS, KONNERTH et al., 1990; MCCORMICK, 1992).

O GABA atua como transmissor inibitório em muitas vias diferentes do Sistema Nervoso Central. A sua distribuição e o fato de praticamente todos os neurônios serem sensíveis a seu efeito inibitório, sugerem uma função importante em todo o cérebro. Foi estimado que o GABA atua como transmissor em cerca de 30% de todas as sinapses no Sistema Nervoso Central. Para isso temos receptores GABA presentes na membrana plasmática (RANG, DALE et al., 2004).

4.1.2.3. Receptores GABA

Existem dois tipos de receptores de GABA: $GABA_A$ e $GABA_B$.

Os receptores GABA_A consistem em receptores ionotrópicos, que ocorrem principalmente em nível pós-sináptico, e estão diretamente acoplados aos canais de Cl⁻. Como o potencial de membrana em equilíbrio para Cl⁻ é, em geral, negativo em relação ao potencial de repouso da célula, o aumento da permeabilidade do Cl⁻ hiperpolariza a célula, reduzindo, assim, a sua excitabilidade.

Os receptores GABA_B são receptores acoplados à proteína G, ligados à inibição da formação de cAMP, na qual são muito lentos por envolver segundo mensageiros. . Exercem seus efeitos ao inibir os canais de cálcio regulado por voltagem (reduzindo assim a liberação do transmissor) e ao abrir os canais de potássio (diminuindo, dessa maneira, a excitabilidade pós-sináptica) (KOCH & SEGEV, 1998). Causam inibição pré e pós-sináptica ao inibir a abertura dos canais de cálcio e ao aumentar a condutância do K⁺ .

Os receptores GABA_B, que apresentam localização pré e pós-sináptica, assemelham-se estreitamente aos receptores metabotrópicos de glutamato (RANG, DALE et al., 2004).

Tal como ocorre na maioria das formas de ação sináptica excitatória, a abertura dos canais inibitórios não é influenciada pela voltagem da membrana – isto é, uma alteração no potencial da membrana não altera o número de canais abertos pelo transmissor (KANDEL, SCHWARTZ et al., 1997).

4.1.2.4. Receptores Metabotrópicos

Os receptores metabotrópicos controlam os canais indiretamente por meio de segundos mensageiros.

Troca do Cálcio Entre o Citoplasma e a Reservas Intracelulares.

Quando o cálcio entra no citoplasma, ele não fica livre para difusão. Na verdade, a maior parte dos íons de cálcio numa célula em repouso é absorvida por um sistema receptor, constituído por um grupo de diferentes proteínas armazenadoras e organelas celulares, tais como a mitocôndria e o retículo endoplasmático liso (KOCH, 1999). De modo que a $[Ca^{2+}]_c$ livre é mantida em níveis baixos, da ordem de cerca de 10^{-7} mol/l. Assim, existe um grande gradiente de concentração que favorece a entrada de Ca^{2+} (RANG, DALE et al., 2004).

4.1.3. Cálcio no Retículo Endoplasmático

O armazenamento de cálcio no Retículo Endoplasmático (RE) é feito através de uma bomba de Ca^{2+} que está situada na sua membrana e que desempenha um papel importante na manutenção da concentração baixa de Ca^{2+} no citoplasma: essa bomba (Ca^{2+} -ATPase) permite ao RE capturar grandes quantidades de Ca^{2+} do citoplasma contra um gradiente de concentração, mesmo quando os níveis de Ca^{2+} no citoplasma são baixos. Para isso é necessário o consumo de ATP (PATTON, FUCHS et al., 1989a).

A liberação de cálcio do Retículo Endoplasmático é controlada, em parte, pelo potencial de membrana e, em parte, pelo segundo mensageiro IP_3 (RANG, DALE et al., 2004).

O inositol trifosfato (IP_3) é um mediador hidrossolúvel, liberado no citoplasma e que atua sobre um receptor específico – o receptor de IP_3 –, um canal de cálcio regulado por ligante existente na membrana do retículo endoplasmático. O principal papel do IP_3 , consiste em controlar a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares. O

IP₃ é convertido no interior da célula em 1,3,4,5-tetrafosfato, IP₄, por uma quinase específica. O papel exato do IP₄ permanece incerto, porém há evidências de que esteja também envolvido na sinalização do Ca²⁺ (KATZUNG, 2003).

O receptor de inositol trifosfato (IP₃R) é um canal iônico regulado por ligante, embora sua estrutura molecular seja diferente dos canais regulados por ligantes na membrana plasmática. Trata-se do principal mecanismo pelo qual a ativação dos receptores acoplados à proteína G produz elevação da [Ca²⁺]_i (AIRES, 1991; PELLETIER, WADIA et al., 1999).

4.1.4. Cálcio Ligado a Proteína

O cálcio representa um papel importante nas funções celulares através de sua capacidade de regular a atividade de numerosas proteínas diferentes, incluindo enzimas (particularmente quinases e fosfatases), canais, transportadores, etc. A proteína mais conhecida é a calmodulina, uma proteína existente por todo o citoplasma e extensamente estudada, que tem a capacidade de regular pelo menos 40 proteínas funcionais diferentes – atuando, na verdade, como poderoso mediador. A calmodulina é uma proteína com quatro sítios de ligação de Ca²⁺. Quando todos os sítios estão ocupados, a calmodulina sofre uma alteração estrutural, expondo um domínio hidrofóbico “aderente”, que atrai muitas proteínas em associação, afetando, assim, as suas propriedades funcionais (RANG, DALE et al., 2004).

4.1.5. Cálcio na Mitocôndria

Como vimos, a concentração de Ca²⁺ livre no citoplasma varia de 10⁻⁷M, quando a célula está em repouso, até aproximadamente 5x10⁻⁶M, quando a célula é ativada

por um sinal extracelular. Mas quando a célula está danificada e não consegue bombear Ca^{2+} para fora do citoplasma, sua concentração pode aumentar para níveis perigosamente altos ($>10^{-5}\text{M}$) (PATTON, FUCHS et al., 1989b). Nessas circunstâncias, a mitocôndria tem uma enorme capacidade de acumular Ca^{2+} levada por um potencial eletroquímico promovido primeiramente pelo potencial mitocondrial e uma baixa concentração de Ca^{2+} intramitocondrial que é mantido por troca através de exportação via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Quando o Ca^{2+} citoplasmático é elevado, o mesmo entra na mitocôndria, ao mesmo tempo em que prótons são bombeados para fora, aumentando o pH na matriz mitocondrial. O pH na matriz facilita a abertura de PTPM. Isso leva a um colapso do gradiente dos prótons mitocondriais e do potencial da membrana, o movimento externo de Ca^{2+} pelo canal e acidificação da matriz mitocondrial levando ao fechamento do canal. O canal respiratório agora restaura o gradiente de prótons, e assim por diante (MILLER, 1998).

Neste trabalho há um interesse na consequência patológica mantida pela alta concentração de cálcio mitocondrial, que pode inicializar um dano na mitocôndria, e com isso disfunção mitocondrial que pode interferir na participação normal e na integração do manejo do cálcio mitocondrial em sinais celulares (KRIEGER & DUCHEN, 2002).

Como resultado do acúmulo da Ca^{2+} , estresse oxidativo ou envelhecimento in vitro, a mitocôndria pode sofrer um súbito aumento de permeabilidade da membrana interna. Esse fenômeno é descrito como Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM). A TPM é transmitida através de megacanaís mitocondriais os poros de transição (PTPM) (MILLER, 1998).

O PTPM é um portão dependente de voltagem, canal permeável a cátion, cuja abertura é favorecida por vários fatores, incluindo despolarização, Ca^{2+} no interior da

mitocôndria e agentes oxidantes, e cujo fechamento é favorecido por prótons (isto é, baixo pH da matriz mitocondrial).

A mitocôndria e o PTPM têm sido propostos para representar uma função fisiológica na sinalização do Ca^{2+} intracelular e homeostase. A mitocôndria tem a capacidade de armazenar Ca^{2+} não tóxico e liberar estes através do intercâmbio Na/Ca. O PTPM provê a mitocôndria com um mecanismo rápido de expulsão de Ca^{2+} operando a um baixo modo de condutância que permite uma difusão temporária de pequenas moléculas como o Ca^{2+} . O PTPM tem também sido identificado na plasticidade sináptica e aprendizagem. Portanto, o acúmulo de Ca^{2+} mitocondrial em resposta a elevados níveis intracelulares de Ca^{2+} pode ser o fator determinante na morte neural.

A Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) é acompanhada pelo aumento da produção de ERMO e também libera proteínas apoptogênicas, tais como citocromo C, Smac/DIABLO (proteína que promove apoptose) e fatores de indução a apoptose. A ativação patofisiológica do PTPM constitui um evento crítico na apoptose, bem como na morte de células neuríticas.

Se a carga de Ca^{2+} é muito forte para uma mitocôndria, ela pode sofrer TPM e liberar seus íons de cálcio seqüestrados, aumentando a carga da mitocôndrias intactas restantes. Quanto mais mitocôndrias perdem suas funções e sofrem TPM, mais apoptoses ou necroses podem ocorrer. No evento de necrose, a célula incha e as membranas são rompidas, liberando constituintes intracelulares que podem evocar uma reação inflamatória, agravando o ambiente adjacente à célula (HANSSON, PERSSON et al., 2003).

Quando há a liberação rápida do Ca^{2+} acumulado, imediatamente ocorre a reacumulação. Deste modo, a adição de Ca^{2+} a esse ponto produz um “tudo ou nada” *spike* de Ca^{2+} que é remanescente do Ca^{2+} induzido Ca^{2+} liberado (CICL). O CICL

mitocondrial possui muitas propriedades interessantes, permitindo a potencialidade de ondas de Ca^{2+} e a despolarização simultânea para propagar de uma mitocôndria a outra em uma rede celular ou transcelular (MILLER, 1998).

Mecanismo de Extrusão do cálcio:

O transporte ativo de cálcio para fora, através da membrana plasmática, bem como para dentro, através das membranas do RE ou da mitocôndria, depende da atividade de uma ATPase Ca^{2+} -dependente, semelhante à ATPase Na^+/K^+ -dependente que bombeia Na^+ para fora da célula em troca de K^+ .

O cálcio também é expulso da célula em troca de Na^+ pelo mecanismo de troca de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. O trocador transfere três Na^+ por um Ca^{2+} e, por conseguinte, produz uma corrente de hiperpolarização efetiva ao expulsar o Ca^{2+} . A energia para extrusão do Ca^{2+} provém do gradiente eletroquímico do Na^+ , e não diretamente da hidrólise do ATP. Isso significa que uma redução no gradiente de concentração de Na^+ em consequência da entrada de Na^+ irá reduzir a extrusão de Ca^{2+} pelo trocador, produzindo uma elevação secundária da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (RANG, DALE et al., 2004).

4.2. Mitocôndria

As mitocôndrias ocupam uma porção substancial do volume citoplasmático das células eucarióticas e têm sido essenciais para a evolução de animais complexos. Sem as mitocôndrias, as atuais células animais seriam dependentes da glicólise anaeróbica para produzir todo o seu ATP. Entretanto, quando a glicose é convertida em piruvato pela glicólise, apenas uma pequena fração de toda a energia livre potencialmente disponível da glicose é liberada. Na mitocôndria, o metabolismo dos

açúcares é completado: o piruvato é importado para dentro da mitocôndria degradado a acetil CoA e são, então, metabolizados pelo ciclo do ácido cítrico produzindo NADH. No processo de fosforilação oxidativa, elétrons de alta energia do NDH são, então, transferidos para o oxigênio através da cadeia respiratória na membrana interna, produzindo ATP por um mecanismo quimiosmótico e oxidado pelo oxigênio molecular (O_2) a CO_2 e H_2O . A energia liberada é aproveitada tão eficientemente que cerca de 30 moléculas de ATP são produzidas para cada molécula de glicose oxidada. Em contraste, somente duas moléculas de ATP são produzidas pela glicólise sozinha (COOPER, 2000).

Quase toda energia disponível para o cérebro vem da fosforilação oxidativa mitocondrial, que gera ATP ao mesmo tempo em que reduz o oxigênio molecular em água. Sob certas condições, ERMO, por exemplo, oxigênio e radicais livres hidroxila e peróxido de hidrogênio podem ser gerados como subprodutos secundários deste processo (COYLE & PUTTFARKEN, 1993).

A recaptação do cálcio pela mitocôndria pode despolarizar a mitocôndria em dois caminhos distintos. O primeiro envolve uma despolarização parcial, a qual ocorre como consequência do transporte de cálcio para dentro da matriz e a consequente exploração do gradiente de próton. Essa despolarização é invertida quando a acumulação do cálcio está completa.

O segundo mecanismo pela qual a acumulação do cálcio pode despolarizar a mitocôndria é muito diferente e resulta de dano induzido pela sobrecarga de cálcio e estresse oxidativo, a qual causa ativação do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PTPM) no interior da membrana mitocondrial e descarregamento do cálcio da matriz para o citoplasma (TPM) (NICHOLLS & WARD, 2000).

4.3. Bombas Eletroquímicas de Cálcio

As Bombas Eletroquímicas existentes na membrana plasmática remove íons de cálcio do citoplasma para terminar a excitação. Enquanto os Ca^{2+} se difundem no citoplasma, a ligação e o mecanismo de bomba é tão rápido que o lugar da ação dos íons é normalmente perto de onde ele entra no citoplasma.

Apesar de uma concentração de cálcio extracelular ser de vários milimolares, o transporte destes mantém a concentração de cálcio livre no interior da célula na ordem de 10 a 300 nM. O citoplasma também tem muitos mecanismos que mudam a concentração de cálcio livre (PATTON, FUCHS et al., 1989a).

A bomba pode executar uma troca de dois íons de cálcio, possivelmente para dois íons de hidrogênio por ligação de ATP quebrada. Por isso, para que a Bomba eletroquímica consiga remover o Ca^{2+} do citoplasma e levá-lo para o exterior da célula, é necessário o consumo de ATP (PATTON, FUCHS et al., 1989a).

Todas as células eucarióticas possuem um Ca^{2+} -ATPase na sua membrana plasmática, que utiliza a energia da hidrólise do ATP para bombear Ca^{2+} para fora do citoplasma. Células nervosas, que utilizam extensivamente a sinalização com Ca^{2+} , possuem uma bomba de cálcio adicional na sua membrana plasmática, a qual acopla a saída de Ca^{2+} à entrada de Na^+ . Esse trocador Na^+ - Ca^{2+} possui uma afinidade relativamente baixa para o cálcio e, portanto, somente opera de forma eficiente quando os níveis de Ca^{2+} no citoplasma aumentam aproximadamente 10 vezes em relação ao nível normal, como ocorre após a estimulação repetida das células nervosas. Uma bomba de Ca^{2+} na membrana do RE também desempenha um papel importante na manutenção da concentração baixa de Ca^{2+} no citoplasma: essa Ca^{2+} -ATPase permite ao RE capturar grandes quantidades de Ca^{2+} do citoplasma contra um gradiente de concentração, mesmo quando os níveis de Ca^{2+} no citoplasma são

baixos (GANONG, 1993). Na Figura 2 um diagrama esquemático da homeostase celular de cálcio.

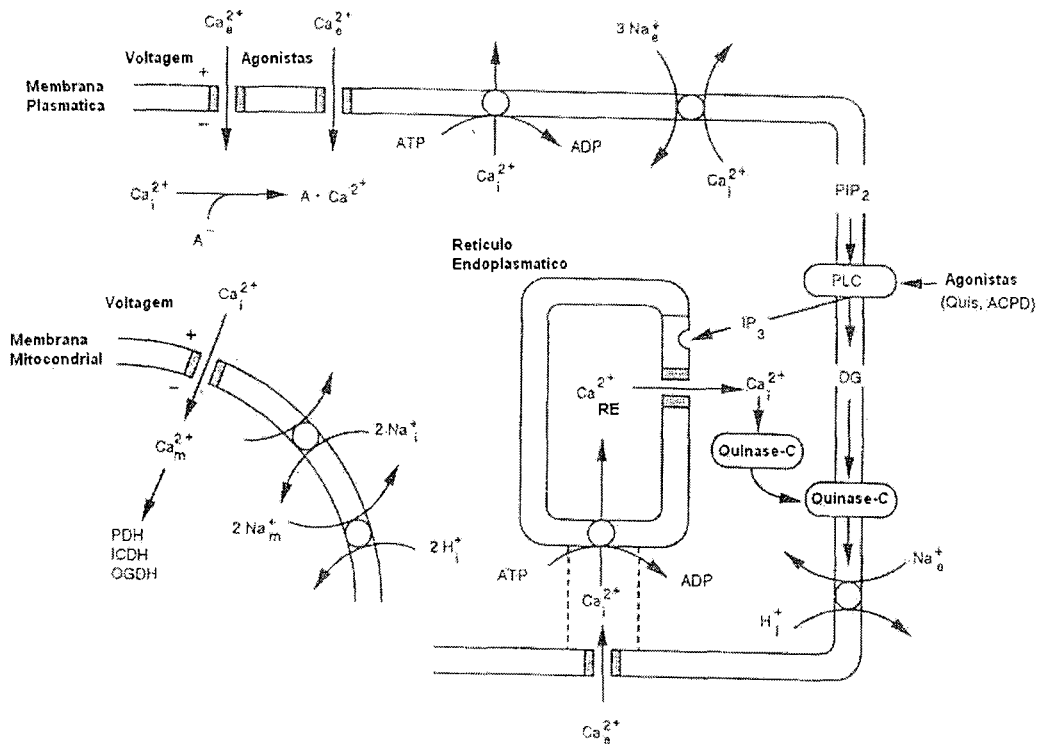


Figura 2: Armazenamentos intracelulares de cálcio

4.4. Potencial da Membrana

As sinalizações nos, e entre, neurônios podem ocorrer por meio de sinais elétricos e químicos. Os sinais elétricos (potenciais do receptor, potenciais sinápticos e potenciais de ação) são produzidos por variações transitórias do fluxo de corrente para dentro e para fora da célula, gerando um potencial elétrico entre as duas faces da membrana celular.

O fluxo de corrente para dentro e para fora da célula é controlado por canais iônicos embutidos na membrana celular. Existem dois tipos de canais iônicos nas membranas – de repouso e regulados. Os canais de repouso normalmente

permanecem abertos e não são influenciados de forma significativa por fatores extrínsecos, como o potencial através da membrana. Os canais regulados, ao contrário, abrem e fecham em resposta a diversos sinais. A maioria dos canais fica fechada quando a membrana está em repouso. Sua abertura é regulada por: variações do potencial da membrana, fixação de um ligante ou estiramento da membrana.

Cada neurônio tem uma grande quantidade de íons positivos e negativos, espalhados pelas superfícies internas e externas de sua membrana plasmática. No repouso, uma célula neural tem excesso de cargas positivas na face externa da membrana e de cargas negativas na sua face interna. Essa separação de cargas é mantida devido a dificuldade dos íons de se deslocarem livremente através da bicamada lipídica da membrana plasmática. Essa separação de cargas origina uma diferença de potencial elétrico, ou voltagem, através da membrana, chamada de potencial da membrana (V_M).

$$V_M = V_{\text{int}} - V_{\text{ext}} \quad (2)$$

O potencial da membrana de uma célula em repouso é chamado de potencial da membrana em repouso (V_R) que fica entre -60 a -70 mV (KANDEL, SCHWARTZ et al., 1997).

4.5. Níveis de Glicose

O nível de glicose na célula vai depender do transporte realizado da glicose para dentro da célula (VARADARAJAN, YATIN et al., 2000).

4.6. Liberação de Neurotransmissores

A liberação do transmissor depende da presença de cálcio extracelular e ocorre quando um potencial de ação atinge a terminação e desencadeia um influxo suficiente de íons de cálcio. A concentração aumentada de Ca^{2+} desestabiliza as vesículas de armazenamento, ao interagir com proteínas especiais associadas à membrana vesicular. Ocorre fusão das membranas vesiculares com a membrana terminal através da interação entre proteínas vesiculares e proteínas da membrana terminal. A fusão das membranas resulta na expulsão exocitótica na fenda sináptica (KATZUNG, 2003). Essas vesículas parecem estar presas ao citoesqueleto. E acredita-se que o Ca^{2+} libere as vesículas desencadeando a fosforilação dependente de Ca^{2+} /calmodulina. O cálcio pode ter um papel direto na fusão da membrana da vesícula com a membrana celular, ou pode agir através de uma ou mais proteínas sensíveis ao cálcio (KANDEL, SCHWARTZ et al., 1997).

O exato mecanismo pelo qual o cálcio entra no terminal pré-sináptico, as proteínas específicas com o qual cálcio interage, e os mecanismos detalhados conduzindo à exocitose, representa uma área ativa de pesquisa. Está claro que um modelo correto desses processos deveria incluir o particular grupamento de canais de cálcio, difusão e gradientes de cálcio, todas as reações enzimáticas envolvidas na exocitose e as propriedades particulares da difusão dos transmissores através dos poros de fusão e fenda sináptica. Para nossa presente proposta, nós usamos um modelo simples do cálcio induzido. Esse modelo de liberação de transmissor assume que:

- Na inversão por um potencial de ação, o Ca^{2+} entra no terminal pré-sináptico devido a presença de um alto limiar da corrente de Ca^{2+} ;

- Ca^{2+} ativa uma proteína ligante a cálcio, que promove liberação ligando ao transmissor contido nas vesículas;
- Um inesgotável suplemento de vesículas está disponível no terminal sináptico, esperando para liberação;
- As ligações das proteínas ligantes a cálcio ativadas, como as vesículas ancoradas, levam à liberação de m moléculas de transmissores na fenda sináptica. O processo posterior é modelado aqui como um processo de primeira ordem com um coeficiente estequiométrico de n .

A cascata de cálcio levando a liberação de transmissor foi descrita pelo seguinte esquema:



Íons de cálcio ligam a uma proteína dependente de cálcio, P, com numa razão de 4 cálcios para cada proteína (no caso da calmodulina), levando a uma ativação dessa proteína, PCa (Eq. 5). As constantes de ligação e liberação são representadas por K_1 e K_2 , respectivamente. A proteína PCa, de modo reversível, liga-se as vesículas contidas de neurotransmissores, Vis, com uma taxa de correspondência constante K_3 e K_4 (Eq. 6). O último passo dessa reação, mediada pela constante K_5 , representa de forma irreversível a liberação de n moléculas de neurotransmissor, T, das vesículas ativadas no interior da fenda sináptica (DESTEXHE, MAINEN et al., 1998).

5. O Cálcio na Doença de Alzheimer

5.1. Hipótese da Formação de Canais de Cálcio por proteína β Amilóide

A proteína β -amilóide (A β P), derivada da clivagem da APP, como descrito na seção 2.1, interage com a membrana celular formando canais, que resultam no influxo de íons de cálcio e na perda da homeostase do cálcio (MATTSON, CHENG et al., 1992; UEDA, YAGAMI et al., 1997; WEISS, PIKE et al., 1994). Esse desequilíbrio pode desencadear a neurotoxicidade (YANKNER, 1996). Assim a interação da A β P nas células nervosas com a membrana plasmática pode formar canais tóxicos de cálcio (ARISPE, ROJAS et al., 1993a; ARISPE, ROJAS et al., 1993b; LIN, BHATIA et al., 2001).

O colesterol da membrana plasmática modula a neurotoxicidade da A β P da célula na DA. Assim, quando se tem um meio enriquecido com colesterol, a célula fica resistente a ação citotóxica da A β P. Por outro lado, se temos uma membrana pobre de colesterol a célula se torna vulnerável à ação citotóxica da A β P. Através da modificação da fluidez da membrana neuronal, o colesterol controla a incorporação de A β P no interior das membranas celulares. Essa incorporação conseqüentemente resulta na formação de canais de cálcio decorrentes do A β P e, deste modo, a morte da célula. A medida que o acúmulo de A β P se torna denso, não há mais formação de canais de cálcio. Veja a Figura 3, onde é mostrado um resumo do processo da formação dos canais (ARISPE & DOH, 2002; ARISPE, POLLARD et al., 1994; ARISPE, POLLARD et al., 1996).

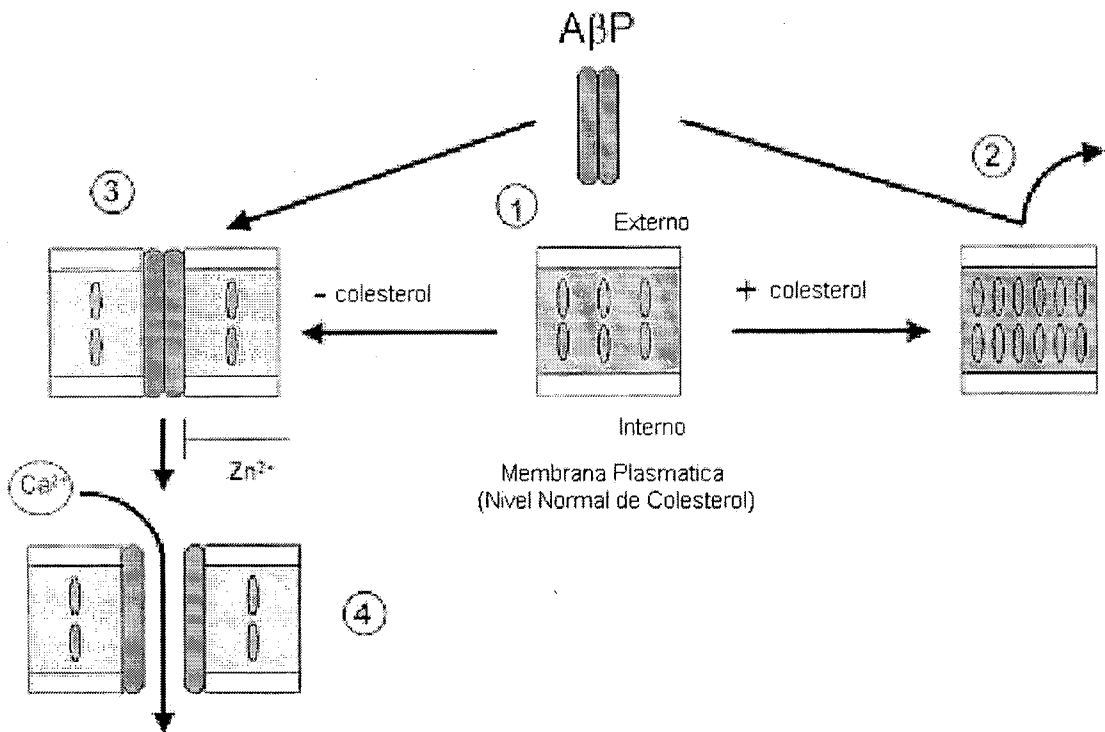


Figura 3: Formação de canais de cálcio pela proteína AβP. Figura extraída e modificada de (ARISPE, POLLARD et al., 1994)

5.2. Hipótese das Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio

A geração de Radicais Livres, por oxidarem enzimas importantes, pode danificar a cadeia respiratória das mitocôndrias, levando ao aumento de Espécie Reativas do Metabolismo do Oxigênio (ERMO). O aumento da geração de ERMO pode alterar funções celulares de muitas maneiras. Nesse contexto, ERMO pode alterar a concentração de cálcio citoplasmático ($[Ca^{2+}]_c$) iniciando na célula uma variedade de processos. Provavelmente, o melhor sistema caracterizado é o que envolve o cálcio do retículo endoplasmático liberado por canais e portões receptores de Inositol Trifosfato (IP_3), e que mostram um aumento na probabilidade de abertura em resposta ao ERMO (HUANG, ZHANG et al., 2003; KRIEGER & DUCHEN, 2002).

5.3. Hipótese do mal Funcionamento da Mitocôndria

A mitocôndria representa um papel central na célula não somente na produção de ATP, mas também no armazenamento de cálcio e na geração de radicais livres. Ela também é um depósito de várias proteínas que regulam a apoptose. A sobrecarga de cálcio neuronal, como segue a excessiva estimulação de receptores de cálcio, pode causar a morte celular. A morte celular vem não só da sobrecarga mitocondrial, mas de uma combinação da concentração de cálcio intramitocondrial com o aumento da produção de óxido nítrico e a possibilidade de outras espécies de radicais livres(DUGAN, SENSI et al., 1995).

Quando a geração de ATP é prejudicada, há um fracasso no equilíbrio celular, com mudanças no balanço iônico de Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} que causará um distúrbio nos padrões de sinais elétricos e mudanças na concentração de cálcio livre intracelular que juntos sustentam a transmissão de informação no sistema nervoso central(DUGAN, SENSI et al., 1995).

Um dos princípios básicos da mitocôndria é o acúmulo de Ca^{2+} do citoplasma. Ela contém proteínas, tais como citocromo C (e outras), que são liberadas e disparam a ativação da caspase e a iniciação da apoptose celular(DUGAN, SENSI et al., 1995).

Sob condições onde a concentração de cálcio citoplasmático é elevada, devido à ativação de aminoácidos receptores excitatórios, a concentração de cálcio mitocondrial pode subir substancialmente. Recentes evidências têm sugerido que o aumento da concentração de cálcio mitocondrial representa um papel central iniciando a progressão para morte neuronal. Portanto, o acúmulo excessivo de cálcio tem pelo menos dois efeitos danosos: pode conduzir à abertura de um caminho de alta

condutância, chamado Poro de Transmissão da Permeabilidade Mitocondrial (PTPM), e pode aumentar a taxa de geração de ERMO (DUGAN, SENSI et al., 1995).

Entre outras coisas, as ERMO são poderosas ativadoras de PTPM. Durante a morte excitotóxica, por exemplo, receptores de glutamato devem disparar a abertura de canais de Ca^{2+} na membrana celular, permitindo, deste modo, a entrada descontrolada de íons de cálcio. Muitos desses íons entrarão na mitocôndria, a qual bombeará prótons para fora num esforço de manter o equilíbrio, queimando ATP e aumentando a geração de ERMO ao mesmo tempo. Enfrentando assim uma constante barragem de Ca^{2+} interno e produção de ERMO, em algum ponto a célula decidirá ceder, abrindo mais PTPM, de forma irreversível e a morte virá em seguida. (MILLER, 1998).



A abertura do PTPM em modo de alta condutância parece ser irreversível e tem conseqüências importantes para função celular. Por exemplo, a ativação do PTPM desse tipo é associada a mudanças osmóticas e aumento mitocondrial. O cristal mitocondrial estica, e como a membrana interior é maior que a exterior, isso leva a ruptura da membrana exterior e a liberação de um material de moléculas destruídas do espaço intermembrana para o interior do citoplasma. Incluindos neste existem fatores de indução a apoptose (MILLER, 1998).

O PTPM é um poro de grande condutância que se forma sob condições patológicas na membrana mitocondrial interna. O canal é aberto caracteristicamente por uma combinação de alta concentração de cálcio mitocondrial, estresse oxidativo, redução de ATP, alta concentração de fosfatos inorgânicos e despolarização mitocondrial. A abertura do canal é inibida por Mg^{2+} , ADP, "Cyclosporin" A e

moduladores de adenina nucleotídeo “translocase”. Atualmente não se sabe se o PTPM representa algum papel fisiológico normal no equilíbrio da mitocôndria ou se ele representa somente um processo patológico – existem evidências que suportam ambas as propostas (CROMPTON, 2000). É possível que o poro possa se manifestar em vários estados de condutância definindo a consequência de sua abertura. Assim, poderia ser esperado que aberturas reversíveis e passageiras de um baixo estado de condutância pudessem ter consequências bastante diferentes de uma abertura irreversível de um caminho de condutância alta, que causa expansão da mitocôndria, e inicializa liberação do citocromo C, ativação da caspase e morte da célula, ou o colapso do potencial mitocondrial (HUANG, ZHANG et al., 2003).

Estudos têm mostrado que em muitas doenças neurodegenerativas, como por exemplo, Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica, uma ou outra estrutura mitocondrial ou função é alterada (BEAL, 1998).

5.4. Hipótese da Excitotoxicidade Neuronal

A excitabilidade descreve a capacidade de uma célula manifestar uma resposta elétrica regenerativa de tudo ou nada à despolarização de sua membrana, sendo esta resposta conhecida como potencial de ação. Trata-se de uma característica da maioria dos neurônios. Mas se essa excitabilidade dura muito tempo, geralmente relacionada com o influxo de cálcio, pode causar excitotoxicidade do neurônio e com isso levar a vários danos relacionados a doenças neurodegenerativas (IENTILE, CACCAMO et al., 2002).

A sobrecarga de cálcio é o fator essencial na excitotoxicidade e o aumento na concentração interna de cálcio parece representar um importante papel no estímulo na

neurodegeneração (ZORUMSKI & OLNEY, 1993). Os mecanismos pelos quais isso ocorre e leva a morte celular são os seguintes:

- O glutamato ativa os receptores N-metil-D-asparato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e receptores metabotrópicos (locais 1,2 e 3 na Figura 4). A ativação dos receptores AMPA despolariza a célula, o que desbloqueia os canais de NMDA, permitindo a entrada de Ca^{2+} . A despolarização também abre os canais de cálcio ativados por voltagem (local 4 na Figura 4), liberando mais glutamato. Os receptores metabotrópicos causam a liberação de Ca^{2+} intracelular do retículo endoplasmático. A entrada a seguir de sódio contribui para a entrada de Ca^{2+} por estimular a troca $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ (local 5 na Figura 4). A despolarização inibe ou reverte a captação de glutamato (local 6 na Figura 4), assim, aumentando a concentração extracelular desta substância.

- O mecanismo que normalmente opera para contrabalançar a elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ inclui a bomba de efluxo de Ca^{2+} (local 7 na Figura 4) e, indiretamente, a bomba de Na^{+} (local 8 na Figura 4).

- A mitocôndria e o retículo endoplasmático atuam como armazenadores de grande capacidade para o Ca^{2+} e normalmente mantém a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ sob controle. Contudo, o carregamento dos estoques mitocondriais, além de um certo ponto, rompe a função mitocondrial, reduzindo a síntese de ATP. Isso reduz a energia disponível para as bombas de membrana e para o acúmulo de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático. Também é aumentada a formação de ERMO. Isto representa o ponto perigoso em que há uma cascata metabólica exagerando o processo.

A $[\text{Ca}^{2+}]_c$ elevada afeta muitos processos, sendo os principais e relevantes para a neurotoxicidade:

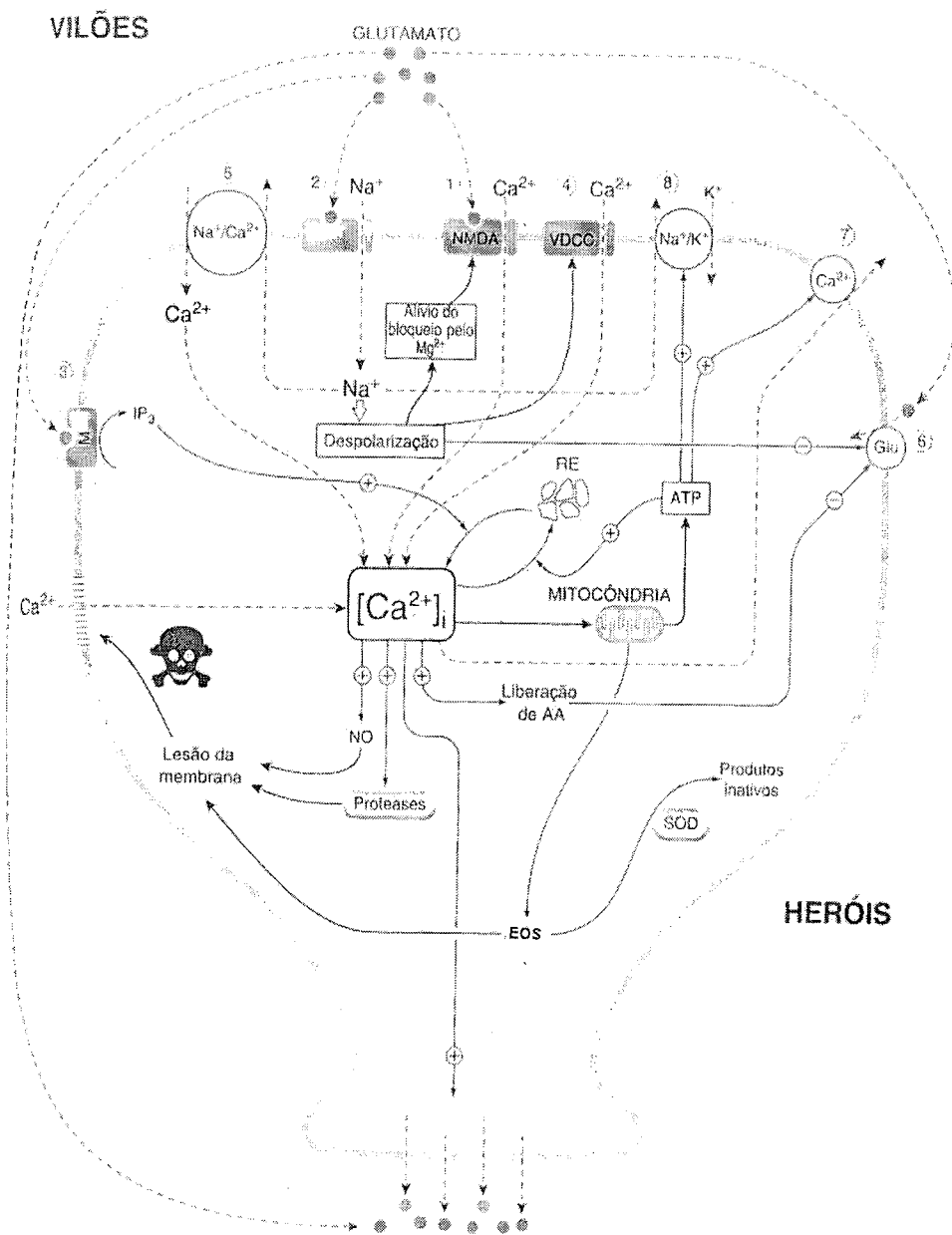


Figura 4: Mecanismo da Excitotoxicidade neural. Figura extraída e modificada de (RANG, DALE et al., 2004)

O cálcio e o glutamato são certamente os dois sinais químicos mais presentes, fora e dentro das células, respectivamente, subordinados à função cerebral. Logo, é

importante saber que alterações citotóxicas possam ser desencadeadas, quando eles estão fora de controle sendo a defesa contra a excitotoxicidade claramente essencial. O metabolismo energético mitocondrial fornece uma linha de defesa e, por isso, a função mitocondrial prejudicada, por tornar os neurônios vulneráveis à lesão excitotóxica, pode levar a várias condições neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (GREENAMYRE & YOUNG, 1989; RANG, DALE et al., 2004).

Neurônios que possuem receptores de glutamato são particularmente vulneráveis a excitotoxicidade quando os níveis da glicose e do oxigênio, essenciais para produção de energia, estão baixos, devido a necessidade de ATP para a remoção de Ca^{2+} do citoplasma.

Existem evidências de que a perda da homeostase de Ca^{2+} e uma excitotoxicidade contribuem para a degeneração neuronal na DA. Neurônios vulneráveis na DA possuem altos níveis de receptores de glutamato, particularmente receptores NMDA, os quais são muito eficientes na entrada de cálcio na célula.

Se a exposição ao glutamato é intensa, a morte neuronal do cortex pode ser disparada por um tempo de exposição tão pequeno quanto 2-3 minutos (LIPTON & ROSENBERG, 1994).

O impacto do influxo de Ca^{2+} extracelular pode ser aumentado pela liberação de Ca^{2+} de armazenamentos intracelulares, mediado pela elevação do IP_3 . Sob condições normais, esse aumento serve ao propósito da plasticidade sináptica e depolarização da membrana celular a longo tempo, mas sobre condições de excitotoxicidade, esse aumento pode piorar o dano.(CHOI, 1994; MATTSON, 1994)

5.5. Hipótese do envelhecimento junto com $\text{A}\beta$ e o equilíbrio do cálcio

A disponibilidade de glicose para os neurônios na DA é aparentemente menor, como resultado de uma redução em atividade de transporte de glicose e utilização de glicose no cérebro.

Na DA, um cenário razoável pode ser previsto no qual depósitos de A β são particularmente danosos quando se tem pouca energia disponível no neurônio, como pode ocorrer com idosos.

Mudanças relacionadas com o envelhecimento no cérebro foram relacionadas a uma perda da homeostase da concentração do cálcio interno na DA.

Um relativo aumento nos níveis de glicocorticoides em idosos e na DA podem contribuir para o aumento na $[Ca^{2+}]_i$ pelo dano no transporte de glicose e por meio disto aumentando a vulnerabilidade a excitotoxicidade (MATTSON, 1994).

5.6. Hipótese das alterações na membrana causada pela proteína quinase

Os receptores metabotrópicos estão acoplados a fosfolipase C (PLC) e a sua ativação leva a fosforilação do fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂) em inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). Assim a Ativação da fosfolipase C (PLC) faz disparar, através do IP₃, a liberação de cálcio do retículo endoplasmático. O DAG, por sua vez ativa a proteína quinase C (PKC). Essa enzima está localizada em parte no citoplasma e, para ser ativada pelo DAG, na qual age na membrana, a enzima deve ser deslocada do citoplasma para membrana. Como o deslocamento é disparado pelo cálcio, um aumento na concentração interna de cálcio, ativará a PKC, contanto que DAG seja formado. Um aumento massivo da concentração de cálcio interno pode causar um deslocamento sustentado e ativação da proteína PKC. Tal ativação pode alterar funções da membrana por fosforilação de receptores, canais iônicos ou translocases. Claramente, a estimulação de receptores de glutamato evoca uma

cascatas de reações causando influxo de cálcio através de vários tipos diferentes de canais, alguns dos quais são modulados por mensageiros intracelulares. É possível, portanto, que a disfunção celular devida a uma perda da homeostase de cálcio seja mediada por alterações sustentadas de proteínas quinases (ETCHEBERRIGARAY, GIBSON et al., 1994; HUANG, MARTINS et al., 1994; SIESJÖ, 1994).

O aumento do influxo na concentração de cálcio intracelular, além de ativar calmodulinas (proteínas) dependentes de cálcio que ativam proteínas quinase, causa disfunção mitocondrial e ativa lipases. Ativação de quinases sensíveis ao cálcio poderia resultar numa sobrecarga de fosforilação de proteínas do citoesqueleto, tais como a tau, cujas formas hiperfosforiladas são encontradas em emaranhados neurofibrilares (MATTSON, CHENG et al., 1992).

Estudos têm mostrado que a proteína quinase C potencializa respostas dos receptores NMDA pelo aumento da probabilidade de abertura dos canais NMDA e por reduzir a dependência da voltagem para o bloqueio do Mg^{2+} dos receptores NMDA (BEAL, 1992).

6. A modelagem do Ca^{2+} na Doença de Alzheimer

Nesse trabalho há o interesse de modelar as principais funções neuronais que estão envolvidas na doença de Alzheimer. Cada função celular foi descrita anteriormente e precisaremos dos conceitos descritos para elucidar o modelo desenvolvido, que foi feito em três partes:

- Os diagramas, onde foram descritos os principais processos celulares que estão envolvidos direta ou indiretamente na Doença de Alzheimer. Os diagramas foram construídos usando uma metodologia semelhante a que se utiliza em modelagem de sistemas computacionais. Sendo que cada caixa representa, em sua maioria, um processo ou um conjunto de processos celulares.

- As equações, onde foram representados através de equações algébricas ou diferenciais, os processos já representados nos diagramas.

- Simulação computacional, onde foram implementadas as equações acima mencionadas.

Esse trabalho foi desenvolvido com a intenção de simular uma parte de muitas da complexa Doença de Alzheimer. Outras partes foram desenvolvidas em mais dois trabalhos onde foram implementadas também outros processos da doença de Alzheimer estudados (REIS, 2005; VIANNA, 2005). O sistema de simulação foi escrito para simular o modelo, resolvendo e integrando as equações algébricas e diferenciais respectivamente. Para integrar as equações diferenciais foi usado o método da diferenças finitas simples.

6.1. Metabolismo do Cálcio

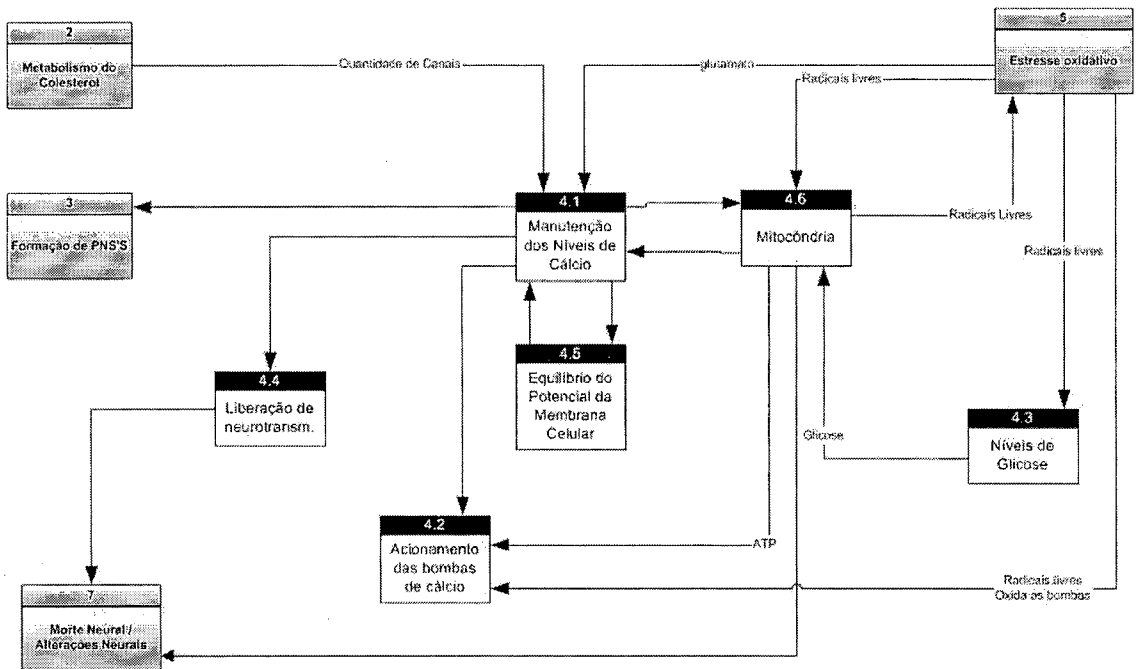


Figura 5: Diagrama do metabolismo do Cálcio. Diagrama de nível zero neste trabalho

6.1.1. Manutenção dos Níveis de Cálcio

A manutenção dos níveis de cálcio envolve vários processos celulares (Figura 5) sendo um deles a entrada dos íons de cálcio através de canais condutores, como vimos anteriormente. Os canais de cálcio podem ser combinados em um mesmo circuito equivalente. Assim podemos modelar a condutância total para todos os canais de Ca^{2+} (g_{Ca}), isto é, a condutância ao Ca^{2+} da membrana celular é igual ao número dos canais de Ca^{2+} (N_{Ca}), multiplicado pela condutância de um canal único de Ca^{2+} (g_{Ca}) equação (2) (KANDEL, SCHWARTZ et al., 1997).

Radicais livres produzidos no Estresse Oxidativo inibem os transportadores de glutamato (DANBOLT, 2001). Essa inibição vai fazer com que o glutamato fique por mais tempo no meio extracelular ativando os receptores de glutamato por mais tempo. Com isso há um aumento do influxo de cálcio causando excitotoxicidade, entre outras alterações (MARKESBERY, 1997). Esse processo de ativação dos receptores de glutamato será detalhado mais adiante.

Se a carga de Ca^{2+} no interior da mitocôndria é muito forte para uma mitocôndria, ela pode sofrer TPM e liberar seus íons de cálcio seqüestrados, por meio disso aumentando a carga às mitocôndrias intactas restantes. Ou as mitocôndrias podem seqüestrar os íons de cálcio aliviando a sobrecarga de cálcio citoplasmático. (HANSSON, PERSSON et al., 2003). Esse processo também será detalhado mais adiante.

Outras estruturas importantes na manutenção dos níveis de cálcio são os canais de cálcio dependente de voltagem. Esses canais permitem a entrada significativa de Ca^{2+} na célula sempre que a membrana estiver despolarizada, como, por exemplo, por um potencial de ação conduzido (RANG, DALE et al., 2004). Portanto o potencial da

membrana celular vai influenciar na concentração de cálcio interno. A ativação desses canais poderá ser modelada usando a equação (6). Onde um limiar de voltagem faz a função retornar 1:

$$f(V) = \begin{cases} 1, & \text{se } V \geq \theta \\ 0, & \text{se } V < \theta \end{cases} \quad (6)$$

onde θ é o limiar da voltagem para a abertura dos canais dependentes de voltagem.

6.1.2. Equilíbrio Potencial da Membrana Celular

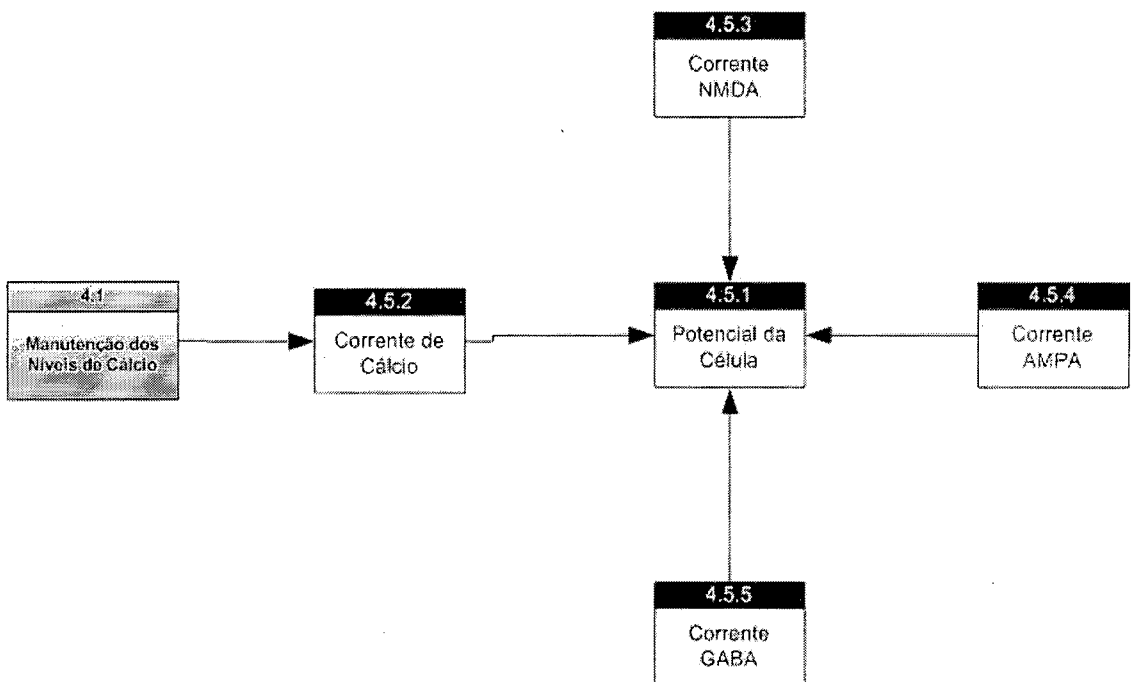


Figura 6: Diagrama potencia da embrana. Somatório das correntes

Com a entrada de Ca^{2+} na célula, o potencial da membrana tende a se despolarizar devido a carga positiva do Cálcio. Essa despolarização é caracterizada

pelo influxo de íons positivos (cátions), tornando o potencial da membrana menos negativo. Esse Influxo pode ser caracterizado por uma corrente. Cada corrente será detalhada mais adiante (CARVALHO & ROITMAN, 1995; IENTILE, CACCAMO et al., 2002).

$$\frac{CdV}{dt} = I_{Ca} + I_{NMDA} + I_{AMPA} - I_{GABA} \quad (\text{Veja Figura 6}) \quad (7)$$

onde:

- I_{Ca} é a corrente causada pelo influxo dos íons de cálcio pelos canais dependentes de voltagem;
- I_{NMDA} é a corrente causada pelo influxo de íons de cálcio pelos receptores NMDA;
- I_{AMPA} é a corrente causada pelo influxo de íons de sódio pelos receptores AMPA;
- I_{GABA} é a corrente causada pelo influxo de íons de cloro pelos receptores GABA hiperpolarizando a célula;
- V o potencial da membrana plasmática e C capacitância da membrana plasmática.

6.1.3. Acionamento das Bombas de Cálcio

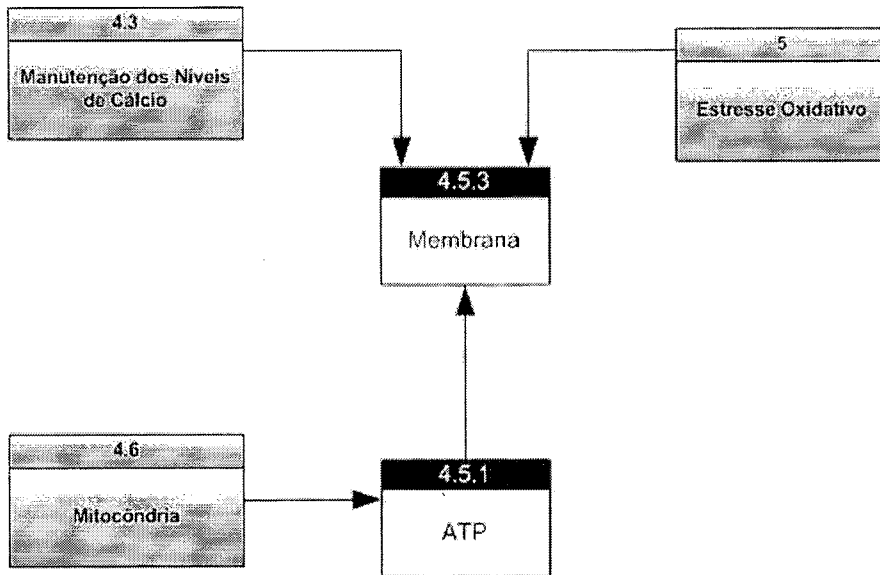


Figura 7: Diagrama do acionamento da bombas de cálcio

Quando a concentração de cálcio citoplasmático atinge um certo limiar, as bombas eletroquímicas são ativadas e começam a colocar Ca^{2+} para fora do meio intracelular. Esse processo é feito através da troca de dois íons de cálcio, possivelmente para dois íons de hidrogênio por ligação de ATP quebrada (PATTON, FUCHS et al., 1989a).

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{BOMBA}}}{dt} = a_{42} * 2 * [\text{ATP}] * [\text{BCa}] \quad , \text{ onde } a_{42} \text{ é uma constante.} \quad (8)$$

O ATP usado pelas bombas é fornecido pela mitocôndria que o produz através do ciclo de Krebs, que chamamos de síntese de ATP. (PATTON, FUCHS et al., 1989a);

O acionamento das bombas estará utilizando o ATP produzido pelas mitocôndrias. Podemos dizer que a variação de ATP vai estar relacionada com a quantidade de cálcio expulso pelas bombas. Veja (Figura 7).

$$\frac{d[\text{ATP}]}{dt} = -\frac{b_{42}}{2} * [\text{Ca}^{2+}]_{\text{SAI}}, \text{ onde } b_{42} \text{ é uma constante} \quad (9)$$

Entre os efeitos da oxidação no cérebro, está a peroxidação de lipídios que compõe a membrana celular. O 4-HNE, um dos principais produtos formados pela peroxidação de lipídios das membranas celulares, danificou a atividade de bombas de íons aumentando a concentração de cálcio interno (BUTTERFIELD, DRAKE et al., 2001)

$$\frac{d\text{BCa}}{dt} = [\text{BCa}] - c_{42} * [\text{RLi}] \quad (10)$$

onde BCa é o número de bombas de cálcio, RLi Radical Livre, nb é número de bombas e c_{42} é uma constante

O resultante aumento do influxo na concentração de cálcio intracelular ativa calmodulinas dependentes de cálcio, que ativa proteínas quinase, que por sua vez rompe o citoesqueleto, causa disfunção mitocondrial e ativa lipases. A ativação de quinases pode resultar numa sobrecarga de fosforilação de proteínas do citoesqueleto tais como a tau (MATTSON, CHENG et al., 1992).

6.1.4. Níveis de Glicose

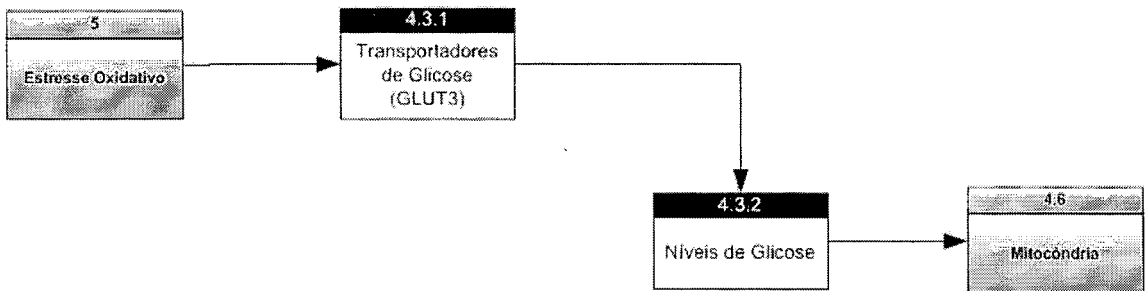


Figura 8: Diagrama dos níveis de glicose no cérebro

No cérebro, há dois transportadores de glicose, o GLUT1, presente nas células endoteliais, e o GLUT3, presente nos neurônios (MATTSON, 1997). O 4-HNE, um dos principais produtos formados pela peroxidação de lipídios das membranas celulares (ESTERBAUER, SCHAUR et al., 1991), pode se conjugar com o GLUT3, danificando o transporte de glicose neuronal (MIRNADA, OPAZO et al., 2000). Os danos ao transporte de glicose podem causar uma queda nos níveis de ATP veja (Figura 8) (VARADARAJAN, YATIN et al., 2000).

$$\frac{d[\text{TGli}]}{dt} = [\text{TGli}] - a_{43} * [\text{RLi}] \quad (11)$$

onde $[\text{TGli}]$ é a quantidade de transportadores de glicose, $[\text{RLi}]$ radicais livres e a_{43} uma constante.

$$\frac{d[\text{Gli}]_c}{dt} = b_{43} * [\text{TGli}] * [\text{Gli}]_{\text{EXT}} \quad (12)$$

onde $[\text{Gli}]_c$ é a concentração de glicose no citoplasma, $[\text{Gli}]_{\text{EXT}}$ é a concentração de glicose no exterior da célula e b_{43} uma constante.

6.1.5. Liberação de Neurotransmissor

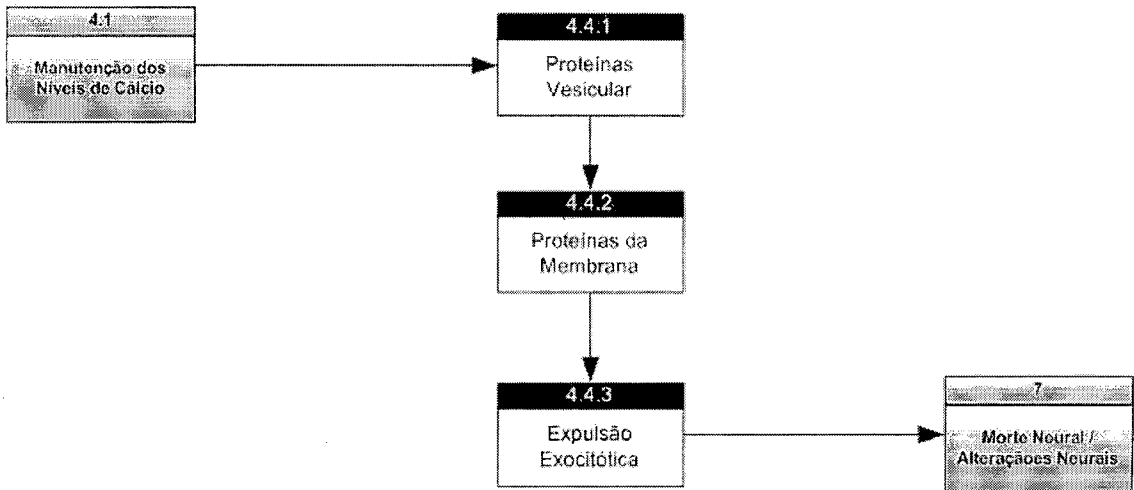


Figura 9: Diagrama da liberação de neurotransmissores

A liberação do transmissor depende da presença de cálcio extracelular e ocorre quando um potencial de ação atinge a terminação e desencadeia um influxo suficiente de íons de cálcio (KATZUNG, 2003). A liberação de transmissores é proporcional ao influxo de Ca^{2+} para dentro da terminação pré-sináptica. A quantidade de corrente de Ca^{2+} através dos canais dependentes de voltagem determina a quantidade de transmissores liberados, o que, por sua vez, determina o tamanho do potencial pós-sináptico (KANDEL, SCHWARTZ et al., 1997).

$$\text{LibCaProt} = e_4 * [\text{PCa}] \quad (13)$$

onde LibCaProt é a quantidade de cálcio e proteína liberada, [PCa] concentração de proteína ligada a cálcio e e_4 uma constante.

$$\text{LigCaProt} = f_4 * [\text{P}] * [\text{Ca}] \quad (14)$$

onde LigCaProt é a quantidade de proteína ligada a cálcio, [P] concentração de proteína, [Ca] concentração de cálcio e f_4 uma constante.

$$\frac{d[PCa]}{dt} = 4g_4LigCaProt - 4h_4LibCaProt \quad (15)$$

Tendo a equação (16) para representar a variação de proteínas dependente de cálcio ativadas podemos construir uma equação que modele a liberação do neurotransmissor de acordo com a variação de proteínas (Figura 9).

$$\frac{d[VisAtv]}{dt} = i_4 * [PCa] * [VisDes] - j * [VisAtv] \quad (16)$$

onde:

- VisAtv – quantidade de vesículas de neurotransmissores ativadas;
- VisDes – quantidade de vesículas de neurotransmissores desativadas;

Portanto a quantidade de vesículas de glutamato liberada será diretamente proporcional ao número de proteínas dependentes de cálcio ativadas.

6.1.6. Mitocôndria

O Oxido Nítrico (NO) e seu metabolismo tóxico podem inibir componentes da cadeia respiratória mitocondrial levando, se o dano for bastante severo, a um estado de deficiência da energia celular.

$$\frac{d[CR]}{dt} = ncr - [RLi] * l_4 \quad (17)$$

onde [CR] é a quantidade de cadeias respiratória, ncr é o número de cadeias respiratórias e l_4 uma constante.

A acumulação excessiva de cálcio pode aumentar a taxa de geração de ERMO (DUGAN, SENSI et al., 1995). O aumento da geração de ERMO pode estar associado não só ao excesso de cálcio, mas sim a algum dano na cadeia respiratória (KRIEGER & DUCHEN, 2002).

$$\frac{d[RL]}{dt} = m_4 * [RL]_M - n_4 * [ANT] \quad (18)$$

onde $[RL]_M$ é a concentração de Radicais Livres gerados pela mitocôndria, $[RL]$ concentração de radicais livres e $[ANT]$ a de antioxidantes.

Processos gerados pela mitocôndria em estado patológico poderão levar ao desencadeamento de funções que levam a morte neural. Tais processos serão explicitados futuramente.

6.2. Manutenção dos Níveis de Cálcio

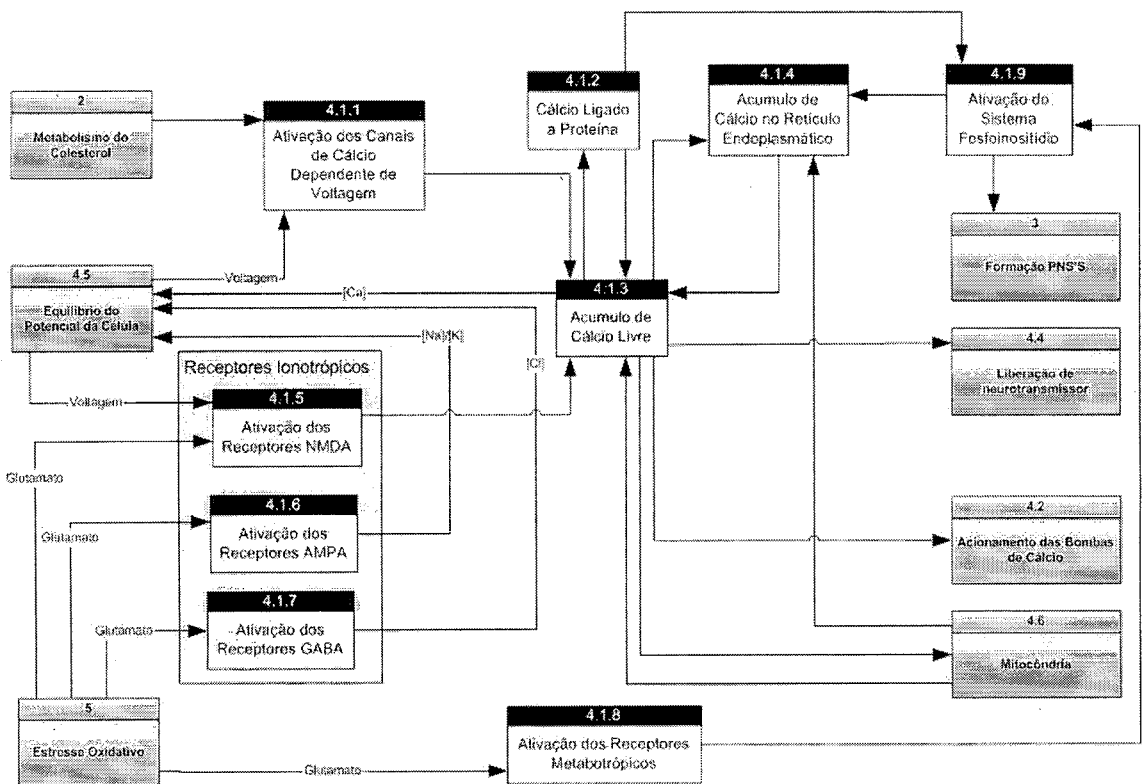


Figura 10: Diagrama da manutenção dos níveis de cálcio na célula

6.2.1. Ativação dos Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem

A condutância total para todos os canais de Ca^{2+} é dada pela equação (2).

O número de canais de cálcio será fornecido pelo processo **Metabolismo do Colesterol**. Assim podemos calcular, obedecendo a lei de Ohm, qual será a corrente causada pelo influxo de íons de cálcio pelos canais dependentes de voltagem usando a seguinte equação:

$$I_{\text{Ca}} = g_{\text{Ca}} * (V_m - E_{\text{Ca}}) \quad (19)$$

onde I_{Ca} é a corrente causada pelo influxo dos íons de cálcio, g_{Ca} foi descrito anteriormente, V_m o potencial da membrana plasmática e E_{Ca} o potencial de Nernst para o Ca^{2+} . Essa corrente de cálcio só poderá acontecer quando o potencial da membrana celular atingir o limiar, os canais de cálcio dependentes de voltagem serão abertos e esse processo pode ser representado pela equação (6). Assim a variação da concentração de cálcio provocada pelos canais dependentes de voltagem pode ser representada pela equação (20).

$$\frac{d[\text{Ca}]_{\text{CDV}}}{dt} = f(V) * (I_{\text{Ca}}) \quad (20)$$

6.2.2. Cálcio Ligado a Proteína

Ligadas não só a variação da concentração interna do cálcio, as proteínas dependentes de cálcio também estão envolvidas em várias funções celulares. Essa variação vai ser igual a concentração da proteína ligada (equação 13) menos o produto da proteína com Ca^{2+} necessário a ela (equação 14) (KOCH, 1999).

$$\frac{d[\text{Ca}]_{\text{Prot}}}{dt} = \text{LibCaProt} - \text{LigCaProt} \quad (21)$$

6.2.3. Ativação do Sistema Fosfoinositídeo

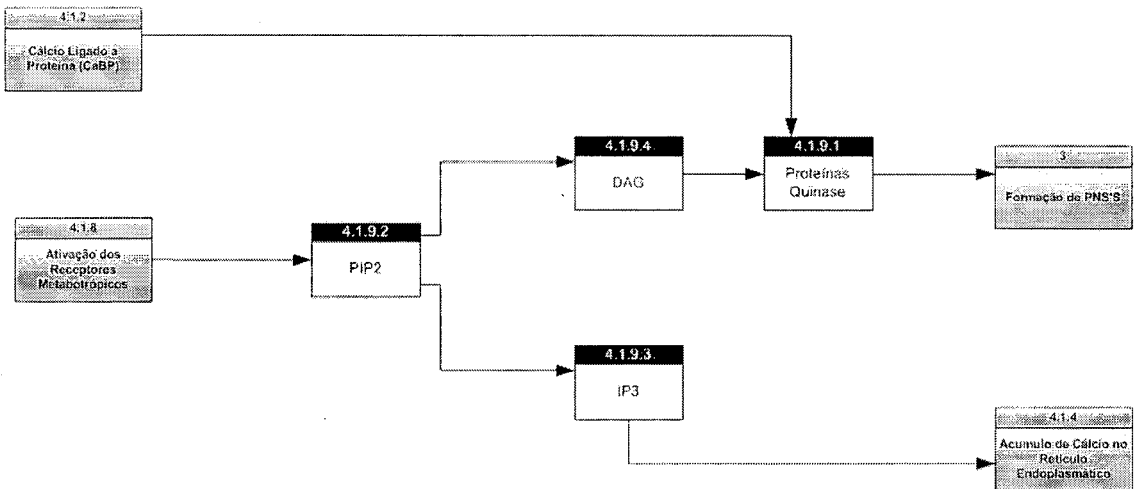


Figura 11: Diagrama do Sistema Fosfoinositídeo

As proteínas dependentes de cálcio são responsáveis por deslocar a proteína quinase (PKC) que está localizada no citoplasma, até a membrana onde será ativada pelo DAG. Sua ativação leva a fosforilação de proteínas tais como a Tau (Figura 11).

Para que o DAG seja formado é necessário que os receptores metabotrópicos estejam ativados. A ativação desses receptores resultará, através da fosforilação da PIP_2 , em DAG e IP_3 (que é responsável pela liberação de cálcio do retículo endoplasmático).

$$\frac{d[PIP_2]}{dt} = a_{419} * [R_{META} Atv] \quad (22)$$

onde $[PIP_2]$ é a concentração de PIP_2 , $[R_{META} Atv]$ quantidade de receptores metabotrópicos ativados e a_{419} uma constante.

$$\frac{d[DAG]}{dt} = b_{419} * [PIP_2] \quad (23)$$

onde $[DAG]$ é a concentração de DAG e b_{419} uma constante.

$$\frac{d[IP_3]}{dt} = c_{419} * [PIP_2] \quad (24)$$

onde $[IP_3]$ é a concentração de IP_3 e c_{419} uma constante.

A variação da concentração de proteínas dependentes de cálcio ligadas à proteína quinase pode ser representada pela equação (25):

$$\frac{d[PKCPCa]}{dt} = d_{419} * [PKC]_c * [PCa] \quad (25)$$

onde $[PKCPCa]$ é a concentração de proteína quinase ligada a proteína dependente de cálcio, $[PKC]_c$ a concentração de proteína quinase no citoplasma e $[PCa]$, como vimos anteriormente, é a concentração de proteína dependente de cálcio ligada a cálcio.

A variação da concentração de proteína quinase na membrana pode ser modelada pela quantidade de proteína ligada à proteína ligada ao cálcio menos a quantidade de proteína que está sendo ativada pelo DAG:

$$\frac{d[PKC]_{Memb}}{dt} = f_{419} * [PKCPCa] \quad (26)$$

onde $[PKC]_{Memb}$ é a concentração de proteína quinase na membrana celular e $[DAG]$ concentração de DAG fosforilado pelo PIP_2 .

Nesse trabalho consideramos que assim que proteína quinase fosforila a proteína Tau, ela volta para o citoplasma para cumprir novamente seu ciclo. Assim, a concentração de proteína quinase ativada na membrana varia de acordo com a equação (30). Onde a $[PKCAtv]_{Memb}$ é a concentração de proteína quinase ativada.

$$\frac{d[PKCAtv]_{Memb}}{dt} = h_{419} * [PKC]_{Memb} * [DAG] - i_{419} * [PKCAtv]_{Memb} * [Tau] \quad (27)$$

Quanto à quantidade de proteína quinase no citoplasma, sua variação vai depender da quantidade de Tau fosforilada:

$$\frac{d[\text{PKC}]_C}{dt} = j_{419} * [\text{PKCA}_{\text{tv}}]_{\text{Memb}} * [\text{Tau}] - l_{419} * [\text{PKC}]_C * [\text{PCa}] \quad (28)$$

onde $[\text{PKC}]_C$ é a concentração de proteína quinase no citoplasma.

A quantidade de proteína Tau fosforilada varia de acordo com o número de proteínas ativadas na membrana:

$$\frac{d[\text{Tau}]_F}{dt} = m_{419} * [\text{PKCA}_{\text{tv}}]_{\text{Memb}} * [\text{Tau}] \quad (29)$$

onde $[\text{Tau}]_F$ é a concentração da proteína Tau fosforilada.

6.2.4. Acúmulo de Cálcio no Retículo Endoplasmático

A liberação do cálcio do retículo endoplasmático depende, principalmente, do IP_3 , que ativa receptores existentes no retículo. Esses receptores ativados vão liberar o cálcio armazenado. Vejamos a equação (30) que representa a ativação desses receptores ao longo do tempo:

$$\frac{d[\text{RIP}_3\text{Atv}]}{dt} = a_{414} * [\text{IP}_3] * [\text{RIP}_3] - b_{414} * [\text{RIP}_3\text{Atv}] \quad (30)$$

onde $[\text{RIP}_3\text{Atv}]$ é a quantidade de receptores ativados e RIP_3 a quantidade de receptores desativados.

A entrada de cálcio no retículo endoplasmático gasta ATP, assim podemos representar essa entrada de forma proporcional a concentração de ATP disponível na célula.

$$\text{EntraCaRE} = 2 * c_{414} * [\text{ATP}] \quad (31)$$

E a saída, que é a liberação do RE, fica de acordo com a equação (32):

$$\text{SaiCaRE} = d_{414} * [\text{RIP}_3\text{Atv}] \quad (32)$$

Assim, a variação da concentração do cálcio no citoplasma, provocada pelo retículo endoplasmático, é representada pela equação (36):

$$\frac{d[\text{Ca}]_{\text{RE}}}{dt} = \text{SaiCaRE} - \text{EntraCaRE} \quad (33)$$

6.2.5. Acúmulo de Cálcio Livre

O acúmulo de cálcio no citoplasma depende de vários processos celulares. Logo, a variação da quantidade deste íon está relacionada com a contribuição de cada processo. Assim, modelamos a equação (34) para representar a participação de cada processo no acúmulo do cálcio no interior da célula (CARVALHO, 1994).

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Ca}]_{\text{C}}}{dt} = & a_{413} * \frac{d[\text{Ca}]_{\text{CDV}}}{dt} + b_{413} * \frac{d[\text{Ca}]_{\text{prot}}}{dt} + c_{413} * \frac{d[\text{Ca}]_{\text{RE}}}{dt} + \\ & + d_{413} * \frac{d[\text{Ca}]_{\text{NMDA}}}{dt} + e_{413} * \frac{d[\text{Ca}]_{\text{MITO}}}{dt} - f_{413} * \frac{d[\text{Ca}]_{\text{BOMBA}}}{dt} \end{aligned} \quad (34)$$

6.2.6. Receptores Ionotrópicos

6.2.6.1. Ativação do Receptores NMDA

Os receptores de glutamato do tipo NMDA, além de dependerem diretamente do glutamato, precisam que o potencial da membrana atinja um limiar para que o Mg^{2+} , localizado no canal, seja expulso. Portanto este receptor também é dependente de voltagem. Assim, podemos imaginar que a corrente de cálcio pelos receptores NMDA pode ser representada pela equação:

$$I_{\text{NMDA}} = g_{\text{NMDA}}(V) * [R_{\text{NMDA}}A] * (V - E_{\text{NMDA}}) \quad (35)$$

onde g_{NMDA} (condutância) será dependente de voltagem.

O bloqueio do magnésio no receptor NMDA é um processo extremamente rápido, comparado a outros receptores. O bloqueio pode então ser corretamente modelado por uma função onde a concentração de magnésio está envolvida, como foi feito por (JAHR & STEVENS, 1990a; JAHR & STEVENS, 1990b). Porém nesse trabalho houve uma simplificação tendo em vista a necessidade de modelar a concentração de magnésio. Portanto poderia ser o modelo representado somente em função da voltagem. A função (36) julga que os receptores NMDA são dependentes de voltagem, pois através da despolarização da membrana o magnésio será expulso. Assim a equação representaria a condutância do receptor NMDA:

$$g_{\text{NMDA}}(V) = a_{41} * f(V) * [R_{\text{NMDA}}A] \quad (36)$$

onde V é o potencial da membrana, $f(V)$ descrita na equação (6) e $[R_{\text{NMDA}}A]$ é a quantidade de receptores NMDA ativados.

Antes do desbloqueio, o canal receptor NMDA precisa ser aberto pelo glutamato. Portanto precisamos modelar essa abertura.

$$\frac{d[R_{\text{NMDA}}A]}{dt} = a_{415} * [\text{Glu}] * [R_{\text{NMDA}}F] - b_{415} * [R_{\text{NMDA}}A] \quad (37)$$

onde:

- $[R_{\text{NMDA}}F]$ – quantidade de receptores NMDA fechados;
- $[\text{Glu}]$ – concentração de glutamato;
- a_{415} e b_{415} são constantes;

6.2.6.2. Ativação do Receptores AMPA

Os receptores de glutamato do tipo AMPA são responsáveis pela despolarização inicial da membrana celular (KOCH, 1999; KOCH & SEGEV, 1998). A corrente causada pelo influxo de sódio pelos receptores de glutamato AMPA pode ser modelada da seguinte forma:

$$I_{\text{AMPA}} = g_{\text{AMPA}} * [R_{\text{AMPA}}\text{A}] * (V - E_{\text{AMPA}}) \quad (38)$$

onde g_{AMPA} é a condutância do receptor AMPA, $[R_{\text{AMPA}}\text{A}]$ é a quantidade de receptores abertos e E_{AMPA} força eletromotriz do íon que atravessa os receptores AMPA. Sua variação pode ser representada por:

$$\frac{d[R_{\text{AMPA}}\text{A}]}{dt} = a_{416} * [\text{Glu}] * [R_{\text{AMPA}}\text{F}] - b_{416} * [R_{\text{AMPA}}\text{A}] \quad (39)$$

onde:

- $[R_{\text{AMPA}}\text{A}]$ – quantidade de receptores AMPA abertos;
- $[R_{\text{AMPA}}\text{F}]$ – quantidade de receptores AMPA fechados;
- $[\text{Glu}]$ – concentração de glutamato;

6.2.6.3. Ativação dos Receptores GABA

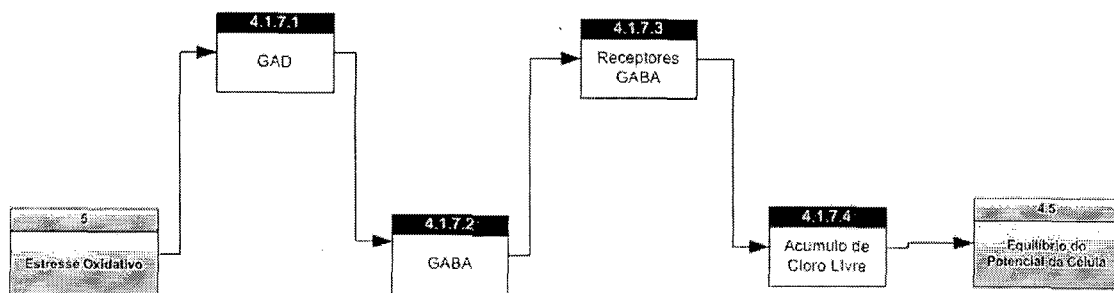


Figura 12: Diagrama dos Receptores GABA

O GABA é formado a partir do glutamato pela ação da GAD (ácido glutâmico descarboxilase). Sua ativação permite a entrada de íons de cloro hiperpolarizando a membrana celular, ou seja, tornando o potencial mais negativo (Figura 12).

A corrente causada pelo influxo de cloro pelos receptores GABA pode ser modelada da seguinte forma:

$$I_{GABA} = g_{GABA} * [R_{GABA}A] * (V - E_{GABA}) \quad (40)$$

onde g_{GABA} é a condutância do receptor GABA, $[R_{GABA}A]$ é a quantidade de receptores abertos e E_{GABA} força eletromotriz do íon que atravessa os receptores GABA. Sua variação pode ser representada por:

$$\frac{d[R_{GABA}A]}{dt} = a_{416} * [Glu] * [R_{GABA}F] - b_{416} * [R_{GABA}A] \quad (41)$$

onde:

- $[R_{GABA}A]$ – quantidade de receptores GABA abertos;
- $[R_{GABA}F]$ – quantidade de receptores GABA fechados;
- $[Glu]$ – concentração de glutamato;
- a_{416} e b_{416} são constantes;

6.2.7. Ativação dos Receptores Metabotrópicos

Os receptores metabotrópicos são reponsáveis pela ativação do sistema fosfoinositidio. Isso é feito por meio de segundos mensageiros.

Os receptores são ativados pelo glutamato e a variação de receptores ao longo do tempo pode ser representada por:

$$\frac{d[R_{META}Atv]}{dt} = a_{418} * [Glu] * [R_{META}Des] - b_{418} * [R_{META}Atv] \quad (42)$$

onde:

- $[R_{META}Atv]$ – quantidade de receptores metabotrópicos ativados;
- $[R_{META}Des]$ – quantidade de receptores metabotrópicos desativados;
- $[Glu]$ – concentração de glutamato;

6.3. Mitocôndria

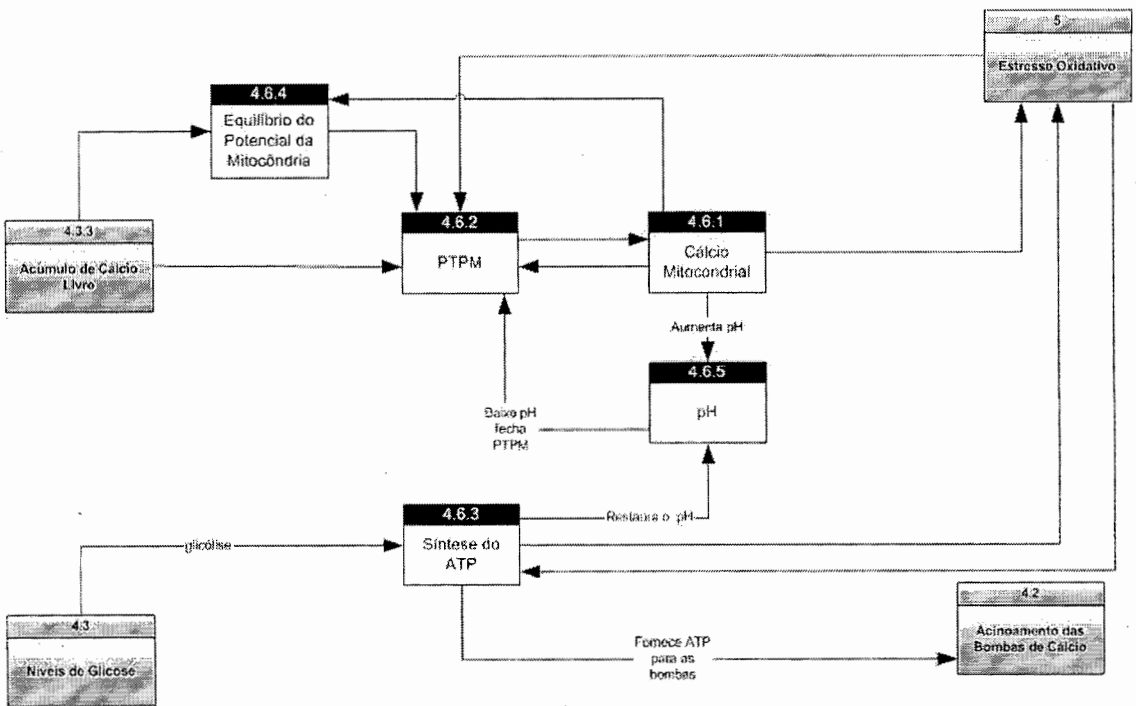


Figura 13: Diagrama dos processos mitocondriais

6.3.1. PTPM

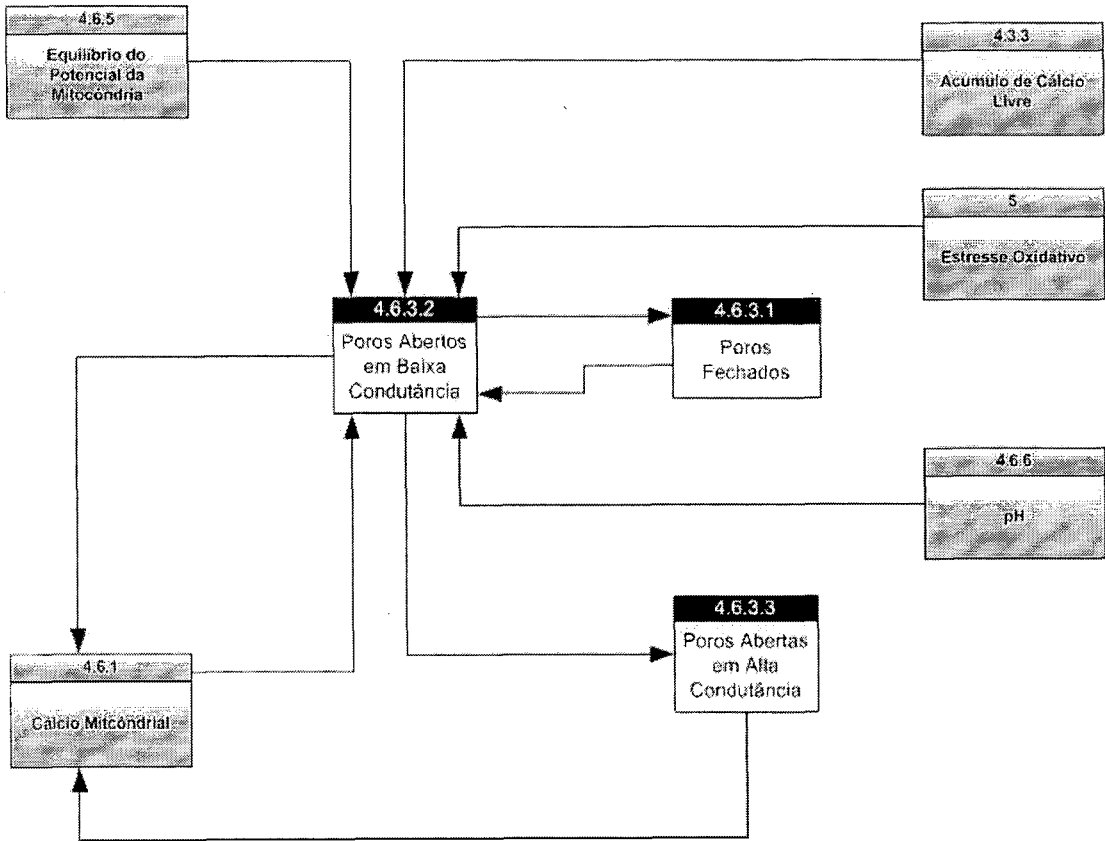


Figura 14: Diagrama da ativação dos poros de transição mitocondrial

Em condições patológicas, como por exemplo, na excitotoxicidade, o Ca^{2+} entra na mitocôndria pelo Poro de Transição a Permeabilidade Mitocondrial (PTPM) (Figura 13) e (Figura 14) (MILLER, 1998).

Em equilíbrio, a distribuição de cálcio através da membrana mitocondrial é mediada pela equação: (NICHOLLS & WARD, 2000)

$$[\text{Ca}]_{\text{MIT}} = a_{4632} * [\text{PTPMAtv}] * [\text{Ca}]_{\text{CITO}} \quad (43)$$

$$\frac{d[\text{PTPMA}_{\text{tv}}]}{dt} = a_{463} * [\text{pH}] * [\text{PTPMD}_{\text{Des}}] - b_{463} * [\text{PTPMA}_{\text{tv}}] \quad (44)$$

onde:

- [PTPMA_{tv}] – quantidade de poro de permeabilidade mitocondrial ativado;
- [PTPMD_{Des}] – quantidade de poro de permeabilidade mitocondrial desativados;

Existem vários fatores que podem comprometer esse equilíbrio e colocar os poros de permeabilidade mitocondrial em abertura permanente. Entre eles estão o estresse oxidativo, o acúmulo de cálcio livre, o equilíbrio do potencial mitocondrial e o pH, modelado como:

$$fV_M(V) = \begin{cases} 1, \text{ se } V_M < l_{\text{VOLT}} \\ 0, \text{ se } V_M > l_{\text{VOLT}} \end{cases} \quad (45)$$

onde a voltagem favorece a abertura dos canais PTPM de maneira permanente;

$$f_{\text{pH}}(\text{pH}) = \begin{cases} 1, \text{ se } \text{pH} > 7 \\ 0, \text{ se } \text{pH} \leq 7 \end{cases} \quad (46)$$

onde o pH básico favorece a abertura dos canais PTPM de maneira permanente;

$$f_{\text{Ca}}([\text{Ca}]) = \begin{cases} 1, \text{ se } [\text{Ca}]_M \geq l_{\text{PTPM}} \\ 0, \text{ se } [\text{Ca}]_M < l_{\text{PTPM}} \end{cases} \quad (47)$$

onde a concentração de cálcio mitocondrial acima de um limiar, favorece a abertura irreversível dos canais PTPM.

$$\frac{d[\text{PTPMP}_{\text{Perm}}]}{dt} = fV_M * f_{\text{pH}} * f_{\text{Ca}} * [\text{PTPMA}_{\text{tv}}] \quad (48)$$

onde o [PTPMP_{Perm}] é a quantidade de Poro de Transição da Permeabilidade Mitocondrial aberto de modo permanente;

6.3.2. Cálcio Mitocondrial

Para representar a TPM podemos utilizar a equação (49):

$$fm([Ca]_M) = \begin{cases} 1, & \text{se } [Ca]_M \geq l_{tpm} \\ 0, & \text{se } [Ca]_M < l_{tpm} \end{cases} \quad (49)$$

onde l_{tpm} é o limiar da concentração de cálcio mitocondrial para que a mitocôndria sofra TPM.

$$SaiCaMito = fm([Ca]_M) * [Ca]_{MITO} + c_{463} * [Ca]_{Na/Ca} \quad (50)$$

$$\frac{d[Ca]_M}{dt} = SaiCaMito - d_{463} * [PTPMA_{tv}] - e_{463} [PTPMP_{perm}] \quad (51)$$

onde d_{463} e e_{463} são constantes.

6.3.3. Equilíbrio do Potencial da Mitocôndria

A despolarização causada pelo acúmulo de cálcio na mitocôndria vai ser representada pela corrente de cálcio nos canais dependentes de voltagem. Tornando o potencial da membrana mitocondrial menos negativo (R. IENTILE, D. CACCAMO et al., 2002).

$$I_{CaM} = g_{CaM} * (V_{MIT} - E_{Ca}) \quad (52)$$

$$\frac{CdV_{MIT}}{dt} = I_{Ca} \quad (53)$$

onde C é a capacitância da membrana mitocondrial.

6.3.4. pH

A entrada de cálcio no interior da mitocôndria aumenta o pH, facilitando o fechamento.

$$\frac{d[\text{pH}]}{dt} = g_{463} * [\text{Ca}]_M \quad (54)$$

6.3.5. Síntese do ATP

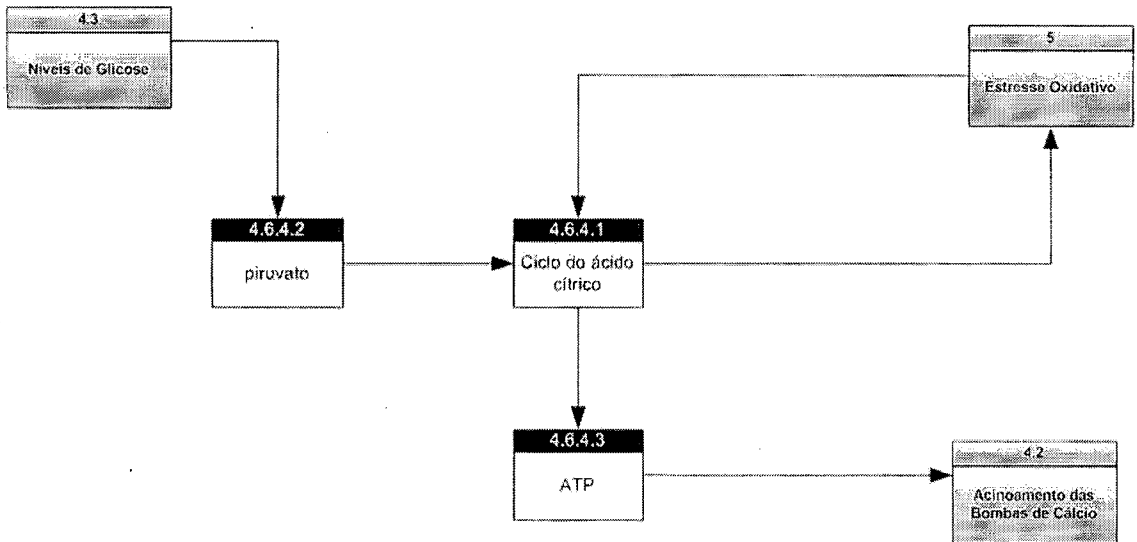


Figura 15: Diagrama da síntese do ATP no interior da mitocondria

A síntese do ATP, sob certas condições, pode gerar ERMO (por exemplo oxigênio e radicais livres hidroxila, e peróxido de hidrogênio) como subprodutos secundários (Figura 15).

A variação da concentração de ATP é proporcional à quantidade de glicose ([Gli]).

$$\frac{d[\text{ATP}]}{dt} = a_{464} * [\text{Gli}] - b_{464} * [\text{RL}]_M \quad (55)$$

$$\frac{d[\text{RL}]_M}{dt} = c_{464} * [\text{Gli}] - d_{464} * [\text{RL}]_M - e_{464} * [\text{ANT}] \quad (56)$$

As constantes acima definidas a_{464} e b_{464} são proporcionais às constantes c_{464} e d_{464} . Para cada ATP gerado há um grau de radicais livres produzido pela mitocôndria ($[RL]_M$). A geração de radicais será aliviada pelos antioxidantes ($[ANT]$)

O canal respiratório agora restaura o gradiente de prótons, e assim por diante. Dessa maneira, a abertura transiente do PTPM produz o spike CICR observado (MILLER, 1998).

7. Resultados

7.1. Simulação de uma célula normal

Os gráficos que seguem mostram a variação das concentrações de substâncias relevantes na Doença de Alzheimer. Primeiro foi simulado para um neurônio com proporções normais das suas concentrações.

O glutamato abre os canais receptores NMDA. Portanto a concentração de glutamato vai caindo enquanto que o número de canais abertos vai aumentando, como ilustrado na Figura 16.

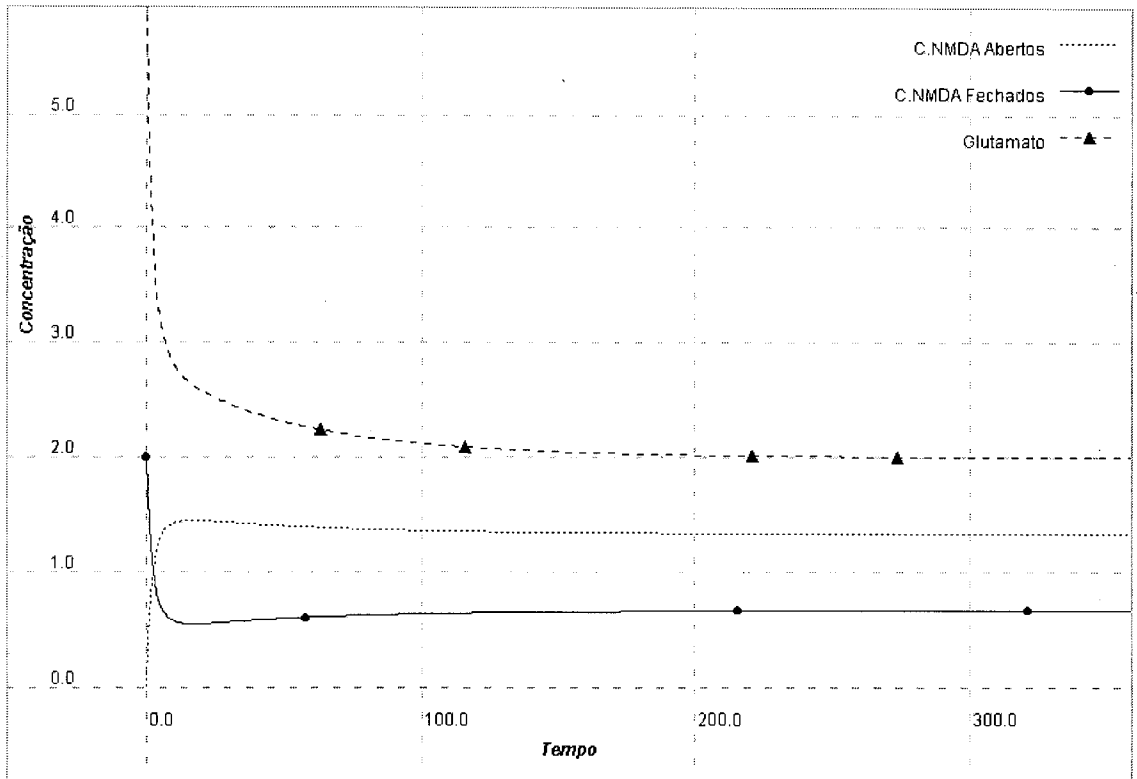


Figura 16: Variação de abertura e fechamento dos canais receptores de glutamato NMDA, onde a unidade de tempo é ms e da concentração mM.

O glutamato abre os canais receptores AMPA. Portanto a concentração de glutamato vai caindo enquanto o número de canais abertos vai aumentando, como ilustrado na Figura 17.

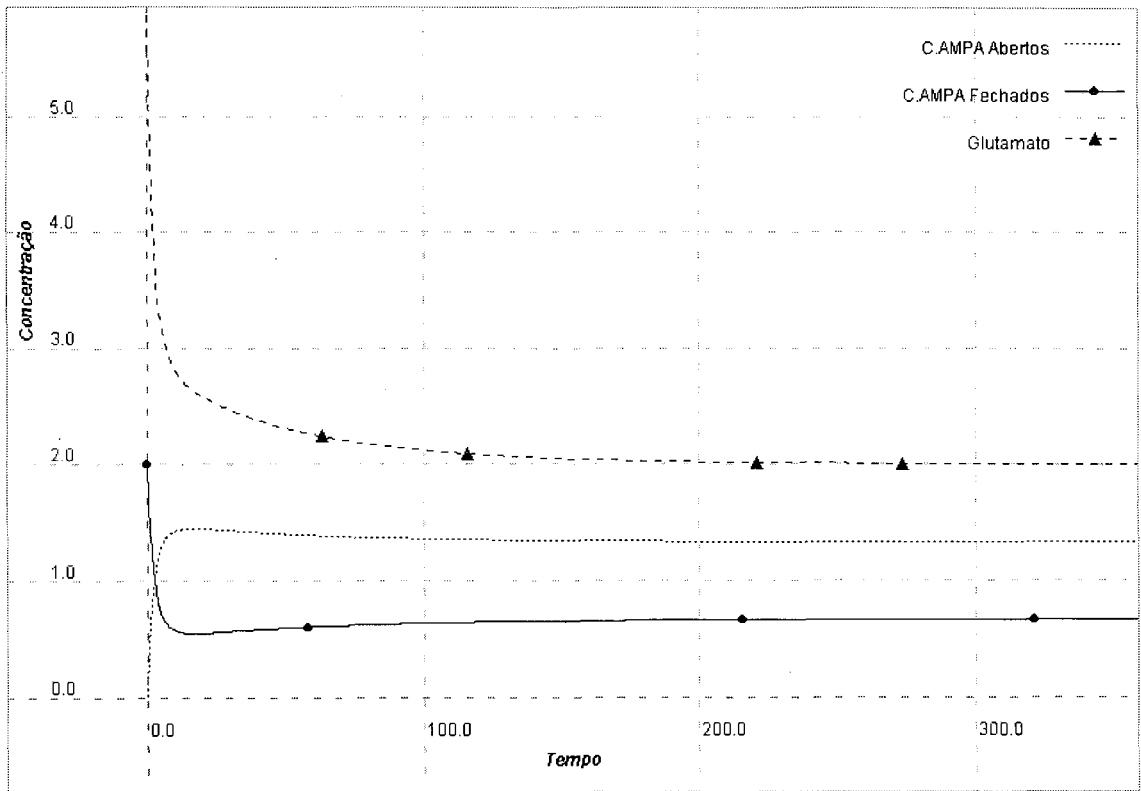


Figura 17: Variação de abertura e fechamento dos canais receptores de glutamato AMPA, onde a unidade de tempo é ms e da concentração mM.

A despolarização da célula leva a abertura nos canais de cálcio dependentes de voltagem onde terá um influxo de íons de cálcio, causando uma corrente eletroquímica, mostrada na Figura 18.

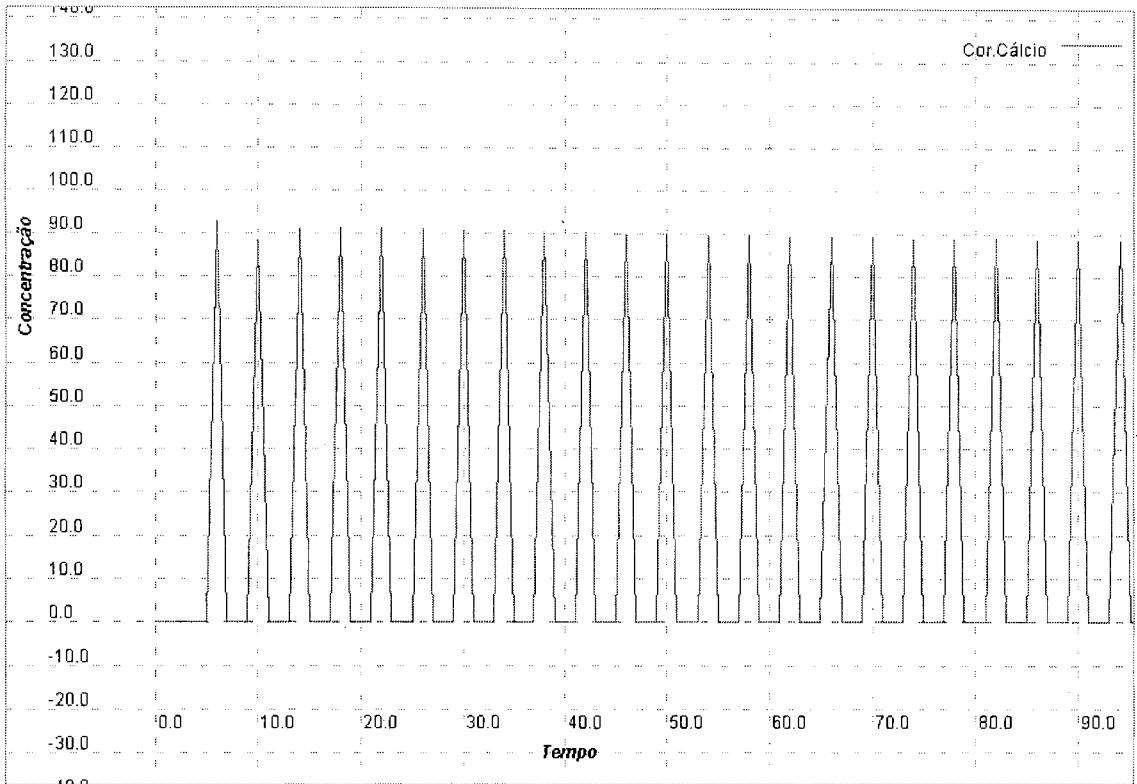


Figura 18: Corrente causada pelo influxo de íons de cálcio, onde a unidade de tempo é ms.

Com a entrada dos íons de cálcio e outros íons, o potencial da membrana despolariza até um certo limiar. A ativação de receptores inibitório faz com que o potencial da membrana hiperpolariza mostrando um comportamento descrito na Figura 19.

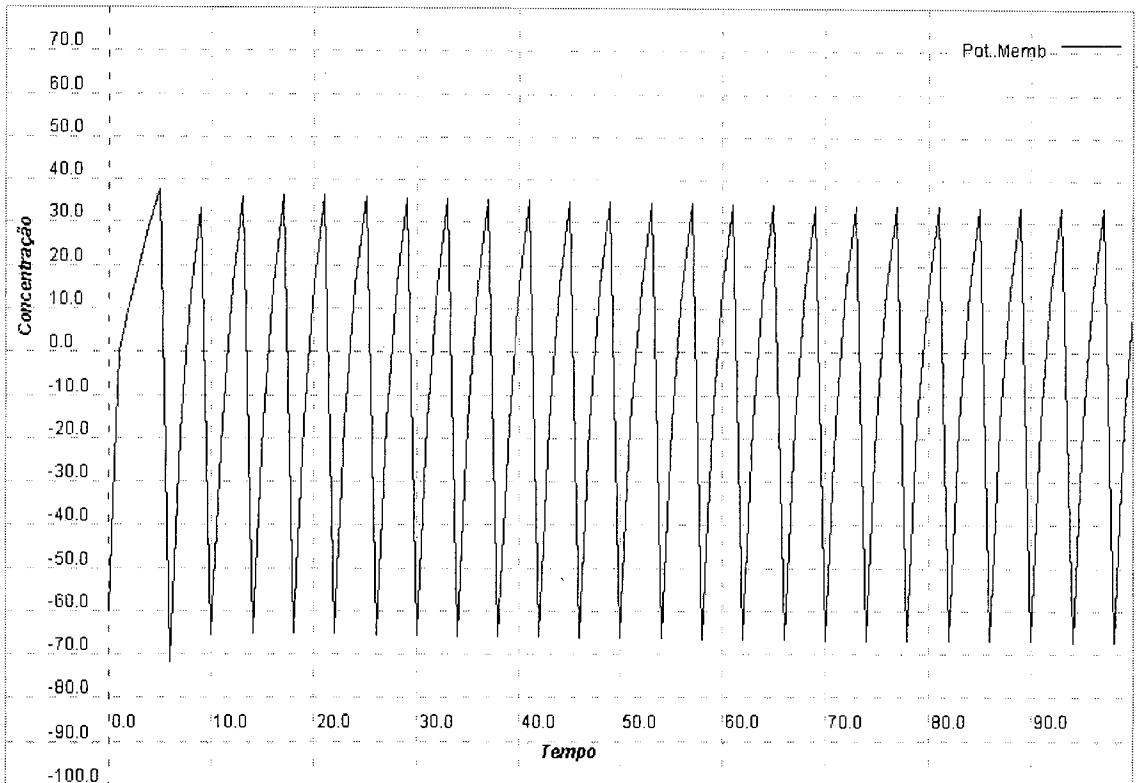


Figura 19: Potencial da membrana, onde a unidade de tempo é ms.

A mudança no potencial da membrana pode provocar uma resposta do neurônio a fim de restabelecer o equilíbrio eletroquímico da célula. Essa resposta foi representada pelo gráfico na Figura 20

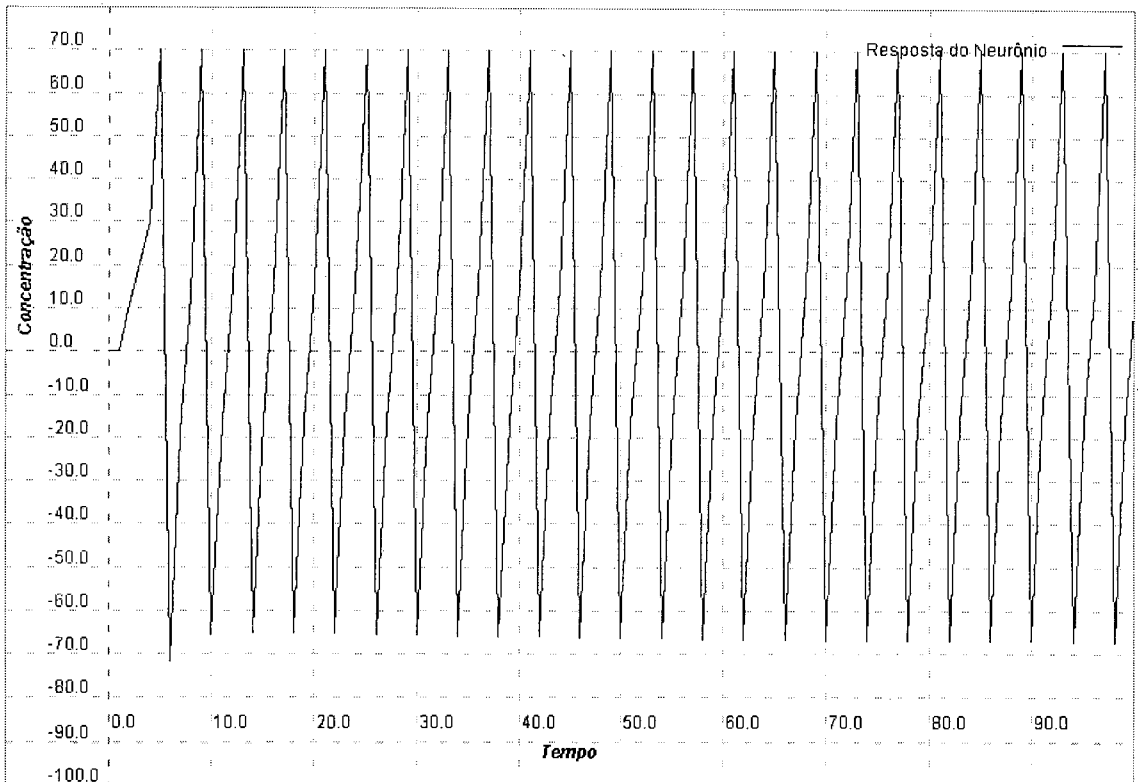


Figura 20: Resposta do neurônio, onde a unidade de tempo é ms.

A liberação de glutamato ativa os receptores ionotrópicos, que se abrem para a entrada de Ca^{2+} , isso causa um influxo de cálcio, quando a concentração de cálcio intracelular alcança ao limiar, as mitocôndrias e o retículo endoplasmático entram em ação ajudando a armazenar cálcio da célula. Porém a mitocôndria e o retículo endoplasmático liberam o cálcio armazenado através de processo diferentes. Além disso, temos as bombas de cálcio transportando cálcio para fora da célula. O acúmulo de cálcio na célula, mitocôndria e no retículo endoplasmático pode ser ilustrado na Figura 21.

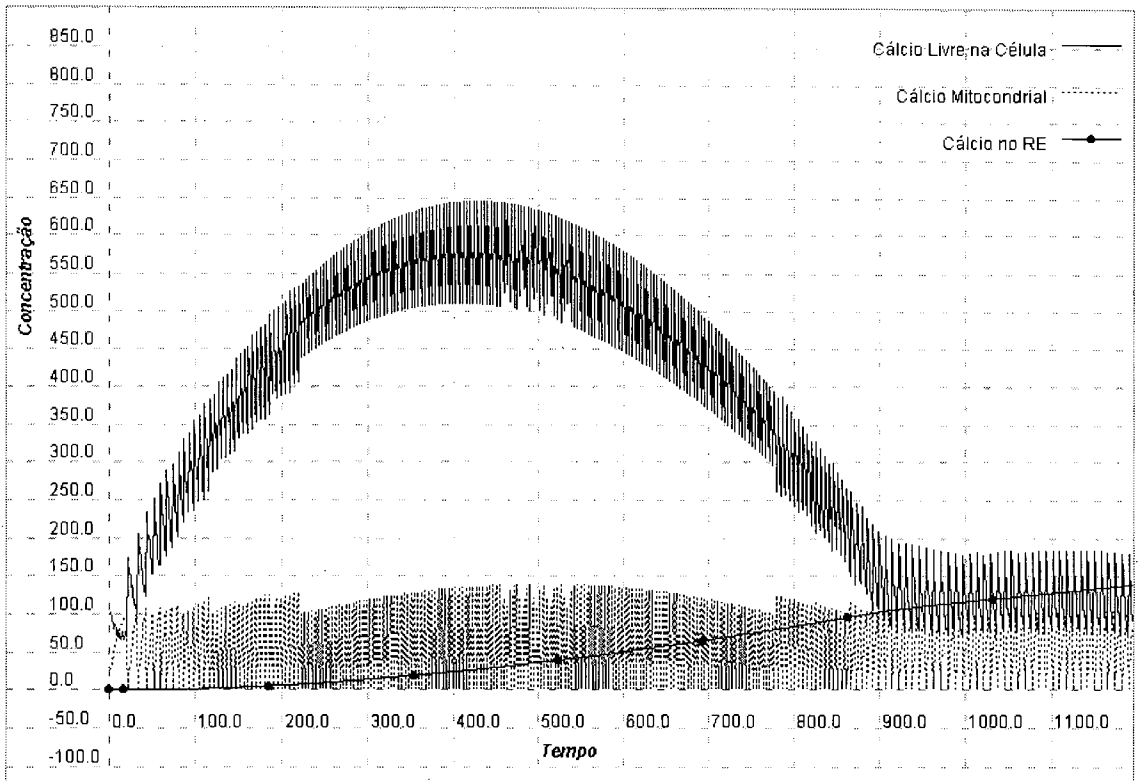


Figura 21: Variação da concentração de cálcio na célula, mitocondria e retículo endoplasmático, onde a unidade de tempo é ms.

O acúmulo de cálcio no meio intracelular faz com que proteínas dependentes de cálcio se agreguem a ele, desencadeando vários processos biológicos dependentes destas proteínas, como na Figura 22.

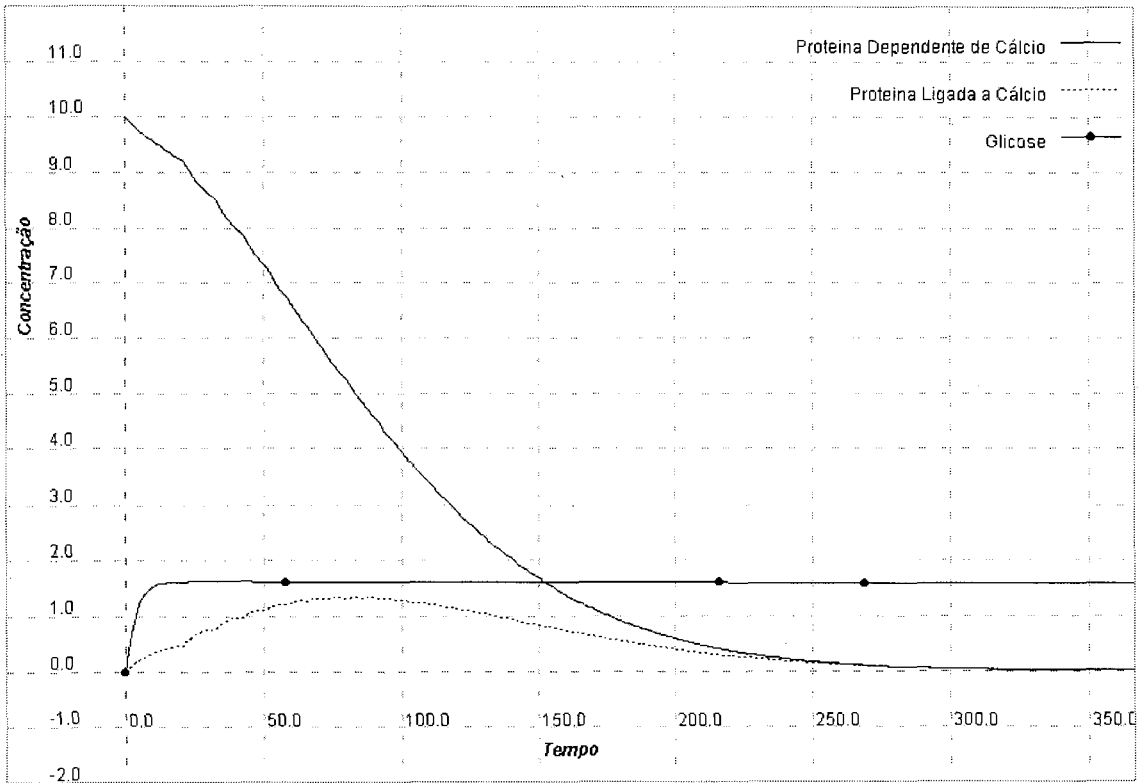


Figura 22: variação da concentração da proteína dependente de cálcio com a proteína já ligada ao íon.

O aumento da produção de radicais livres pode prejudicar o transporte da glicose para dentro da célula. Esse processo pode ser constatado na Figura 23

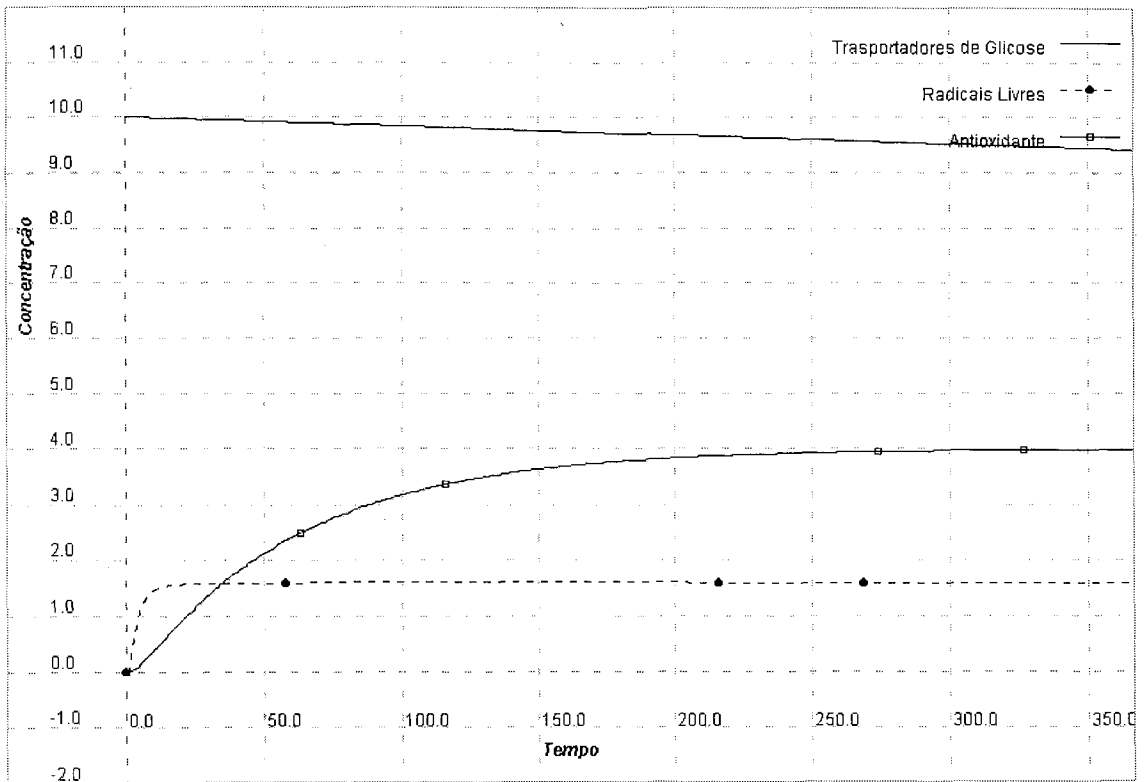


Figura 23: Variação dos transportadores de glicose junto com radicais livres e antioxidantes.

Além dos receptores ionotrópicos o glutamato ativa os receptores metabotrópicos cuja ativação aumenta a concentração de PP_2 , assim ilustrado na Figura 24

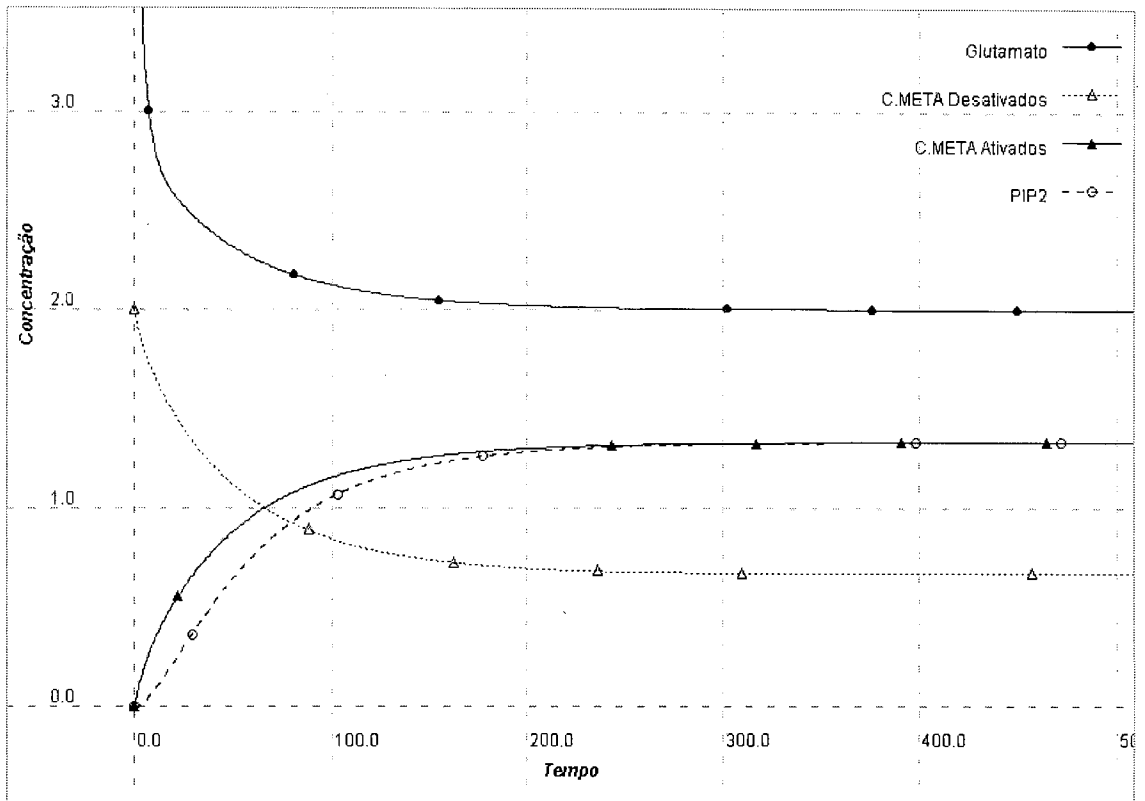


Figura 24: A ativação dos receptores metabotrópicos pelo glutamato

O aumento da concentração de IP₃ e ativação dos receptores de IP₃ do retículo podem ser observado na Figura 25.

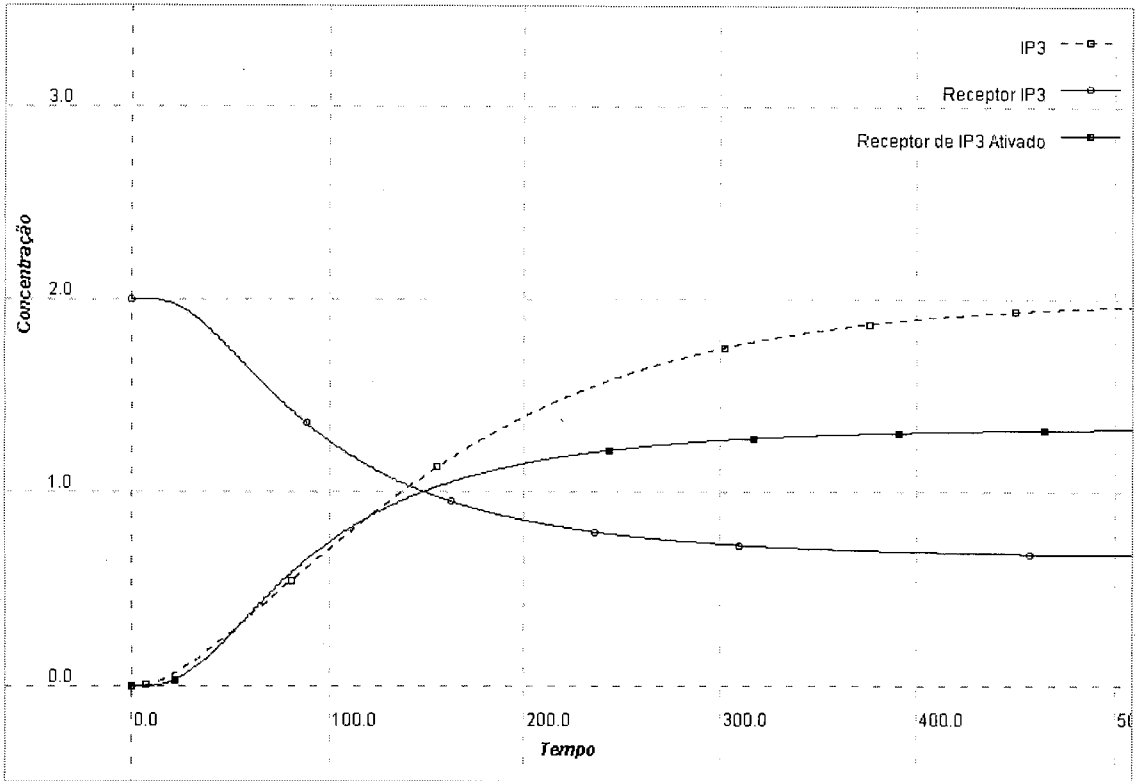


Figura 25:Concentração de IP₃ e ativação dos receptores de IP₃ no reticulo endoplasmático.

A proteína quinase presente no citoplasma deve ser transportada até a membrana plasmática onde será ativada pelo DAG. Esse transporte é feito pela proteína dependente de cálcio. Na Figura.26 podemos ver esse processo através da variação das concentrações.

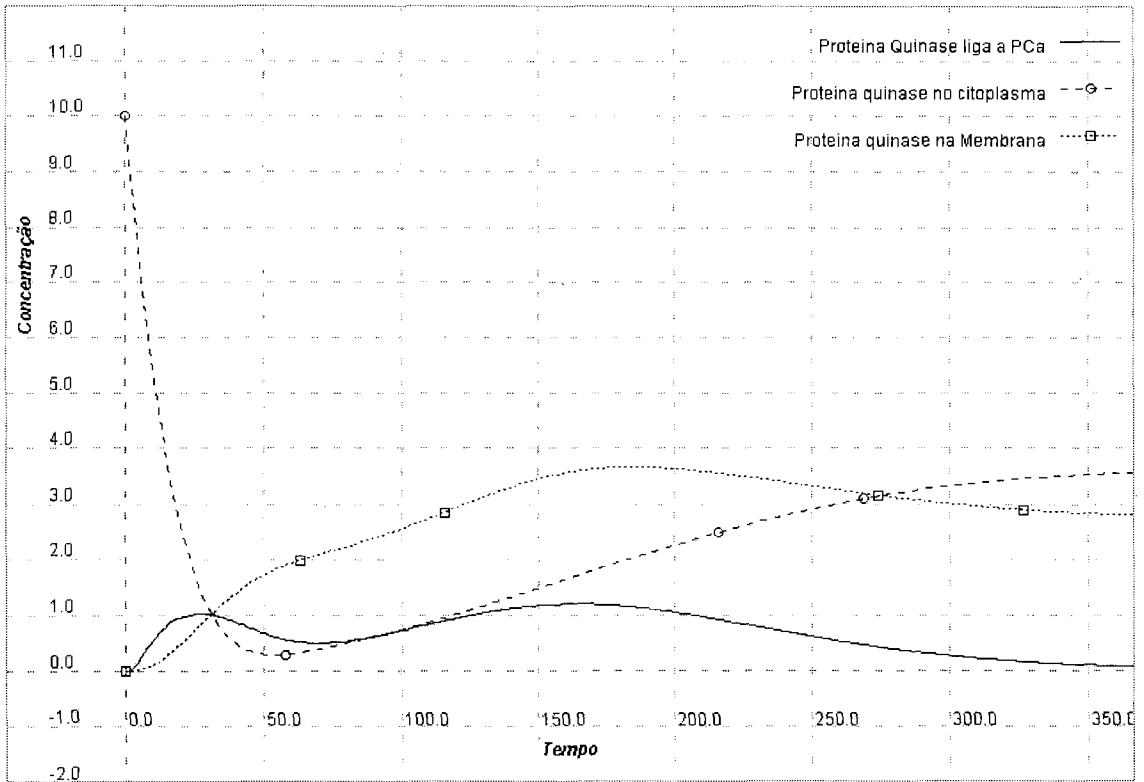


Figura 26: Concentração da proteína quinase ligada a proteína dependente de cálcio e a variação da proteína quinase no citoplasma e na membrana.

A proteína quinase já na membrana, pode ser ativada pelo DAG. Sua ativa na membrana esta representada na Figura 27

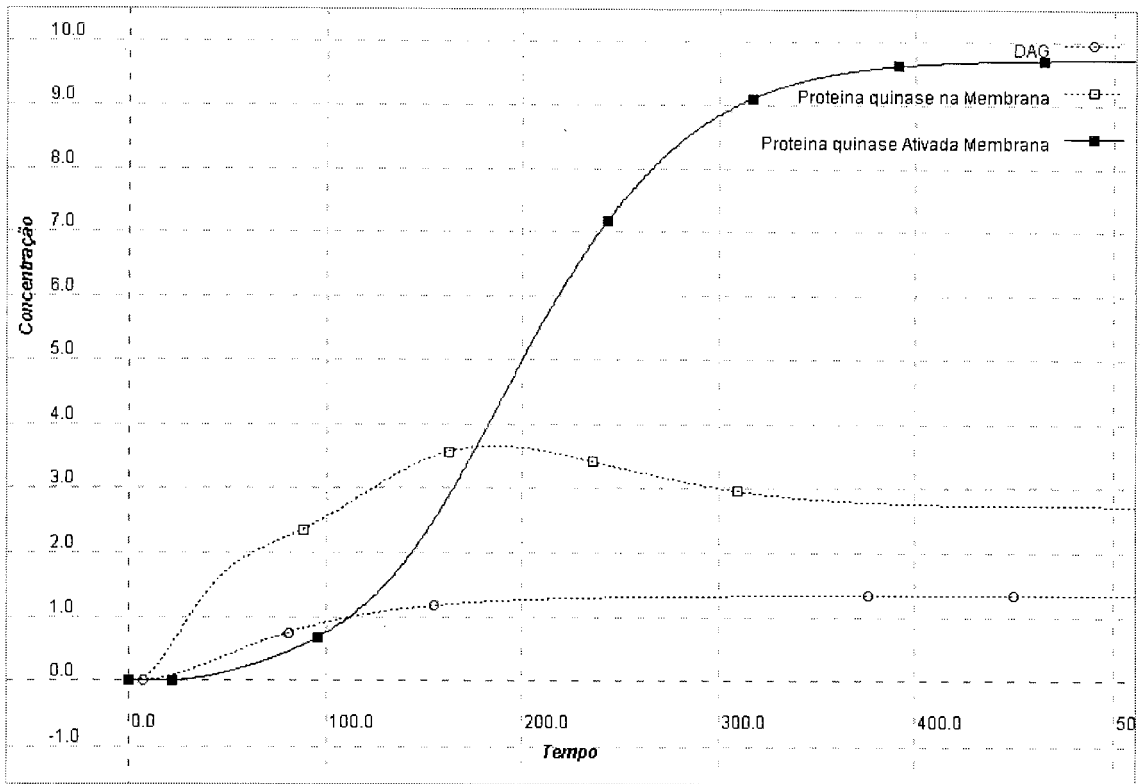


Figura 27: Ativação da proteína quinase presente na membrana

Com a proteína quinase ativada na membrana celular, ela pode causar a fosforilação da tau

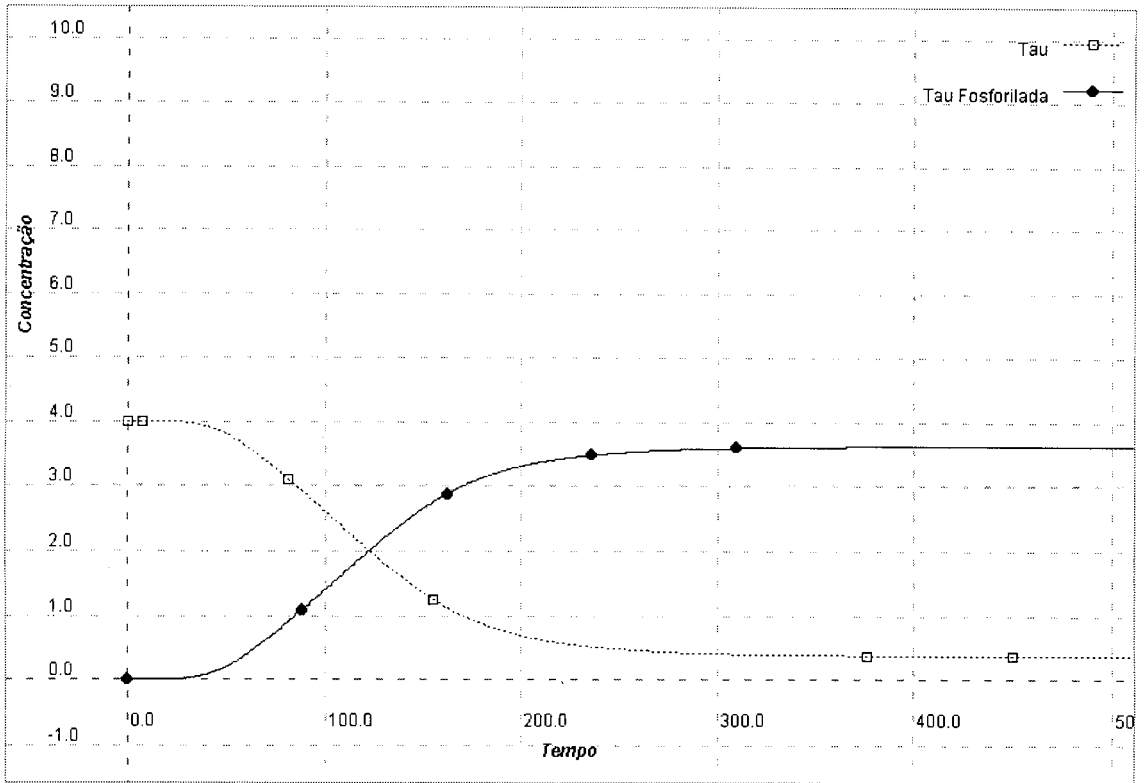


Figura 28: Fosforilação da tau pela proteína quinase ativada na membrana celular.

O aumento de Radicais Livres, concentração de cálcio na mitocôndria e pH mitocondrial, coloca os poros de transição mitocondrial em estado irreversível de alta condutância.

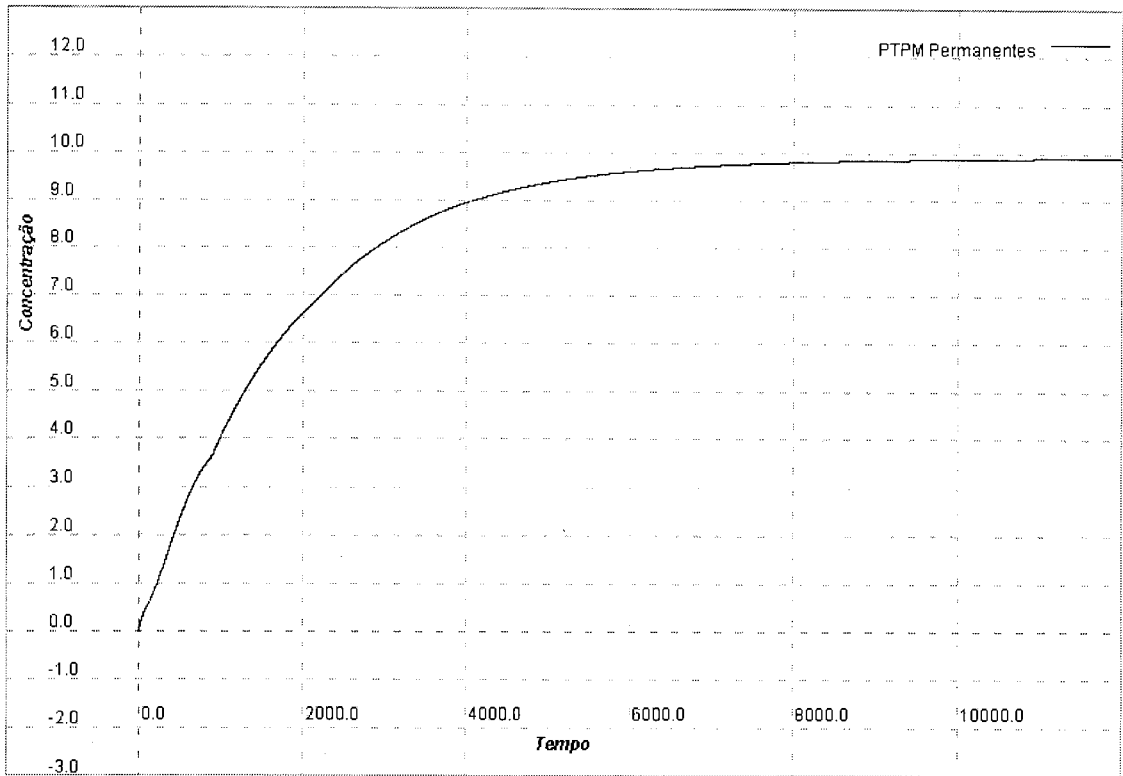


Figura 29: Os poros PTPM abertos de forma irreversível.

7.2. Simulação de uma célula doente

A concentração de glutamato foi aumentada três vezes para simulação da hipótese da excitotoxicidade na célula neuronal, obtendo os gráficos da Figura 29 a Figura 43 como resposta.

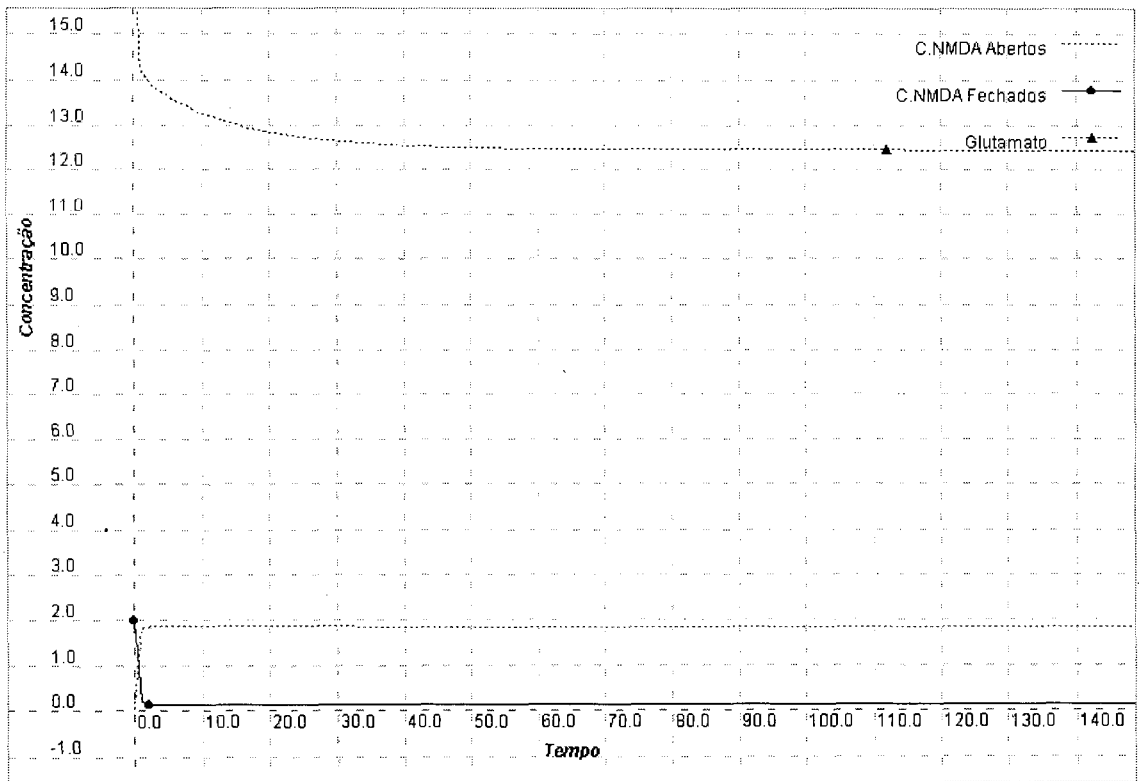


Figura 30: Canais NMDA abertos em função do tempo

Os canais foram abertos mais recentemente.

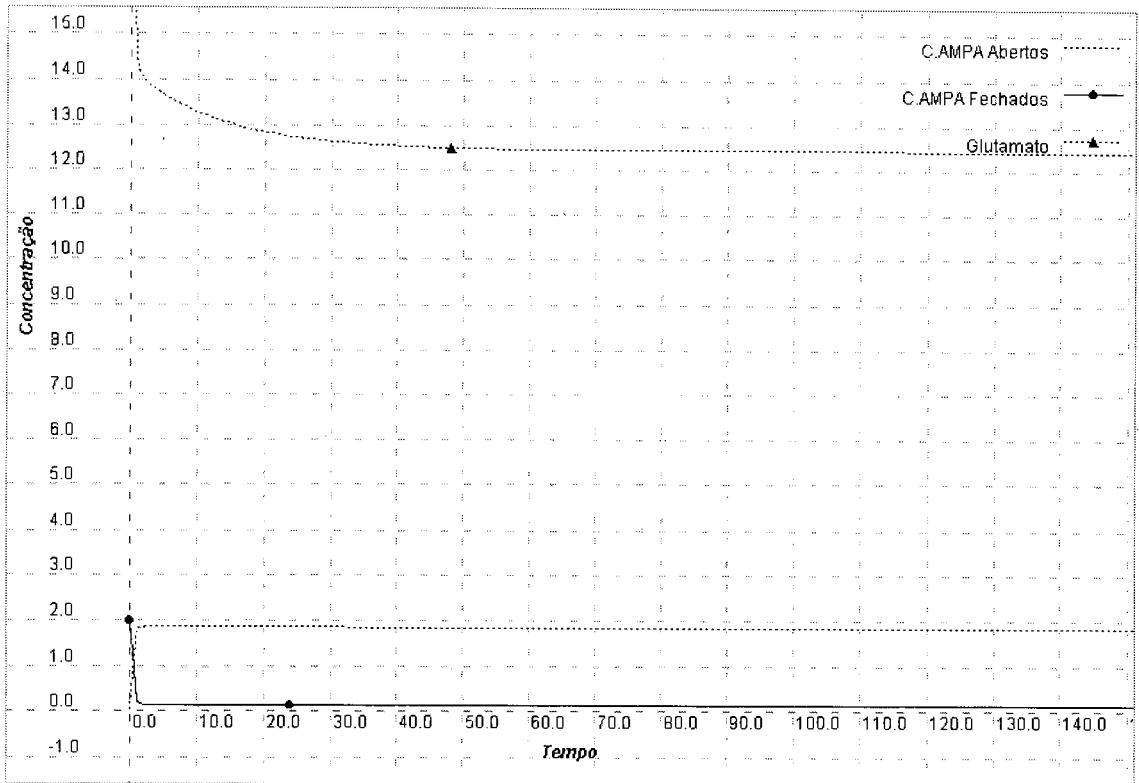


Figura 31: Canais AMPA abertos em função do tempo

Os canais foram abertos mais recentemente

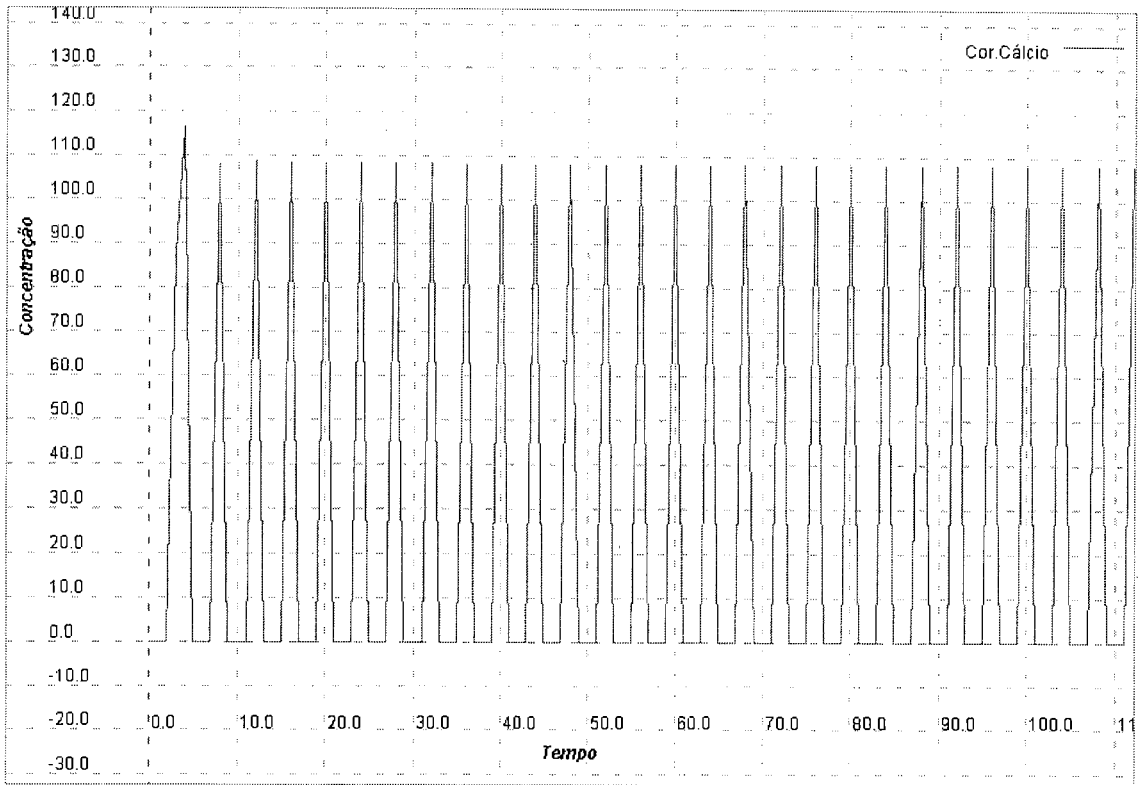


Figura 32: Corrente de cálcio em função do tempo.

Houve um aumento na corrente de cálcio devido ao maior influxo deste íon para o interior na célula.

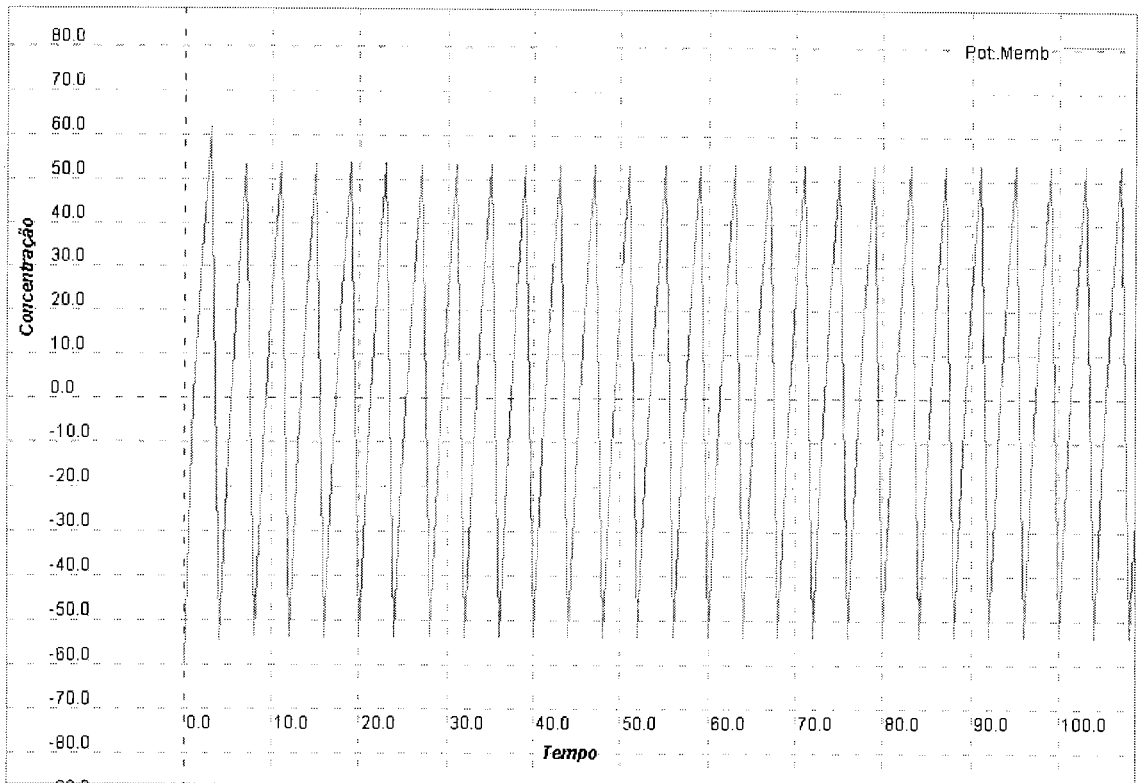


Figura 33: Potencial da membrana em função do tempo

O número de *spikes* no potencial da membrana alteraram muito pouco devido a baixa capacitância nos íons de cálcio.

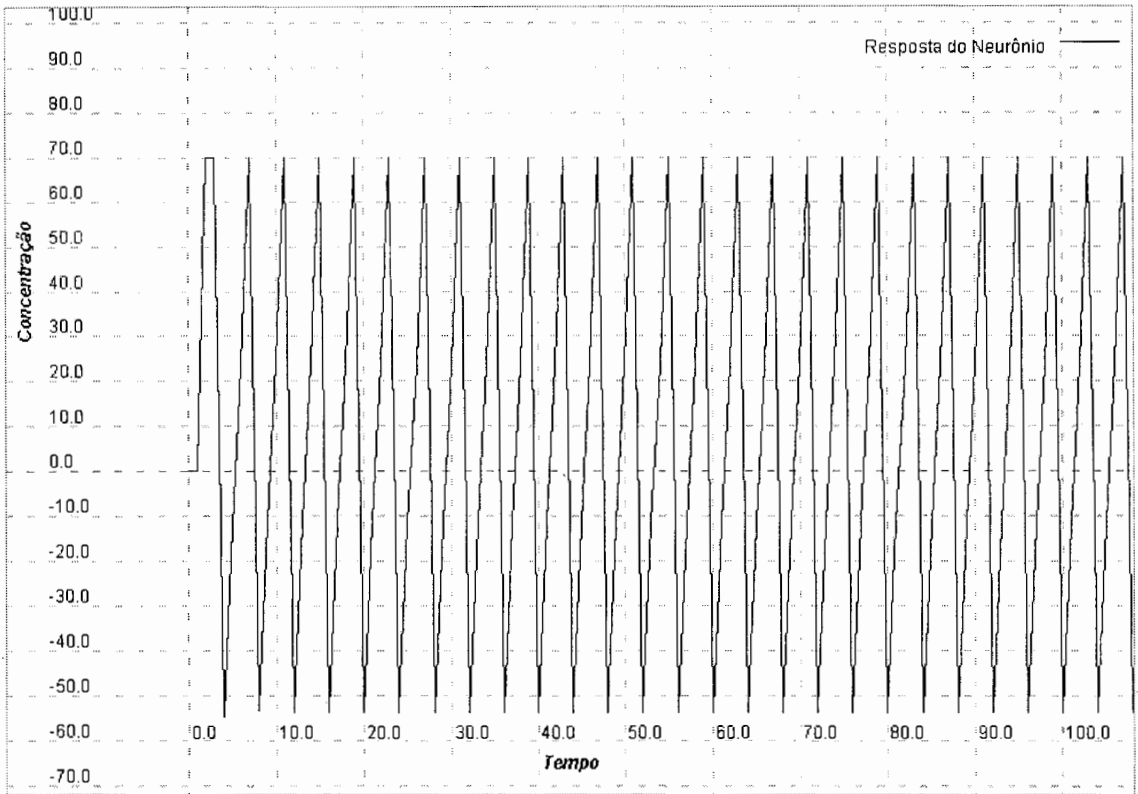


Figura 34: Resposta do neurônio em função do tempo

O número de *spikes* na resposta no neurônio também não alterou muito pelo mesmo motivo do potencial da membrana.

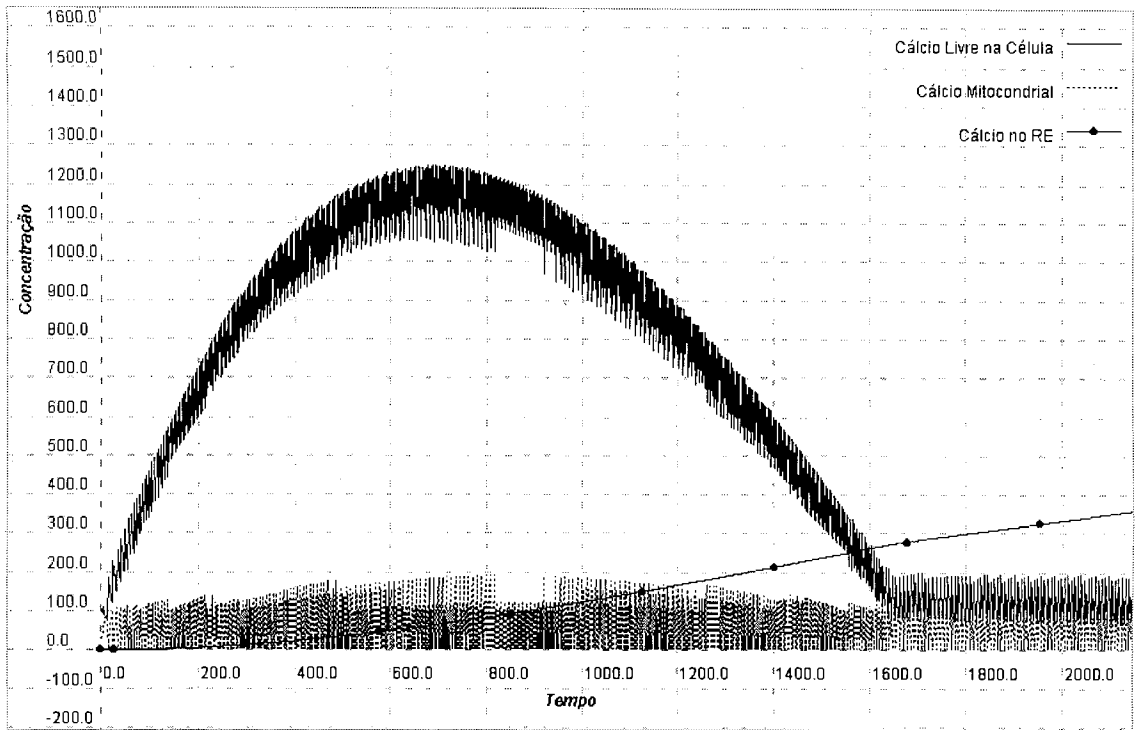


Figura 35: Níveis de cálcio no citoplasma, mitocôndria e retículo endoplasmático em função do tempo

Os níveis de cálcio livres na célula aumentaram consideravelmente, com aumento também do cálcio no retículo endoplasmático.

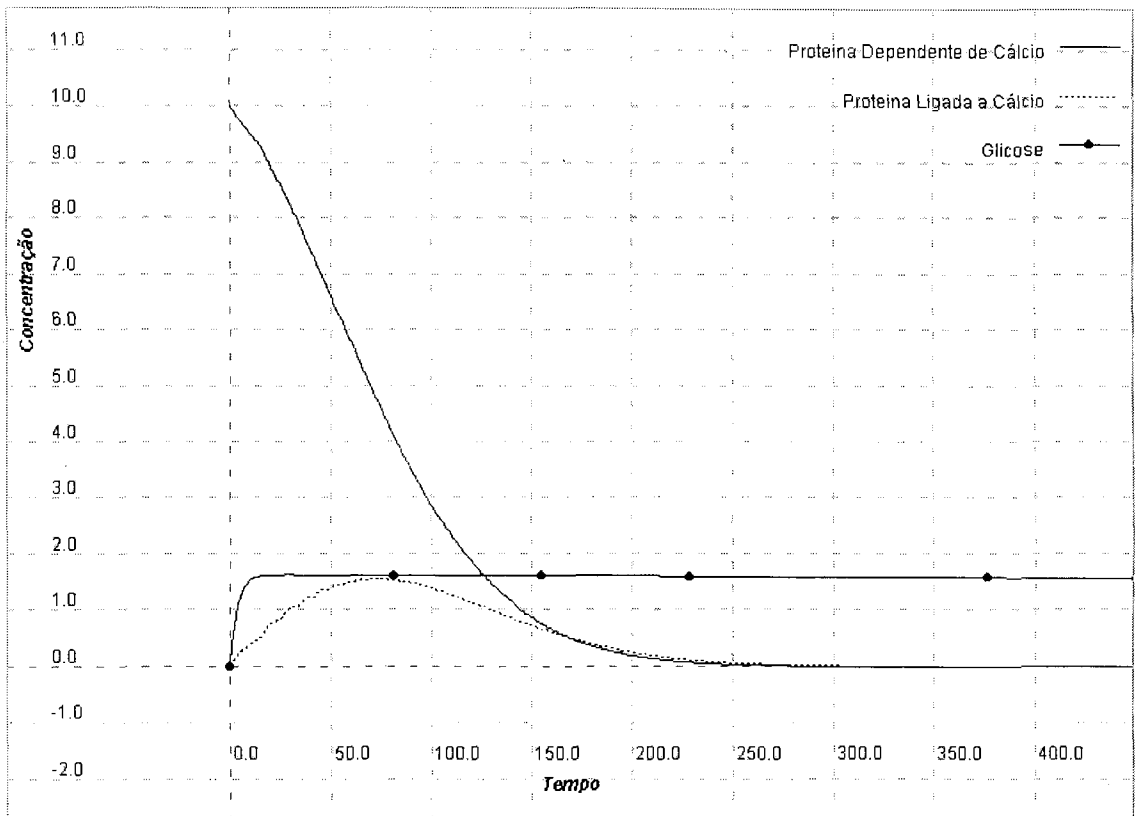


Figura 36: Proteína Dependente de Cálcio, Proteína Ligada a Cálcio e glicose em função do tempo.

Houve um pequeno aumento de proteínas ligadas a cálcio.

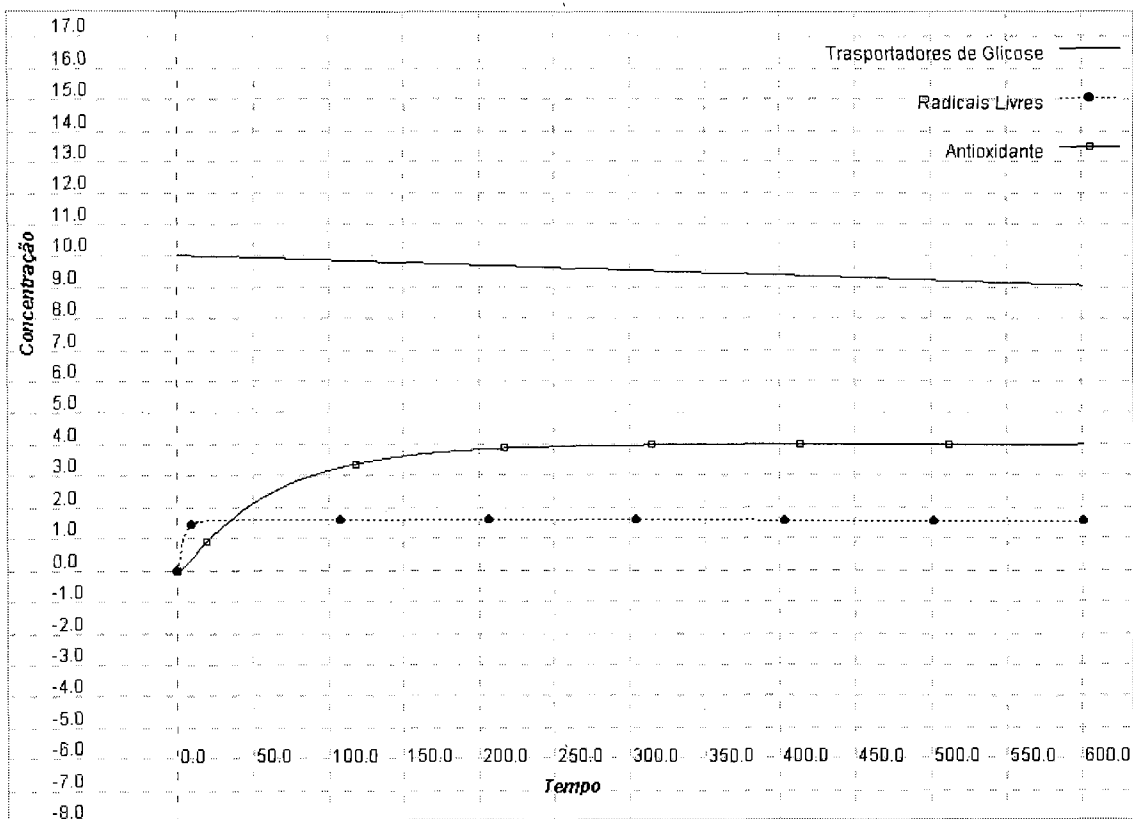


Figura 37: Níveis de transportadores de glicose, Radicais Livres e Antioxidante em, função do tempo.

Não houve grandes diferenças destes gráficos para os que modelam as concentrações normais.

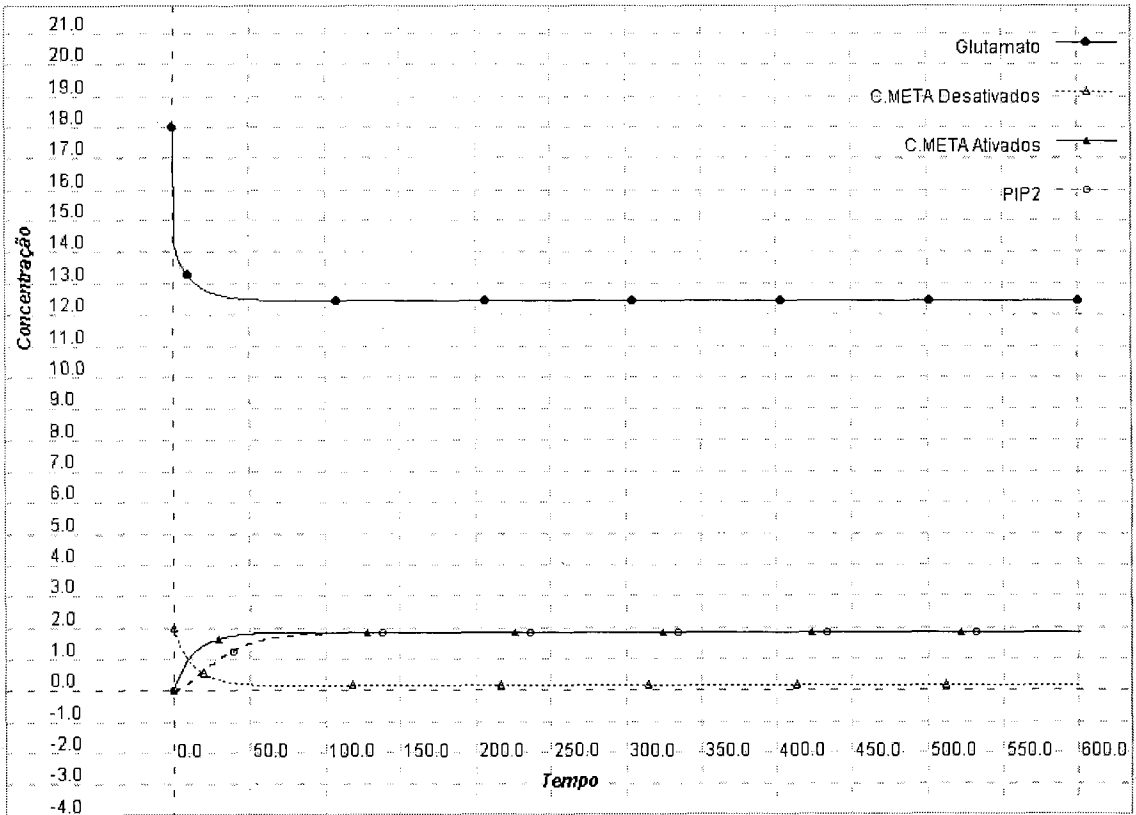


Figura 38: Concentração de glutamato, PIP₂ e números de receptores metabotrópicos em função do tempo.

A ativação dos receptores metabotrópicos aconteceu mais rapidamente.

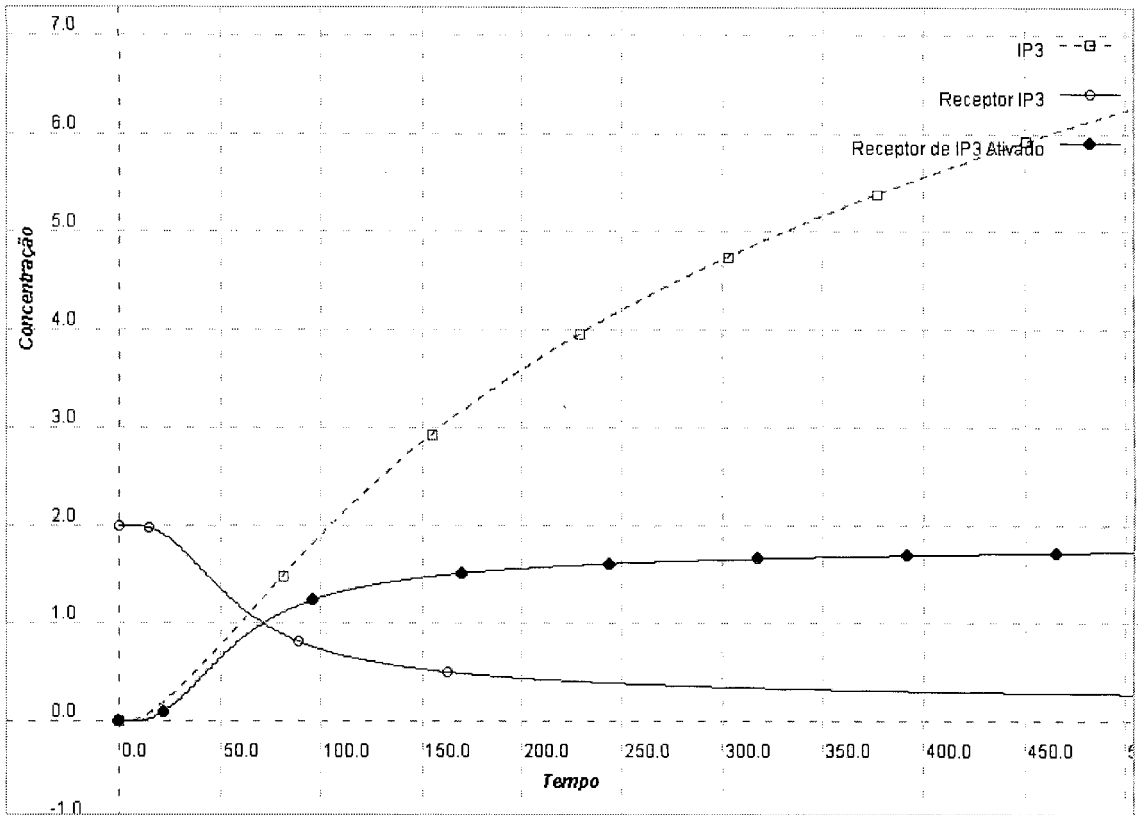


Figura 39: Concentração de IP_3 e número de receptores IP_3 ativados em função do tempo.

Houve um aumento na produção de IP_3 e conseqüentemente um aumento na ativação dos receptores de IP_3 no retículo.

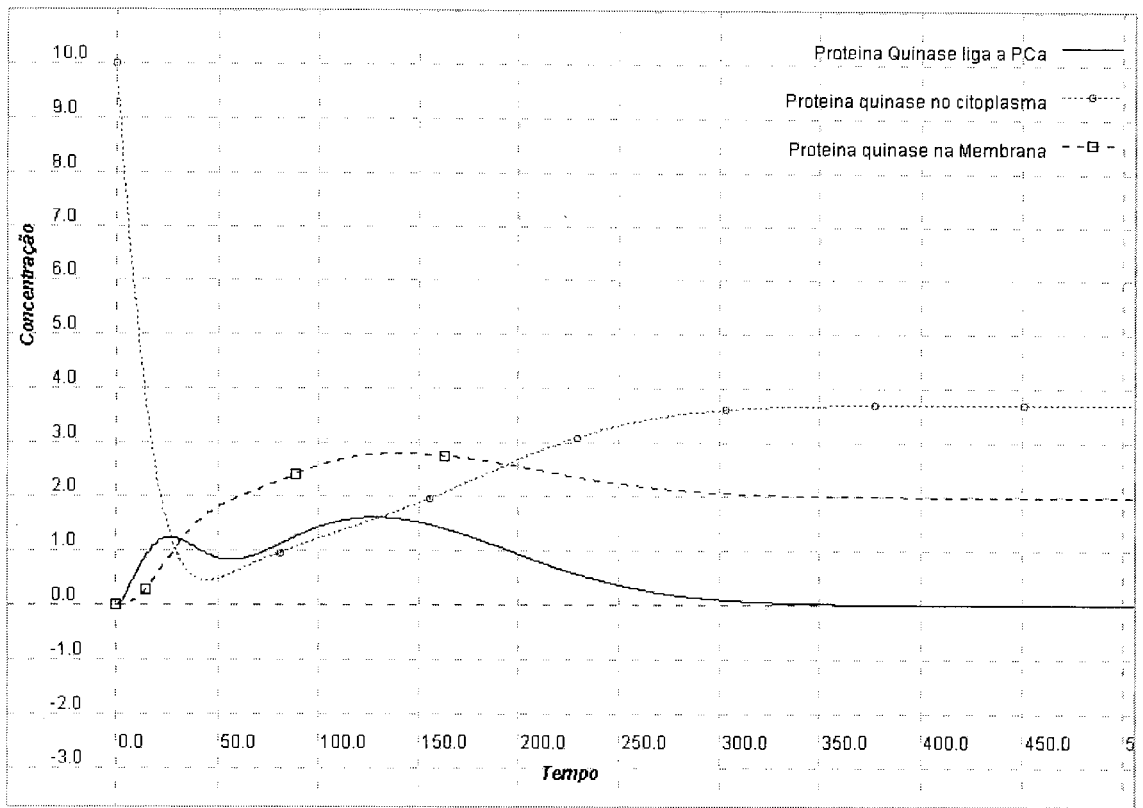


Figura 40: Concentração de proteína quinase no citoplasma e na membrana em função do tempo.

As variações das concentrações das proteínas ocorreram mais cedo.

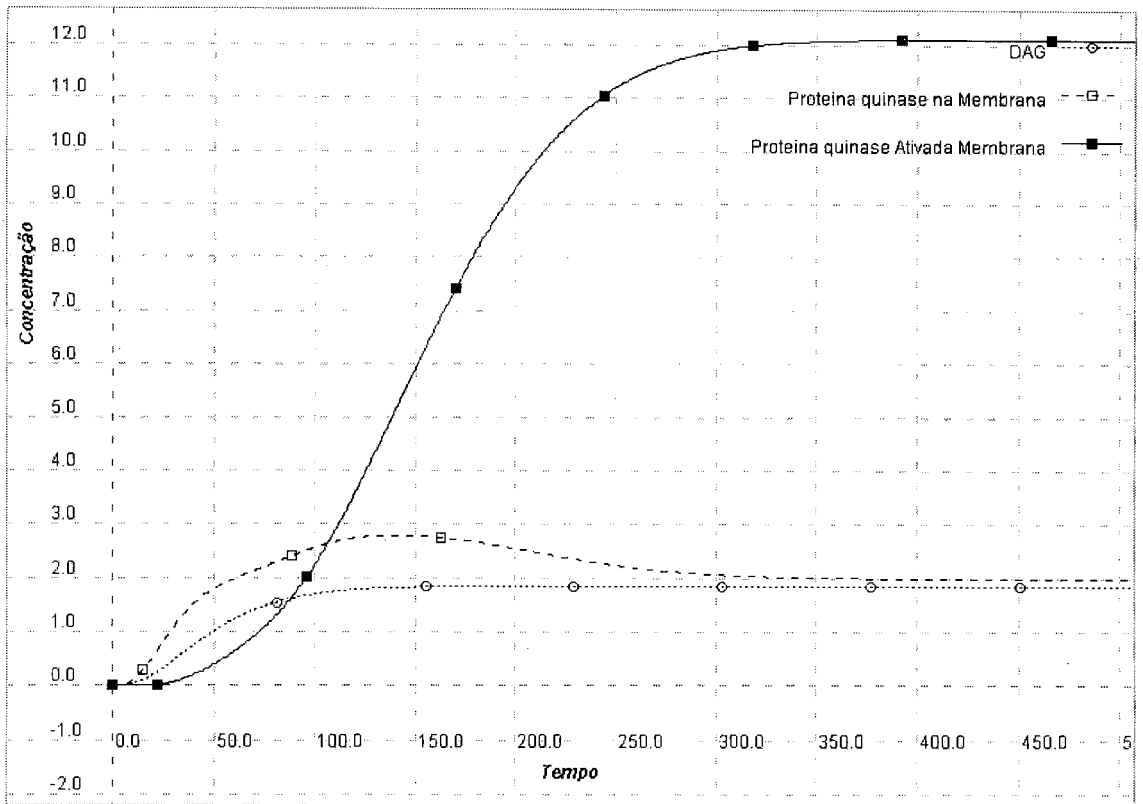


Figura 41: Concentração do DAG e proteína quinase ativada na membrana em função do tempo.

Proteína quinase na membrana aumentou consideravelmente, aumentando assim a probabilidade dela ser ativada e desta forma fosforilar a tau.

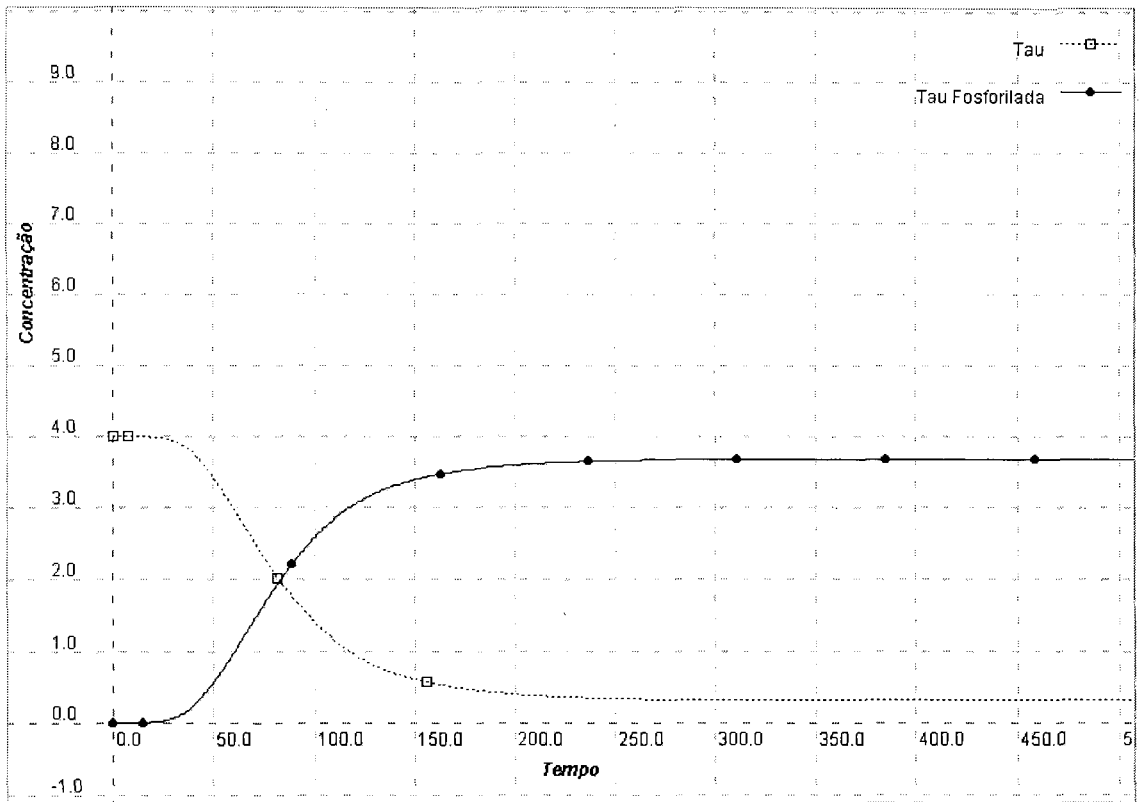


Figura 42: Proteína Tau fosforilada em função do tempo

A tau foi fosforilada com maior rapidez

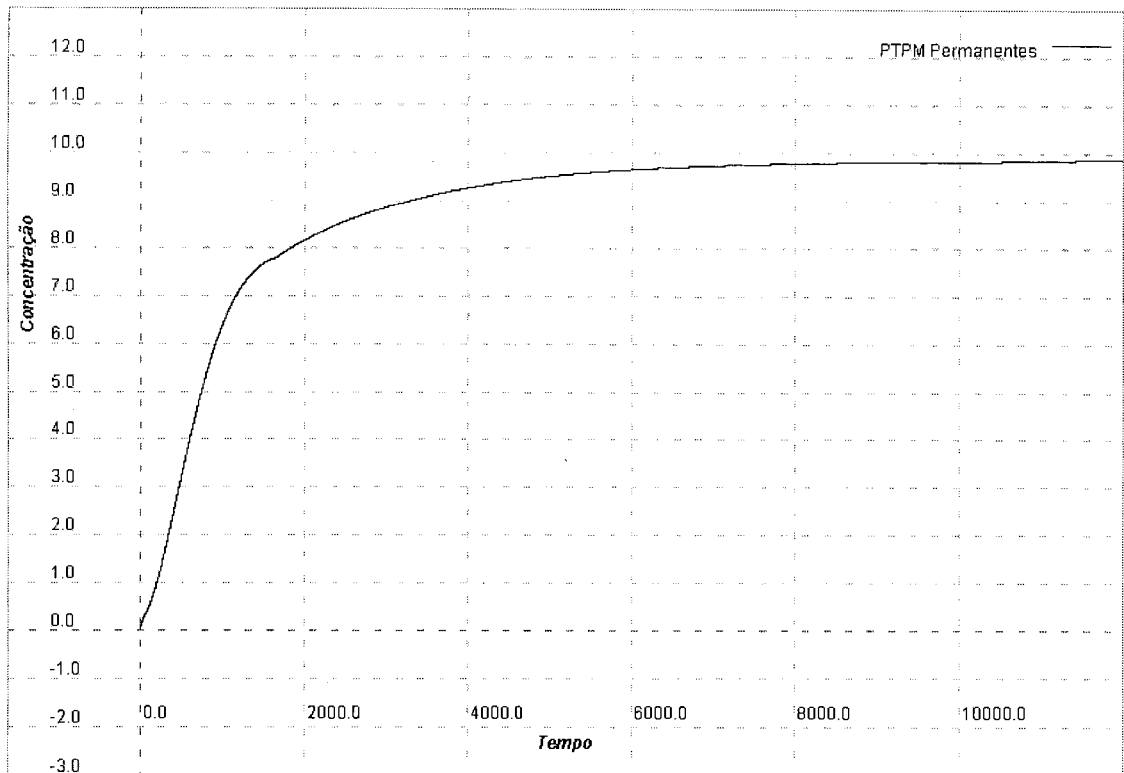


Figura 43: Número de poros abertos em função do tempo

Os poros se abriram de maneira permanente mais cedo.

A concentração de glicose foi diminuída pela metade para simulação da hipótese do envelhecimento da célula neuronal onde se tem uma baixa de glicose no cérebro. Obtendo o gráfico da Figura 44 como resposta.

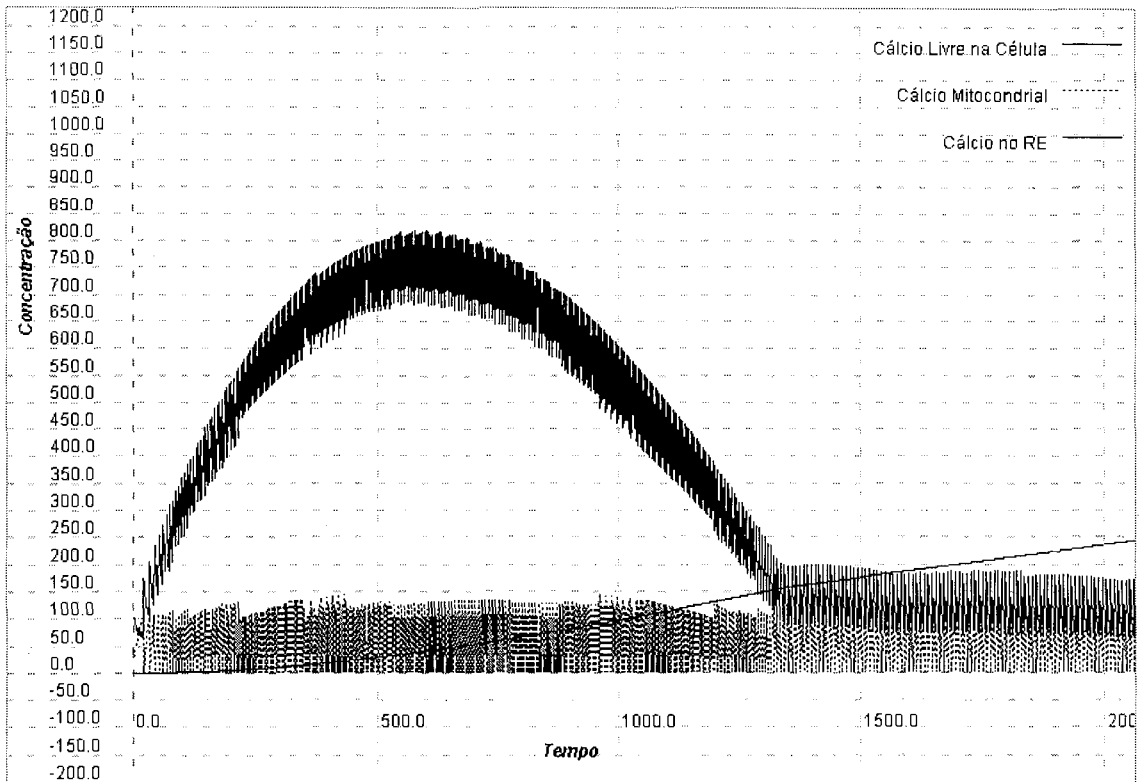


Figura 44: Concentração de cálcio no citoplasma, mitocôndria e retículo endoplasmático em função do tempo.

Houve um aumento considerável na concentração de cálcio livre na célula.

O número de canais de cálcio foi aumentado para simular a hipótese da formação de canais de cálcio pela A β P. Obtendo o gráfico da Figura 45 para análise.

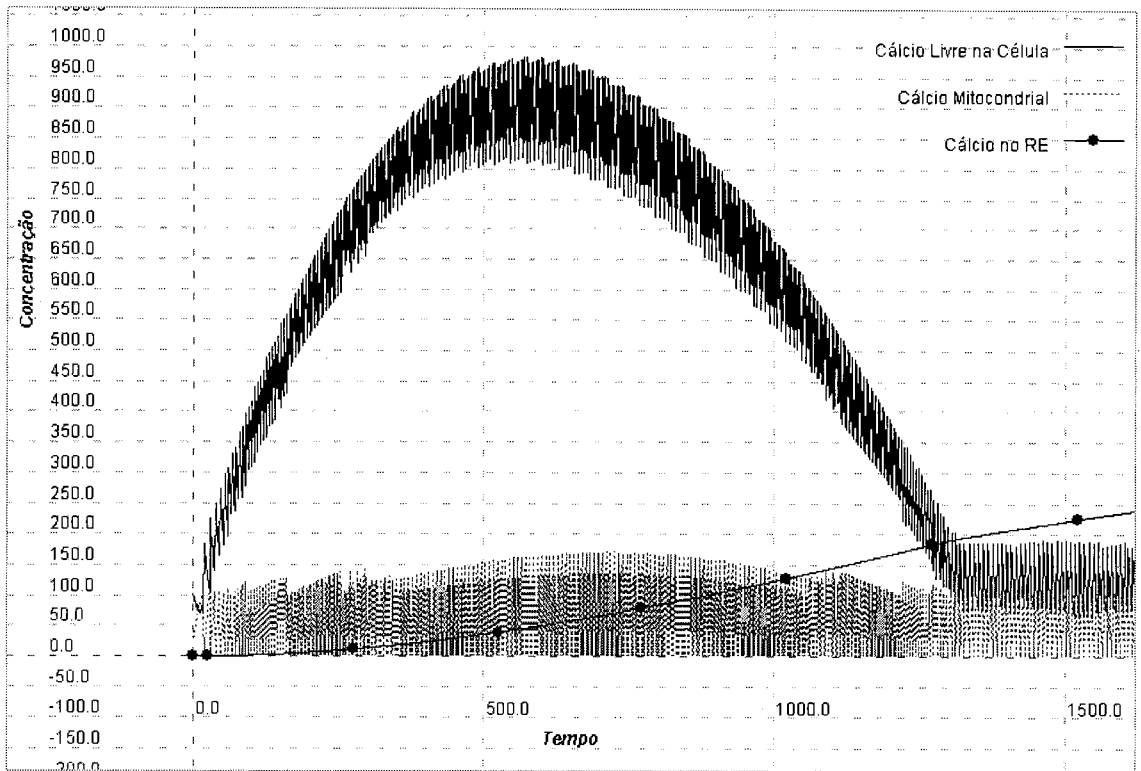


Figura 45: Concentração de cálcio no citoplasma, mitocôndria e retículo endoplasmático em função do tempo.

Aumento na concentração de cálcio, sobrecarga na mitocôndria e aumento da concentração de cálcio no retículo.

Aumento nos Radicais Livres para simular a hipótese da Espécie Reativa de Metabolismo de Oxigênio. Obtendo o gráfico da Figura 46 para análise.

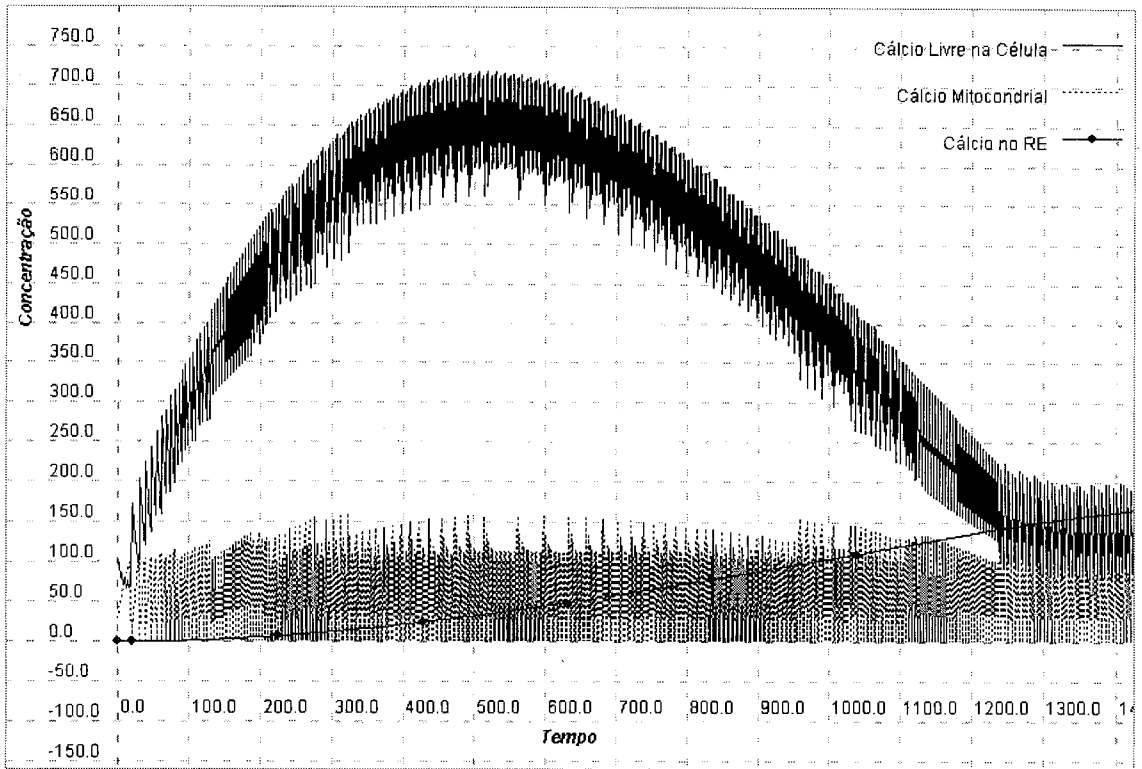


Figura 46: Concentração de cálcio no citoplasma, mitocôndria e retículo endoplasmático em função do tempo.

Um pequeno aumento na concentração de cálcio na célula, mas uma sobrecarga maior da mitocôndria.

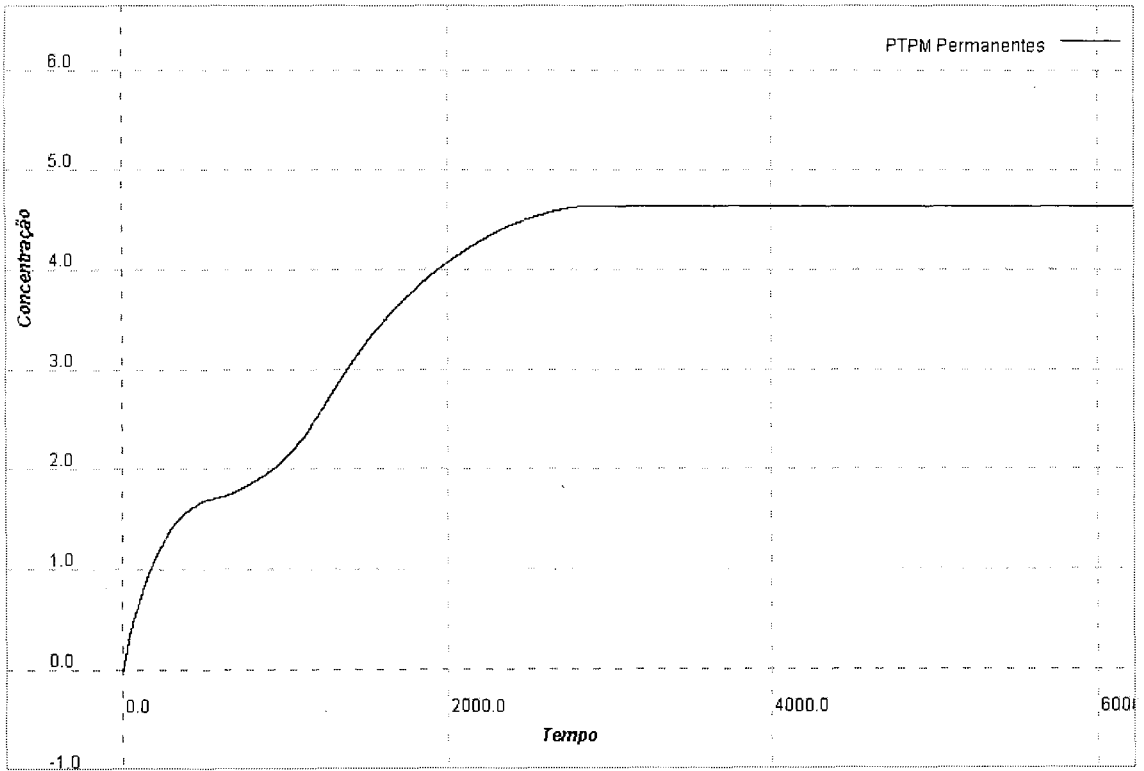


Figura 47: Número de poros abertos em função do tempo

Os poros se tornaram permanentemente abertos, mais rapidamente.

Para simular uma disfunção da mitocôndria, o influxo de íons pela mitocôndria foi prejudicado.

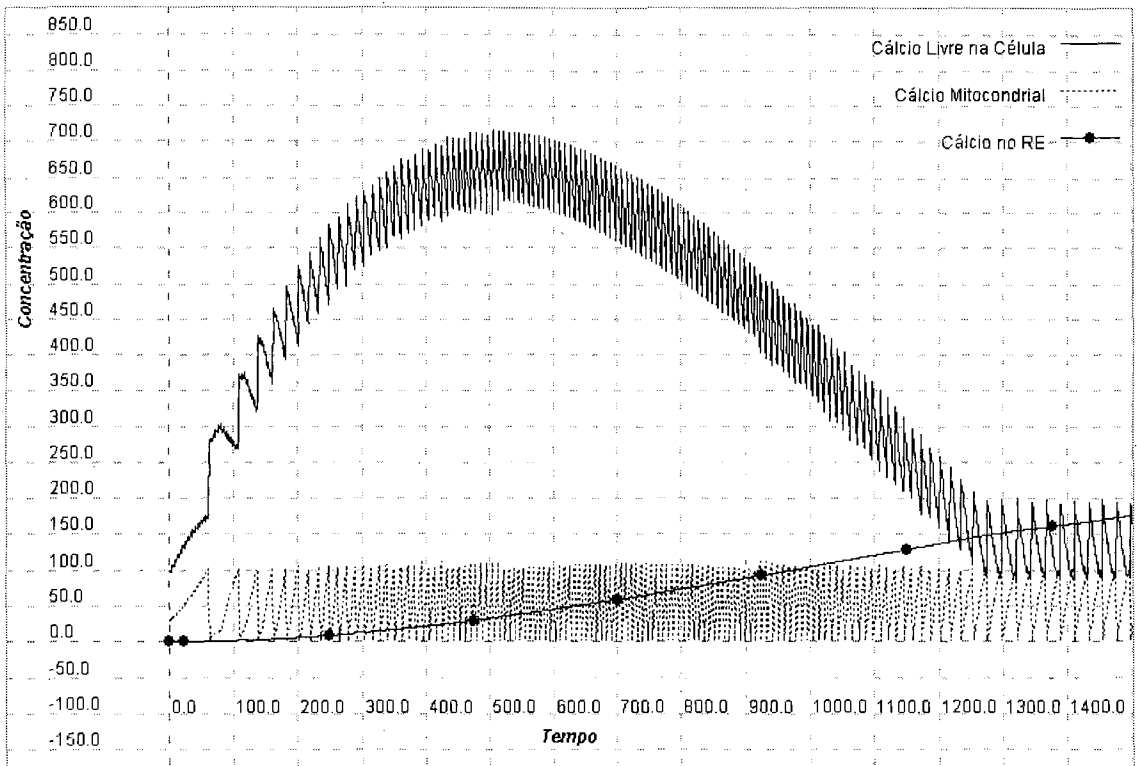


Figura 48: Concentração de cálcio no citoplasma, mitocôndria e retículo endoplasmático em função do tempo.

Houve um pequeno aumento na concentração de cálcio na célula com *spikes* de cálcio mais espaçados.

Para simular uma hipótese das alterações na membrana causada pela proteína quinase.

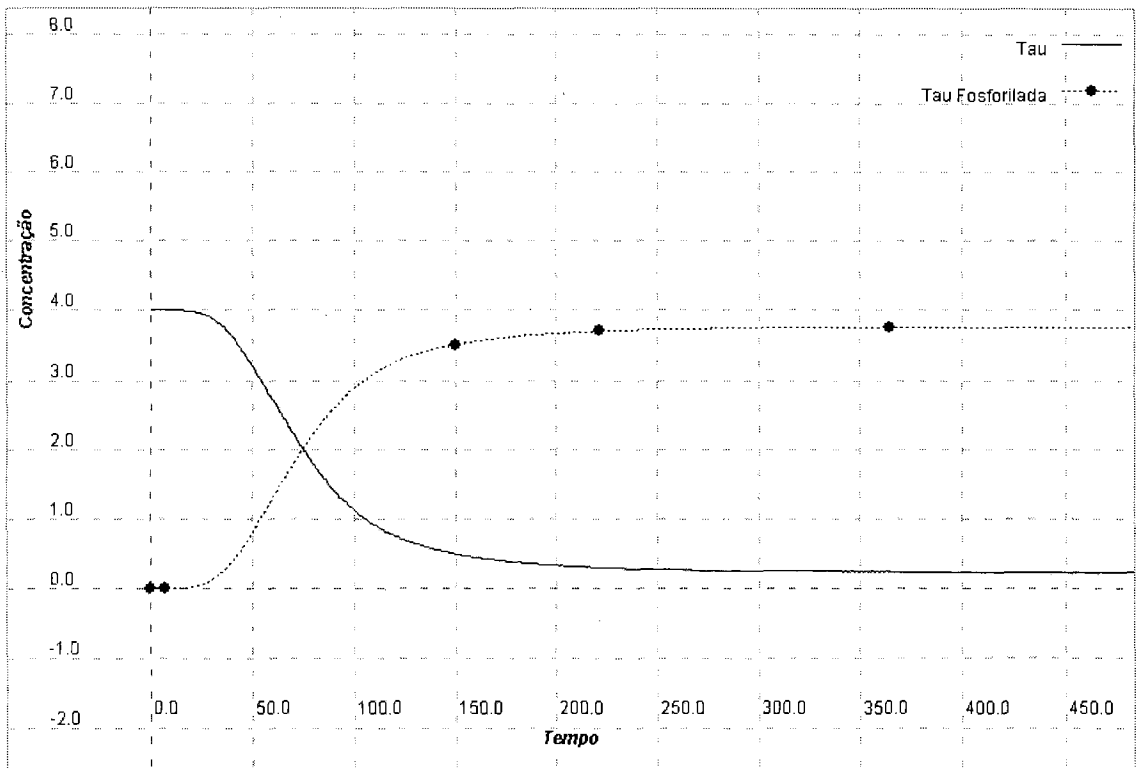


Figura 49: Concentração da proteína Tau fosforilada em função do tempo.

Não houve grandes mudanças na fosforilação da proteína tau.

8. Conclusão

A neurociência computacional procura desenvolver modelos descrevendo como o sistema nervoso ou alguma parte de suas operações se adapta a estímulos. Porém esses modelos se tornam muito complexos devido ao número de variáveis envolvidas em cada processo neurofisiológico. Quando pensamos em descrever o sistema nervoso pensamos não só entender todos os processos bioquímicos e fisiológicos, mas também elucidar processos patológicos a fim de auxiliar ou até mesmo agilizar pesquisas nesta área.

Este trabalho teve como objetivo estudar os processos patológicos da Doença de Alzheimer envolvendo cálcio e modelá-los a fim de reproduzir o comportamento dos mesmos, tendo em vista a dificuldade de pesquisa com células neuronais vivas. Este trabalho se torna pertinente pelo fato de que um sistema computacional pode ser executado para uma variedade de passos.

A contribuição deste trabalho foi de simular o comportamento dos processos neurofisiológico envolvidos com cálcio na Doença de Alzheimer. Conseguimos reproduzir alguns dos comportamentos ligados ao fluxo dos íons através da membrana plasmática. Mostrando que quanto mais glutamato nos sítios sinápticos, principal área afetada na DA, mais cálcio entra na célula configurando assim a excitotoxicidade neuronal. Observamos também o comportamento dos receptores metabotrópicos que liberam IP_3 ativando receptores do retículo endoplasmático para expulsão de cálcio para o citoplasma.

Além do IP_3 o DAG aumentou e conseqüentemente a concentração de proteína quinase ativada na membrana. Acelerando a fosforilação da tau.

Foi verificado que com a diminuição de glicose no neurônio, a concentração de cálcio também aumenta, pois diminui a produção de ATP, dificultando assim o processo de expulsão do cálcio pelas bombas dependentes de ATP.

O aumento de canais de cálcio para representar o dano acusado pela proteína $A\beta$ P. Esse aumento no número de canais de cálcio levou ao acúmulo de mais íons. O incremento de radicais levou a uma ativação precoce de poros permanentes mitocondriais.

Portanto é possível, pelo menos em parte, reproduzir comportamento de alguns processos neuropatológicos ligados ao cálcio. Tendo como dificuldade uma representação quantitativa desses processos devido a escassez de trabalhos sobre a Doença de Alzheimer que trata as concentrações de modo quantitativo.

9. Referências Bibliográficas

- AIRES, M. M., 1991, *Fisiologia*, Guanabara Koogan.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, L., et al, 1997, *Biologia Molecular da Célula*, Artes Médicas.
- ANNUNZIATO, L., PANNACCIONE, A., CATALDI, M., et al, 2002, "Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species: a pathophysiological role in brain aging?", *Neurobiology of aging*, v. 23, pp. 819-834.
- ARISPE, N., DOH, M., 2002, "Plasma membrane cholesterol controls the cytotoxicity of Alzheimer's disease A β P (1-40) and (1-42) peptides", *The FASEB Journal*, v. 16, pp. 1526-1536.
- ARISPE, N., POLLARD, H. B., ROJAS, E., 1994, "The Ability of Amyloid β -Protein [A β P(1-40)] to Form Ca²⁺ Channels Provides a Mechanism for Neuronal Death in Alzheimer's Disease", *Annals New York Academy of Sciences*, v. 747, pp. 256-266.
- ARISPE, N., POLLARD, H. B., ROJAS, E., 1996, "Zn²⁺ interaction with Alzheimer amyloid β protein calcium channels", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, v. 93, pp. 1710-1715.
- ARISPE, N., ROJAS, E., POLLARD, H. B., 1993a, "Alzheimer disease amyloid β -protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethaminic an aluminum", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, v. 90, pp. 567-571.
- ARISPE, N., ROJAS, E., POLLARD, H. B., 1993b, "Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid β -protein [A β P-(1-40)] in bilayer membranes", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, v. 90, pp. 10573-10577.
- BEAL, M. F., 1992, "Role of excitotoxicity in human neurological disease", *Current Opinion in Neurobiology*, v. 2, pp. 657-662.
- BEAL, M. F., 1998, "Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1366, pp. 211-223.
- BUTTERFIELD, D. A., DRAKE, J., POCERMICH, C., et al, 2001, "Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide", *Trends in Molecular Medicine*, v. 7, n. 12, pp. 548-554.
- CARVALHO, L. A. V., 1994, "Modeling the thalamocortical loop", *International Journal of Bio-Medical Computing*, v. 35, pp. 267-296.

- CARVALHO, L. A. V., ROITMAN, V. L., 1995, "A computational model for the neurobiological substrates of visual attention", *International Journal of Bio-Medical Computing*, v. 38, pp. 33-45.
- CHOI, D. W., 1994, "Calcium and Excitotoxic Neuronal Injury", *Annals New York Academy of Sciences*, v. 747, pp. 162-171.
- CHRISTIE, B. R., ELIOT, L. S., ITO, K.-I., et al, 1995, "Different Ca²⁺ Channels in Soma and Dendrites of Hippocampal Pyramidal Neurons Mediate Spike-Induced Ca²⁺ Influx", *Journal of Neurophysiology*, v. 73, n. 6, pp. 2553-2557.
- COOPER, G. M., 2000, *The Cell a Molecular Approach*. 2, Sinauer Associates.
- COYLE, J. T., PUTTFARKEN, P., 1993, "Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders", *Science*, v. 262, pp. 689-695.
- CROMPTON, M., 2000, "Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death", *Journal of Physiology*, v. 529, pp. 11-21.
- DANBOLT, N. C., 2001, "Glutamate uptake", *Progress in Neurobiology*, v. 65, pp. 1-105.
- DESTEXHE, A., MAINEN, Z. F., SEJNOWSKI, T. J., 1998, "Kinetic Models of Synaptic Transmission". In Koch, C and Sergev, I, *Methods in Neuronal Modeling*, 2^a ed., chapter 1, London.
- DODD, P. R., SCOTT, H. L., WESTPHALEN, R. I., 1994, "Excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of dementia", *Neurochem.*, v. 25, n. 3, pp. 203-219.
- DUGAN, L. L., SENSI, S. L., CANZONIERO, L. M. T., et al, 1995, "Mitochondrial production of reactive oxygen in cortical neurons following exposure to NMDA", *Journal of Neuroscience*, v. 15, pp. 6377-6388.
- EDWARDS, F. A., KONNERTH, A., SAKMANN, B., 1990, "Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: A patch-clamp study", *Journal of Physiology*, v. 430, pp. 213-249.
- ENOKI, R., KIUCHI, T., KOIZUMI, A., et al, 2004, "NMDA receptor-mediated depolarizing after-potentials in the basal dendrites of CA1 pyramidal neurons", *Neuroscience Research*, v. 48, pp. 325-333.
- ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J., ZOLLNER, H., 1991, "Chemistry and biochemistry of 4-hidroxy-nonenal, malonaldehyde and related aldehydes", *Free Radical Biology & Medicine*, v. 11, pp. 81-128.
- ETCHEBERRIGARAY, R., GIBSON, G. E., ALKON, D. L., 1994, "Molecular Mechanisms of Memory and Pathophysiology of Alzheimer's Disease", *Annals New York Academy of Sciences*, v. 747, pp. 245-255.
- FURUKAWA, K., MATTSON, M. P., 1995, "Taxol stabilizes [Ca]_i and protects hippocampal neurons against excitotoxicity", *Brain Research*, v. 689, pp. 141-146.

- GANONG, W. F., 1993, *Review of Medical Physiology*. 16, Prentice-Hall International Inc. USA.
- GREENAMYRE, J. T., YOUNG, A. B., 1989, "Excitatory Amino Acids and Alzheimer's Disease", *Neurobiology of aging*, v. 10, pp. 593-602.
- HANSSON, M. T., PERSSON, T., FRIBERG, H., et al, 2003, "Powerful Cyclosporin Inhibition of Calcium-induced Permeability Transmition in Brain Mitochondria", *Brain Research*, v. 960, pp. 99-111.
- HOTTA, C. T., 2003, "Para quê tanto cálcio fora dos ossos?", *Ciência Hoje*, v. 33, n. 194, pp. 70-72.
- HUANG, H. M., MARTINS, R., GANDY, S., et al, 1994, "Use of cultured fibroblasts in elucidating the pathophysiology and diagnosis of Alzheimer's disease", *Annals New York Academy of Sciences*, v. 747, pp. 225-244.
- HUANG, H. M., ZHANG, H., XU, H., et al, 2003, "Inhibition of the α -ketoglutarate dehydrogenase Complex alters Mitochondrial Function and Cellular Calcium Regulation", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1637, pp. 119-126.
- IENTILE, D., CACCAMO, D., MACAIONE, V., et al., 2002, "NMDA-Evoked excitotoxicity increases tissue transglutaminase in cerebellar granule cells".
- IWASAKI, S., MOMIYAMA, A., UCHITEL, O. D., et al, 2000, "Developmental Changes in Calcium Channel Types Mediating Central Synaptic Transmission", *The Journal of Neuroscience*, v. 20, n. 1; pp. 59-65.
- JAHN, C. E., STEVENS, C. F., 1990a, "A quantitative description of NMDA receptor-channel kinetic behavior", *Journal of Neuroscience*, v. 10, pp. 1830-1837.
- JAHN, C. E., STEVENS, C. F., 1990b, "Voltage dependence of NMDA-activated macroscopic conductances predicted by single-channel kinetics", *Journal of Neuroscience*, v. 10, pp. 3178-3182.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSELL, T. M., 1997, *Fundamentos da Neurociência e do Comportamento*, Editora Prentice-Hall do Brasil LTDA.
- KATZUNG, B. G., 2003, *Farmacologia Básica e Clínica*. 8ª, Guanabara Koogan.
- KOCH, C., 1999, *Biophysics of Computation*, Oxford University Press.
- KOCH, C., SEGEV, I., 1998, "Kinetic Models of Synaptic Transmission", *Methods in Neuronal Modeling*, 2 ed., chapter 1, MIT Press, Cambridge.
- KRIEGER, C., DUCHEN, M. R., 2002, "Mitochondria, Ca^{2+} and Neurodegenerative Disease", *European Journal of Pharmacology*, v. 447, pp. 177-188.
- LEE, V. M.-Y., GOEDERT, M., TROJANOWSKI, J. Q., 2001, "Neurodegenerative tauopathies", *Annu Rev Neurosci*, v. 24, pp. 1121-1159.

- LIN, H., BHATIA, R., LAL, R., 2001, "Amyloid protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology", *The FASEB Journal*, v. 15, pp. 2433-2444.
- LIPTON, S. A., ROSENBERG, P. A., 1994, "Mechanisms of Disease: Excitatory Amino Acids As A Final Common Pathway For Neurologic Disorders", *The New England Journal of Medicine*, v. 330, n. 9, pp. 613-622.
- LOPES, M. A., BOTTINO, C. M. C., 2002, "Prevalência de demência em diversas regiões do mundo - Análise dos estudos epidemiológicos de 1994 a 2000", *Arq. Neuro-Psiquiatria*, v. 60.
- MACCIONI, R. M., RODRIGUES, P., 1995, "O Mal de Alzheimer, O Ataque de Proteínas às Células do Cérebro", *Ciência Hoje*, v. 20, n. 115, pp. 34-38.
- MARKESBERY, W. R., 1997, "Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease", *Free Radical Biology & Medicine*, v. 23, n. 1, pp. 134-147.
- MATTSON, M. P., 1994, "Calcium and Neuronal Injury in Alzheimer's Disease. Contributions of β -Amyloid Precursor Protein Mismetabolism, Free Radicals, and Metabolic Compromise", *Annals New York Academy of Sciences*, v. 747, pp. 50-76.
- MATTSON, M. P., 1997, "Central Role of Oxyradicals in the Mechanism of Amyloid β -Peptide Cytotoxicity", *Alzheimer's Disease Review*, v. 2, pp. 1-14.
- MATTSON, M. P., CHENG, B., DAVIS, D., et al, 1992, " β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity", *Journal of Neuroscience*, v. 12, pp. 379-389.
- MCCORMICK, D. A., 1992, "Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity", *Prog. Neurobiology*, v. 39, pp. 337-388.
- MILLER, R. J., 1998, "Mitochondria - The Kraken Wakes!", *Research News*, v. 21, n. 3, pp. 95-97.
- MIRNADA, S., OPAZO, C., LARRONDO, L. F., et al, 2000, "The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid β -peptide in Alzheimer's disease", *Progress in Neurobiology*, v. 62, pp. 633-648.
- NICHOLLS, D. G., WARD, M. W., 2000, "Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts", *Trends Neuroscience*, v. 23, pp. 166-174.
- PAPPOLLA, M. A., SMITH, M. A., THOMAS, T. B., et al, 2002, "Cholesterol, oxidative stress, and Alzheimer's Disease: expanding the horizons of pathogenesis", *Elsevier*, v. 33, n. 2, pp. 173-181.
- PATTON, H. D., FUCHS, A. F., HILLE, B., et al, 1989a, *Text Book of Physiology: Excitable Cells and Neurophysiology*. 21, W. B. Saunders Company.

- PATTON, H. D., FUCHS, A. F., HILLE, B., et al, 1989b, *Text Book of Physiology: Excitable Cells and Neurophysiology*. 21, W. B. Saunders Company.
- PELLETIER, M. R., WADIA, J. S., MILLS, L. R., et al, 1999, "Seizure Cell Death Produced by Repeated Tetanic Stimulation In Vitro: Possible Role of Endoplasmic Reticulum Calcium Stores", *The American Physiological Society*, v. 99, pp. 3054-3064.
- R. IENTILE, D. CACCAMO, V. MACAIONE, et al., 2002, "NMDA-Evoked excitotoxicity increases tissue transglutaminase in cerebellar granule cells".
- RAMOS, L. R., VERAS, R. P., KALACHE, A., 1987, "Envelhecimento populacional: uma realidade brasileira", *Rev Saúde*, v. 21, pp. 211-224.
- RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., et al, 2004, *Farmacologia*. 5, Elsevier.
- REIS, A. E., 2005, *Um modelo matemático computacional do estresse oxidativo na doença de Alzheimer*, PESC/COPPE/UFRJ.
- RITCHIE, K., KILDEA, D., 1995, "Is senile dementia "age-related" or "ageing-related"? - evidence from meta-analysis of dementia prevalence in the oldest old.", *Lancet*, v. 346, pp. 931-934.
- SELKOE, D. J., 1993, "Physiological production of the β -amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease", *Trends Neuroscience*, v. 16, pp. 403-409.
- SIESJÖ, B. K., 1994, "Calcium-Mediated Processes in Neuronal Degeneration", *Annals New York Academy of Sciences*, v. 747, pp. 140-161.
- STOTZ, S. C., ZAMPONI, G. W., 2001, "Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca^{2+} channels", *Trends Neuroscience*, v. 24, n. 3, pp. 176-181.
- UEDA, K., YAGAMI, T., ASAKURA, K., et al, 1997, "Chlorpromazine reduces toxicity and Ca^{2+} uptake induced by amyloid β protein (22-35) in vitro", *Brain Research*, v. 748, pp. 184-188.
- VARADARAJAN, S., YATIN, S., AKSENOVA, M., et al, 2000, "Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity", *Journal of Structural Biology*, v. 130, pp. 184-208.
- VERKHRAATSK, A., TOESCU, E. C., 1998, "Calcium and neuronal ageing", *Trends Neuroscience*, v. 21, pp. 2-7.
- VIANNA, G. K., 2005, *Um modelo do Colesterol na Doença de Alzheimer*, PESC/COPPE/UFRJ.
- WEISS, J. H., PIKE, C. J., COTMAN, C. W., 1994, " Ca^{2+} channel blockers attenuates β -amyloid peptide toxicity to cortical neurons in culture", *Journal of Neurochemistry*, v. 62, pp. 372-375.

YANKNER, B. A., 1996, "Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease", *Neuron*, v. 16, pp. 921-932.

ZORUMSKI, C. F., OLNEY, J. W., 1993, "Excitotoxic Neuronal Damage and Neuropsychiatric Disorders", *Pharmac. Ther.*, v. 59, pp. 145-162.