

Thais Appelt Peres Bartiê

**MODELAGEM MATEMÁTICA DAS ONDAS DE CÁLCIO NOS
ASTRÓCITOS A PARTIR DE ESTÍMULOS
GLUTAMATÉRGICOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Mestre em Engenharia Química.
Orientador: Prof. Dr. Leonel Teixeira
Pinto

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Bartiê, Thais Appelt Peres

Modelagem matemática das ondas de cálcio nos astrócitos a partir de estímulos glutamatérgicos / Thais Appelt Peres Bartiê; orientador, Leonel Teixeira Pinto - Florianópolis, SC, 2015.

130 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Astrócitos. 3. Ondas de cálcio. 4. Modelagem matemática. I. Pinto, Leonel Teixeira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Modelagem Matemática das Ondas de Cálcio nos Astrócitos a Partir de Estímulos Glutamatérgicos

por

Thais Appelt Peres Bartiê

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof.Dr. Leonel Teixeira Pinto
orientador

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado
coordenador

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan

Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado

Prof.^a Dr.^a Carla Inês Tasca

Florianópolis, 12 de junho de 2015

Este trabalho é dedicado ao meu marido, meus pais e às minhas avós, que corajosamente abriram portas para que seus netos pudessem alcançar grandes conquistas.

AGRADECIMENTOS

A finalização de um projeto nos faz refletir sobre as pessoas que não somente o viabilizaram, mas o tornaram mais simples, divertido e inesquecível. Elencar o nome e a contribuição de cada uma delas resultaria em uma lista extensa, portanto os resumirei em poucas palavras, que serão insuficientes para expressar minha gratidão.

Agradeço ao meu marido por me suportar de todos os modos que essa palavra pode descrever. Agradeço por me amar, respeitar, apoiar e por ser minha melhor metade.

Agradeço aos meus pais por me inculcarem o valor da educação e estarem sempre dispostos a me auxiliar. Agradeço especialmente à minha mãe que, sempre que possível, alivia a minha vida. Agradeço também à minha sogra pelo cuidado e atenção a mim dispensados. Agradeço à minha irmã por cuidar de mim e me apoiar. Agradeço ao meu irmão pela disposição em me fazer companhia, revisar meus trabalhos e assistir antecipadamente às minhas apresentações. Agradeço também por me incentivar a desfrutar de momentos agradáveis de lazer.

Agradeço aos meus colegas do Neurolab por me propiciarem um ambiente de trabalho divertido, inspirador e enriquecedor. Agradeço pelas trocas de informações que tanto contribuíram para meu crescimento pessoal e intelectual.

Agradeço aos meus amigos, especialmente ao Leonardo e Ana Paula Malotti, pelos conselhos e apoio incondicional. Ao Ângelo, Brayan, Julie e Sara que, desde a graduação, contribuem ao meu aprendizado contínuo e me propiciam momentos divertidos. Agradeço também aos meus familiares que sempre me apoiaram e se alegraram com minhas conquistas.

Agradeço ao Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto por ter entendido com plenitude o significado da palavra “orientador” e por ter me conduzido a mares nunca navegados com maestria e entusiasmo.

Agradeço aos Professores Dr. Arioaldo Bolzan, Dr. Luismar Marques Porto, Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado e à Prof.^a Dr.^a Carla Inês Tasca por aceitarem participar da banca examinadora do presente trabalho e, deste modo, contribuírem para que o mesmo seja aperfeiçoado.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina pelo aprendizado que me propiciaram.

Agradeço também ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Não seja escravo do seu passado. Mergulhe em mares grandiosos, vá bem fundo e nade até bem longe, e voltarás com respeito por si mesmo, com um novo vigor, com uma experiência a mais que explicará e superará a anterior.”

(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

Embora identificados há 150 anos, os astrócitos ainda suscitam discussões na comunidade científica a respeito das funções que desempenham no processamento da informação cerebral. Estudos do início da década de 90 apontaram que essas células poderiam não só atuar como suporte estrutural e homeostático aos neurônios, mas também modular a transmissão sináptica. A principal evidência que suportou essa hipótese foi a constatação de que o aumento da concentração intracelular de cálcio nos astrócitos, fenômeno denominado “sinalização de cálcio”, desencadeia a liberação de transmissores químicos no meio extracelular, podendo alterar a dinâmica das sinapses. Observou-se também que essa sinalização não se restringe a uma célula, mas que ela avança ao longo da rede de astrócitos dando origem às “ondas de cálcio”. Deste modo, constatou-se que essa sinalização é uma peça chave no debate a respeito das funções dos astrócitos. A discrepância observada nos resultados experimentais disponibilizados na literatura impossibilita uma conclusão absoluta sobre o assunto. Nessa perspectiva surge a proposta de se abordar o tema por meio da modelagem matemática. Alguns modelos que visam descrever a sinalização de cálcio nos astrócitos já foram propostos na literatura, todavia, eles são de cunho empírico e não levam em conta a complexa geometria dessas células. Diante desse cenário propõe-se o presente trabalho, que visa elaborar um modelo matemático fenomenológico, biologicamente coerente, para ondas de cálcio em astrócitos. Posteriormente, esse modelo pode ser aperfeiçoado para a predição da liberação dos transmissores químicos no meio extracelular e, deste modo, contribuir para a discussão sobre a possível modulação sináptica realizada pelos astrócitos. Após a definição dos fenômenos a serem considerados e da geometria celular a ser adotada, formulou-se o modelo matemático, que foi resolvido numericamente utilizando-se o método das diferenças finitas. Desenvolveu-se um aplicativo computacional que permite simular diversas geometrias de células e de redes de astrócitos. O modelo apresentou um comportamento coerente, semelhante a um resultado experimental disponibilizado na literatura para astrócitos em cultura. O período de oscilação, 16,5 s, e a máxima concentração de cálcio na célula, $0,7 \mu M$, foram coerentes com os resultados experimentais. Foi possível também estudar a dinâmica da sinalização em redes de astrócitos, demonstrando que o modelo e o aplicativo propostos são adequados para descrever o fenômeno em estudo.

Palavras-chave: Astrócitos. Ondas de cálcio. Modelagem matemática.

ABSTRACT

Astrocytes have been identified 150 years ago, but they still raise discussions in the scientific community about the role they play in brain information processing. Early 90's studies showed that these cells could not only act as structural and homeostatic support to the neurons, but they also modulate synaptic transmission. The main evidence that supported this hypothesis was the finding that the increase in intracellular calcium concentration in astrocytes, a phenomenon called "calcium signaling", triggers the release of chemical transmitters in the extracellular fluid, may change the synapses dynamics. It was also observed that this signaling is not limited to one cell but it spreads along the astrocytes network like "calcium waves". Thus, it was found that this signaling is a key in the debate about the astrocytes functions. A discrepancy observed in the experimental results available in the literature precludes an absolute conclusion about it. From this perspective comes the proposal to approach the issue through mathematical modeling. Some models that aim to describe the calcium signaling in astrocytes have been proposed in the literature, however, they are empirical and they do not take into account the complex geometry of these cells. Facing this scenario this work is proposes to develop a phenomenological model, biologically consistent, to calcium waves in astrocytes. This model might later predict the release of chemical transmitters in the extracellular fluid and to contribute to the discussion on the possible synaptic modulation performed by astrocytes. After defining the phenomena to be considered and cell geometry to be adopted, the mathematical model was formulated and solved numerically using the finites differences method. A computer application was developed to simulate different cells geometries and astrocytes networks. The model showed a consistent behavior, similar to an experimental result in the available literature for astrocytes in culture. The period of oscillation, 16.5 s, and the maximum cell calcium concentration, 0.7 μM , were consistent with the experimental results. It was also possible to study the dynamics of signaling in astrocytes networks, showing that the model and the proposed application are suitable to describe the phenomenon under study.

Keywords: Astrocytes. Calcium waves. Mathematical Modelling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da passagem de sinal em uma sinapse elétrica e uma sinapse química.....	32
Figura 2– Representação de uma estrutura genérica de neurônios.	33
Figura 3 - Esquema da disposição espacial dos astrócitos no sistema nervoso..	34
Figura 4–Ilustração dos diferentes transportadores iônicos existentes nas membranas celulares.....	35
Figura 5–Representação do agrupamento de proteínas formando um canal iônico.	36
Figura 6–Ilustração dos diferentes mecanismos de abertura de canais.	36
Figura 7 - Esquema representando o mecanismo de funcionamento dos receptores ionotrópicos.....	38
Figura 8 - Esquema ilustrando o mecanismo de funcionamento dos receptores metabotrópicos.....	39
Figura 9 - Representação sintética dos principais fenômenos envolvidos na sinalização de cálcio nos astrócitos.....	41
Figura 10 - Representação esquemática dos fenômenos considerados por Höfer, Venance e Glaume (2002) para a sinalização de cálcio nos astrócitos.	47
Figura 11 - Representação esquemática dos fenômenos considerados por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) para a sinalização de cálcio nos astrócitos.	49
Figura 12 - Resultados de Höfer, Venance e Glaume (2002) para a sinalização de cálcio se propagando ao longo de uma rede de astrócitos.	56
Figura 13– Morfologia de um astrócito humano.....	59
Figura 14 - Estruturas utilizadas para modelar redes de astrócitos.	60
Figura 15 - Desenho esquemático do interior de um astrócito.....	61
Figura 16 - Esquema dos fenômenos considerados para o modelo matemático.	62
Figura 17 - Esquema ilustrando o mecanismo de funcionamento das bombas de Ca^{2+}	66
Figura 18 - Números de canais abertos em função do tempo para três situações hipotéticas utilizando o modelo de Means <i>et al.</i> (2006) e $\eta = 8$	70
Figura 19 - Números de canais abertos em função do tempo para 50 canais hipotéticos utilizando o modelo de Means <i>et al.</i> (2006) e $\eta=8$	71
Figura 20 - Comportamento da curva proposta por Maio (2008) para diferentes valores de $t_{fechamento}$ e $t_{abertura}$	72
Figura 21 - Fração de canais abertos ao longo do tempo utilizando o modelo de Li e Rinzel (1994) com base nos dados de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006). .	73
Figura 22 - Subdivisão do corpo celular necessária para a proposição de uma solução analítica para o modelo matemático.	80
Figura 23 - Exemplo de uma possível estrutura de astrócito a ser resolvida no programa computacional.....	81
Figura 24– Representação planar da geometria do astrócito a) quando considerada como uma estrutura única e b) quando subdividida em diversos prismas retangulares.	82

Figura 25 - Representação das posições em cada região para as quais é necessário especificar as condições de contorno.	82
Figura 26 - Exemplo de numeração de uma geometria proposta para o astrócito.	83
Figura 27 - Exemplo do arquivo de dados "structure01" elaborado para a estrutura de um astrócito representada na figura 23.	84
Figura 28 - Exemplo do arquivo de dados "Network01" elaborado para a estrutura de um astrócito representada na figura 23.	84
Figura 29 - Exemplo de malha para o corpo celular e uma ramificação indicando que, no contorno, elas não se sobrepõem.....	85
Figura 30–Ilustração dos pontos criados além do domínio da ramificação como uma ferramenta matemática para solução numérica através do método das diferenças finitas.....	86
Figura 31 - Representação do ponto imaginário e dos quatros pontos que o circundam no corpo celular, utilizados para o cálculo da concentração.	87
Figura 32 - Representação do ponto imaginário e dos quatros pontos que o circundam no corpo celular, utilizados para o cálculo da concentração.	88
Figura 33 - Exemplo de uma estrutura que pode ser montada no programa computacional.	89
Figura 34 – Comparação entre um a) astrócito real e uma b) geometria desenvolvida no programa.	90
Figura 35 - Exemplo de uma rede de astrócitos a) real e b) que pode ser construída no programa computacional desenvolvido.....	90
Figura 36 - Exemplo de rede de astrócitos a) disponível na literatura e b) desenvolvida pelo programa computacional desenvolvido.....	91
Figura 37 - Representação do efeito da mudança no coeficiente de saturação da bomba.	93
Figura 38 - Resultados experimentais de uma cultura de astrócito imersa em solução contendo 100 μM de glutamato.....	95
Figura 39 - Concentrações de cálcio (linha contínua) e IP_3 (linha pontilhada) obtida por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) de acordo com o seu modelo matemático.	96
Figura 40 - Geometria do astrócito considerada para o modelo de um astrócito em cultura.	97
Figura 41 - Concentração de glutamato ao longo do tempo à qual os astrócitos estão submetidos.....	98
Figura 42 - Comportamento das curvas de abertura e fechamento para os canais abertos por glutamato.	98
Figura 43 - Comportamento do produto entre a curva de abertura e de fechamento para os canais abertos por glutamato.....	99
Figura 44 - Dinâmica das concentrações médias de Ca^{2+} e IP_3 na citosol celular obtidas a partir da solução numérica do modelo proposto.....	100
Figura 45 - Concentração de Ca^{2+} no retículo endoplasmático.....	102
Figura 46 - Dinâmica das concentrações médias de Ca^{2+} e IP_3 na citosol celular obtidas a partir da solução numérica do modelo proposto até 500s.....	103

Figura 47 - Curva de abertura, fechamento e o seu produto para um ponto da membrana do <i>RE</i> .	103
Figura 48 - Concentração de Ca^{2+} avaliada para concentração oscilatória e constante de glutamato.	104
Figura 49 - Concentração de IP_3 avaliada para concentração oscilatória e constante de glutamato.	105
Figura 50 - Concentração de IP_3 para o caso em que a equação que descreve sua produção não leva em conta a concentração de Ca^{2+} .	106
Figura 51 - Dinâmica das concentrações de Ca^{2+} e IP_3 na célula obtidas a partir da solução numérica do modelo computacional desenvolvido.	106
Figura 52 - Concentração de IP_3 com e sem a ativação de receptores ionotrópicos.	107
Figura 53 - Concentração celular de cálcio para ativação e não ativação dos receptores ionotrópicos.	108
Figura 54 - Concentração de cálcio no <i>RE</i> para ativação e não ativação dos receptores ionotrópicos.	108
Figura 55 - Quadros retirados do vídeo de Fields e Stevens-Graham (2002) mostrando o avanço da onda de cálcio em uma rede de astrócitos.	110
Figura 56 - Rede de astrócitos utilizada a) no experimento de Fields e Stevens-Graham (2002) e b) na simulação realizada no programa computacional desenvolvido.	111
Figura 57 - Rede de astrócitos simulada computacionalmente.	112
Figura 58 - Curva de glutamato na fenda.	113
Figura 59 - Evolução da onda de cálcio nos astrócitos obtida a partir do programa computacional desenvolvido.	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista das equações do modelo que visa descrever a dinâmica do cálcio nos astrócitos.....	65
Quadro 2 - Tempos de abertura e fechamento para três situações hipotéticas com 5 canais.	70
Quadro 3 - Legenda das condições de contorno que podem ser utilizadas no programa computacional.....	83
Quadro 4 - Parâmetros globais utilizados no modelo.	94
Quadro 5 - Parâmetros do modelo para uma célula em cultura.	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA - ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
ATP - adenosina trifosfato
Ca²⁺ - íons de cálcio
CODP - canal operado por diferença de potencial
DAG - diacilglicerol
GLU - glutamato
i - *GluR* - receptor ionotrópico de glutamato
IP₃ - inositol trifosfato
m - *GluR* - receptor metabotrópico de glutamato
Na⁺ - íons de sódio
NMDA - N-metil-D-aspartato
PIP₂ - fosfatidilinositol 3,4-bifostato
PLC - proteína fosfolipase C
PKC - proteína quinase C
P2X - receptor ionotrópico de *ATP*
RE - retículo endoplasmático
RyR - receptor de rianodina
STIM - molécula de interação estromal
TRPC - canal transiente de potencial
V.C. - volume de controle

LISTA DE SÍMBOLOS

$C_{Ca^{2+}_{cit}}$	concentração de Ca^{2+} no citosol, $mol. \mu m^{-3}$
$C_{Ca^{2+}_{extracelular}}$	concentração de Ca^{2+} extracelular, $mol. \mu m^{-3}$
$C_{Ca^{2+}_{fenda}}$	concentração de Ca^{2+} na fenda, $mol. \mu m^{-3}$
$C_{Ca^{2+}_{RE}}$	concentração de Ca^{2+} no RE, $mol. \mu m^{-3}$
C_{GLU}	concentração de glutamato na fenda, $mol. \mu m^{-3}$
C_{IP_3}	concentração de IP_3 no citosol, $mol. \mu m^{-3}$
$D_{Ca^{2+}}$	coeficiente de difusão do Ca^{2+} no citosol, $\mu m^2. s^{-1}$
D_{IP_3}	coeficiente de difusão do IP_3 no citosol, $\mu m^2. s^{-1}$
$f_{\acute{a}rea}^{GLU}$	fração da área da membrana celular ocupada por receptores ionotrópicos de glutamato
$f_{\acute{a}rea}^{bomba,membrana}$	fração da área da membrana celular ocupada por bombas
$f_{\acute{a}rea}^{bomba,RE}$	fração da área do RE ocupada por bombas
$f_{\acute{a}rea}^{degradação}$	fração da área do RE onde o IP_3 é inativado
$f_{\acute{a}rea}^{liberação}$	fração da área do RE ocupada por receptores de IP_3
$f_{\acute{a}rea}^{passivos,membrana}$	fração da área da membrana celular ocupada por canais passivos
$f_{\acute{a}rea}^{passivos,RE}$	fração da área do RE ocupada por canais passivos
$f_{\acute{a}rea}^{produção}$	fração de área da membrana celular ocupada por receptores metabotrópicos
$h_{degradação}$	coeficiente de inativação do IP_3 , $\mu m. s^{-1}$
$h_{ionotrópicos}$	coeficiente do fluxo através dos canais abertos por ativação de receptores ionotrópicos, $\mu m. s^{-1}$
$h_{liberação}$	coeficiente de liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, $\mu m. s^{-1}$
$h_{passivos}^{membrana}$	coeficiente do fluxo através dos canais passivos na membrana celular, $\mu m. s^{-1}$
$h_{passivos}^{RE}$	coeficiente do fluxo através dos canais passivos no RE, $\mu m. s^{-1}$
$k_{abertura}^{GLU}$	constante de abertura dos canais abertos por ativação de receptores ionotrópicos, $\mu m^3. mol^{-1}$

$k_{abertura}^{IP_3}$	constante de abertura dos canais abertos por IP_3 , $\mu m^3 \cdot mol^{-1}$
$k_{bomba}^{membrana}$	constante de fluxo das bombas na membrana celular, $mol \cdot \mu m^{-2} \cdot s^{-1}$
k_{bomba}^{RE}	constante de fluxo das bombas no RE, $mol \cdot \mu m^{-2} \cdot s^{-1}$
k_{bomba}^{sat}	constante de saturação da bomba, $mol \cdot \mu m^{-3}$
$k_{Ca^{2+}}$	coeficiente de saturação de produção do IP_3 pelo Ca^{2+} , $mol \cdot \mu m^{-3}$
k_{GLU}	coeficiente de saturação de produção do IP_3 pelo glutamato, $mol \cdot \mu m^{-3}$
$k_{produção}$	coeficiente de produção do IP_3 , $mol \cdot \mu m^{-2} \cdot s^{-1}$
k_{tempo}^{GLU}	constante de fechamento dos canais abertos por ativação de receptores ionotrópicos, s^{-1}
$k_{tempo}^{IP_3}$	constante de fechamento dos canais abertos por IP_3 , s^{-1}
t	tempo, s
$t_{fechamento}^{GLU}$	tempo de fechamento dos canais abertos por ativação de receptores ionotrópicos, s
$t_{fechamento}^{IP_3}$	tempo de fechamento dos canais abertos por IP_3 , s
$v_{bomba}^{membrana}$	vazão molar das bombas na membrana celular, $mol \cdot s^{-1}$
v_{bomba}^{RE}	vazão molar das bombas na membrana do RE, $mol \cdot s^{-1}$
$v_{degradação}$	vazão molar de inativação do IP_3 , $mol \cdot s^{-1}$
$v_{entrada}$	vazão molar de entrada de Ca^{2+} através da membrana celular, $mol \cdot s^{-1}$
$v_{junções}$	vazão através de junções comunicantes, $mol \cdot s^{-1}$
$v_{liberação}$	vazão molar de liberação de Ca^{2+} pelo RE, $mol \cdot s^{-1}$
$v_{passivos}^{membrana}$	vazão molar dos canais passivos na membrana celular, $mol \cdot s^{-1}$
$v_{passivos}^{RE}$	vazão molar dos canais passivos na membrana do RE, $mol \cdot s^{-1}$
$v_{produção}$	vazão molar de produção do IP_3 devido à ativação de receptores metabotrópicos, $mol \cdot s^{-1}$
V_{RE}	volume do RE, μm^3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 OBJETIVOS.....	28
1.1.1 Objetivo Geral	28
1.1.2 Objetivos Específicos.....	28
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 BREVE HISTÓRICO SOBRE OS ASTRÓCITOS	29
2.2 SINAPSE TRIPARTITE	31
2.2.1 Neurônios.....	32
2.2.2 Astrócitos.....	33
2.3 TRANSPORTE IÔNICO.....	35
2.3.1 Canais operados por diferença de potencial.....	37
2.3.2 Canais operados por ligantes.....	37
2.3.2.1 Receptores ionotrópicos.....	37
2.3.2.2 Receptores metabotrópicos	38
2.3.3 Bombas	39
2.4 SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO.....	40
2.5 MODELOS MATEMÁTICOS.....	43
2.5.1 Geometria.....	44
2.5.2 Variáveis e dependência funcional	44
2.5.3 Fenômenos considerados e balanços de massa	44
2.5.3.1 Postnov <i>et al.</i> (2009).....	45
2.5.3.2 Höfer, Venance e Glaume (2002).....	46
2.5.3.3 Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006).....	48
2.5.4 Descrição matemática dos fenômenos.....	49
2.5.4.1 Entrada de cálcio no citosol através da membrana celular... 50	
2.5.4.2 Saída de cálcio através da membrana plasmática	50
2.5.4.3 Liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático	51
2.5.4.4 Atuação da bomba do retículo endoplasmático	53
2.5.4.5 Atuação dos canais passivos	53
2.5.4.6 Produção do IP ₃ mediada pela ligação do glutamato ao receptor metabotrópico	53
2.5.4.7 Produção do IP ₃ mediada pela concentração intracelular de cálcio.....	54
2.5.4.8 Degradação do IP ₃	55
2.5.4.9 Passagem de compostos através das junções comunicantes 55	
2.5.5 Contribuições dos modelos discutidos.....	56
2.5.6 Considerações gerais	57
3 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	59

3.1 GEOMETRIA.....	59
3.2 VARIÁVEIS E DEPENDÊNCIA FUNCIONAL	61
3.3 FENÔMENOS E BALANÇO DE MASSA	61
3.3.1 Fluido Citoplasmático – Ca₂ + e IP₃	63
3.3.2 Retículo endoplasmático – Ca₂ +	64
3.4 FLUXOS DE CÁLCIO NAS MEMBRANAS	65
3.4.1 Fluxo de cálcio através das bombas	65
3.4.2 Fluxo de cálcio através dos canais passivos	67
3.4.3 Fluxo de cálcio através dos canais abertos pelo IP₃	68
3.4.4 Fluxo de cálcio através de canais abertos a partir da ativação de receptores ionotrópicos de glutamato	75
3.5 FLUXOS DE PRODUÇÃO E DEGRADAÇÃO DE IP ₃	76
3.5.1 Produção de IP₃	76
3.5.2 Degradação do IP₃	77
3.6 CONDIÇÕES DE CONTORNO	77
3.6.1 Isolamento	77
3.6.2 Continuidade	77
3.6.3 Fluxos de cálcio na membrana do retículo endoplasmático ..	78
3.6.4 Fluxos de cálcio na membrana celular	78
3.6.5 Fluxo de IP₃ na membrana celular	79
3.6.6 Fluxo de IP₃ na membrana do retículo endoplasmático	79
4 APLICATIVO COMPUTACIONAL	81
4.1 ENTRADA DE DADOS PARA A GEOMETRIA	81
4.2 ACOPLAMENTO ENTRE DIFERENTES REGIÕES	85
4.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	88
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
5.1 APLICATIVO COMPUTACIONAL	89
5.2 COMPARAÇÃO COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS	91
5.2.1 Parâmetros globais	91
5.2.2 Uma célula em cultura	94
5.2.3 Rede de astrócitos	109
6 CONCLUSÃO	117
REFERÊNCIAS	119
APÊNDICE A – ARQUIVOS DE ENTRADA PARA GERAÇÃO DE DIFERENTES GEOMETRIAS	127

1 INTRODUÇÃO

Durante muitos anos acreditou-se que a única função desempenhada pelos astrócitos no sistema nervoso era sustentar estruturalmente os neurônios. Consequentemente, supunha-se que sua atuação no processamento da informação cerebral era passiva. Todavia, essa visão sofreu consideráveis questionamentos quando pesquisas desenvolvidas no início da década de 80 consolidaram a ideia de que os astrócitos interagem com os neurônios durante a transmissão sináptica, captando e liberando transmissores químicos no meio extracelular em função de sua dinâmica iônica (SANTELLO; VOLTERRA, 2009 e VOLTERRA; MELDOLESI, 2005).

Além disso, verificou-se que os astrócitos são capazes de se comunicar entre si por meio de ondas de cálcio geradas espontaneamente ou a partir de estímulos químicos neuronais, sendo que em ambas as situações são capazes de interferir quimicamente em neurônios vizinhos. Posteriormente, pesquisas mostraram que essas ondas podem influenciar ou serem influenciadas por distúrbios neurológicos tais como epilepsia e doenças tais como o Mal de Alzheimer (PARRI; GOULD; CRUNELLI, 2001 e VERKHRATSKY, 2006).

As ondas de cálcio são resultado da combinação de diversos fenômenos envolvendo transporte iônico e desencadeiam a liberação de diferentes transmissores químicos no meio extracelular. A complexidade desses processos suscita dúvidas quanto a real função dos astrócitos no processamento da informação cerebral: seriam essas células responsáveis apenas pela sustentação e manutenção homeostática dos neurônios ou também modulariam a transmissão sináptica? (PEREA; SUR; ARAQUE, 2014)

Ainda não há consenso na comunidade científica a respeito da resposta à pergunta acima proposta (NAVARRETE *et al.*, 2012 e VERKHRATSKY; NEDERGAARD; HERTZ, 2015). Nessa perspectiva, os modelos matemáticos apresentam-se como uma ferramenta promissora, uma vez que possuem a característica de validar ou refutar hipóteses inicialmente adotadas, possibilitando maior compreensão dos fenômenos envolvidos em determinado processo e de quais seriam suas implicações.

Deste modo, a elaboração de um modelo matemático que descreva a sinalização de cálcio nos astrócitos pode contribuir para a compreensão das interações entre essas células e os neurônios, assim como possibilitar, a partir da variação dos parâmetros do modelo, maior

entendimento com relação às consequências de possíveis falhas nessa comunicação (AMIRI; BAHRAMI; JANAHMADI, 2011).

Para a realização da modelagem matemática dos processos que ocorrem nos astrócitos, o engenheiro químico pode contribuir significativamente em função do seu aporte ferramental matemático e fenomenológico. Todavia, somente os conceitos básicos de engenharia são incapazes de atender a problemas de interface como este. A incorporação de novos conhecimentos, neste caso, dos processos biológicos, torna-se imprescindível para o desenvolvimento de um modelo adequado e plausível biologicamente.

Nesse contexto se encaixa o presente trabalho, que visa propor um modelo matemático para as ondas de cálcio em astrócitos, descrevendo os fenômenos biológicos que a permeiam.

1.1 OBJETIVOS

Diante do cenário científico em que se enquadram as ondas de cálcio nos astrócitos, os objetivos gerais e específicos deste trabalho foram delineados. Esse projeto se enquadra em uma pesquisa mais ampla, que visa simular uma rede neuronal, à qual, futuramente, serão incorporados os astrócitos. Deste modo, poderá se discutir com mais propriedade sua influência no processamento da informação cerebral.

1.1.1 Objetivo Geral

Elaborar um modelo matemático fenomenológico, biologicamente coerente, que descreva ondas de cálcio induzidas por estímulos glutamatérgicos em astrócitos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Elencar os fenômenos envolvidos nas ondas de cálcio em astrócitos;
- b) Desenvolver um modelo matemático baseado nesses fenômenos;
- c) Desenvolver um aplicativo computacional para resolver numericamente o modelo matemático proposto;
- d) Validar o modelo matemático.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Muitos assuntos propostos há séculos foram extensivamente estudados apenas recentemente, após a criação e o aperfeiçoamento de diversas técnicas experimentais. Os astrócitos se enquadram nesse cenário científico uma vez que, embora tenham sido identificados no século XIX, somente nas últimas décadas foram desvendados muitos fenômenos nos quais estão envolvidos.

A análise da evolução histórica transcorrida pelas concepções sobre os astrócitos permite a constatação da existência de questões não resolvidas sobre essas células, além da percepção sobre a necessidade de se propor alternativas que contribuam para o debate dessas questões na comunidade científica. Sendo assim, apresentar-se-á, inicialmente, um panorama geral da construção histórica do conhecimento científico que se tem sobre os astrócitos para que, posteriormente, sejam discutidas as lacunas existentes.

2.1 BREVE HISTÓRICO SOBRE OS ASTRÓCITOS

Rudolph Virchow, ao estudar os processos inflamatórios das cavidades ventriculares cerebrais, sugeriu a existência de um tecido capaz de conectar e suportar as células nervosas. Em 1856, publicou a conclusão de seus estudos confirmando a presença de um tecido de conexão que adentrava a massa cerebral, preenchendo os interstícios das células nervosas e separando-as dos vasos sanguíneos. A esse tecido atribuiu o nome “nevernitt”, traduzido como “neuroglia”. Estudos posteriores demonstraram que, o que Virchow denominava neuroglia, correspondia à substância intersticial como um todo, e não às células que a compunha (KETTENMANN; RANSOM, 2004 e SOMJEN, 1988).

Otto Deiters foi quem, em 1865, identificou as células gliais propriamente ditas, mais especificamente, aquelas que atualmente se conhece como astrócitos. Deiters as caracterizou morfológicamente, afirmando que eram formadas por um núcleo bem definido, ao qual se acoplavam inúmeras ramificações. Por algum tempo essas células ficaram conhecidas como “célula de Deiters” até que, em 1893, Michael von Lenhossek as intitulou astrócitos, em referência à sua morfologia estelar. William Lloyd Andriezen, também em 1893, subdividiu as astrócitos em duas classes: fibrosos e protoplasmáticos, sendo que aqueles apresentam prolongamentos longos e estão presentes na substância branca do cérebro,

enquanto estes possuem ramificações curtas e estão localizados na substância cinzenta¹ (KETTENMANN; RANSOM, 2004).

Os pesquisadores posteriores a Deiters passaram a se dedicar não somente à análise anatômica dos astrócitos, mas à compreensão de quais seriam suas funções no sistema nervoso. Camillo Golgi, em 1871, propôs que os astrócitos seriam responsáveis pela nutrição neuronal devido à sua estreita associação com vasos sanguíneos (KETTENMANN; RANSOM, 2004). Ramón e Cajal, em 1897, expôs sua opinião a respeito das funções dos astrócitos, discutindo sua importância fisiológica na regulação da microcirculação cerebral (NAVARRETE; ARAQUE, 2014).

Em 1907, Emilio Lugaro defendeu a ideia de que essas células direcionariam o crescimento neuronal e manteriam a homeostase do fluido intersticial. Além disso, supôs que seriam capazes de atuar na sinapse através da liberação e captação de substâncias no meio extracelular (KIMELBERG, 1986).

Embora Lugaro tivesse previsto a existência de interação entre os astrócitos e os neurônios no início do século XX, somente em 1977 surgiu um trabalho que defendeu essa hipótese com bastante propriedade. Martinez-Hernandez, Bell e Norenberg (1977) demonstraram que as enzimas glutamina sintetase eram abundantes nos astrócitos. Deste modo, concluíram que essas células seriam responsáveis por produzir glutamina em grande quantidade que, ao ser liberada para o meio extracelular, poderia ser captada pelos neurônios, que a transformariam em glutamato. O glutamato seria, durante a transmissão sináptica, liberado na fenda e, eventualmente, captado pelos astrócitos, continuando um ciclo metabólico (SOMJEN, 1980).

A hipótese da interação entre neurônios e astrócitos foi reforçada após a descoberta de que o glutamato e outras moléculas existentes na fenda sináptica propiciam o aumento da concentração intracelular de cálcio nos astrócitos, fenômeno intitulado sinalização de cálcio. Este incremento provoca a liberação de transmissores químicos na fenda e, possivelmente, altera a dinâmica da transmissão sináptica (CORNELL-BELL; FINKBEINER, 1991 e PARPURA; GRUBIŠIĆ; VERKHRATSKY, 2011).

Cornell-Bell e Finkbeiner (1991) comprovaram experimentalmente que a sinalização de cálcio não é um fenômeno

¹ Tanto a substância cinzenta quanto a branca localizam-se no sistema nervoso central. Aquela é constituída por células gliais, corpos de neurônios e fibras amielínicas. Esta, por sua vez, possui células gliais e fibras mielínicas (Machado, 2006).

isolado. Essa sinalização se propaga através da rede de astrócitos, dando origem às ondas de cálcio. Deste modo, um aumento localizado da concentração intracelular de cálcio pode ocasionar liberação de transmissores químicos em outras células, distantes daquela na qual se iniciou o sinal.

Inúmeros outros experimentos realizados nas décadas de 1990 comprovaram a comunicação bidirecional, por meio de diversos mecanismos, entre astrócitos e neurônios (PEREA; NAVARRETE; ARAQUE, 2009). Dentro deste contexto, criou-se um novo termo, sinapse tripartite, para que as interações entre astrócitos e neurônios também fossem consideradas ao se estudar a transmissão sináptica. Mais recentemente ainda, passou-se a discutir o termo sinapse tetrapartite, que incorpora a matriz extracelular como um elemento ativo nesse processo (DITYATEV; RUSAKOV, 2011). Como este último conceito é recente e pouco discutido na comunidade científica, adotou-se para esse trabalho o conceito de sinapse tripartite.

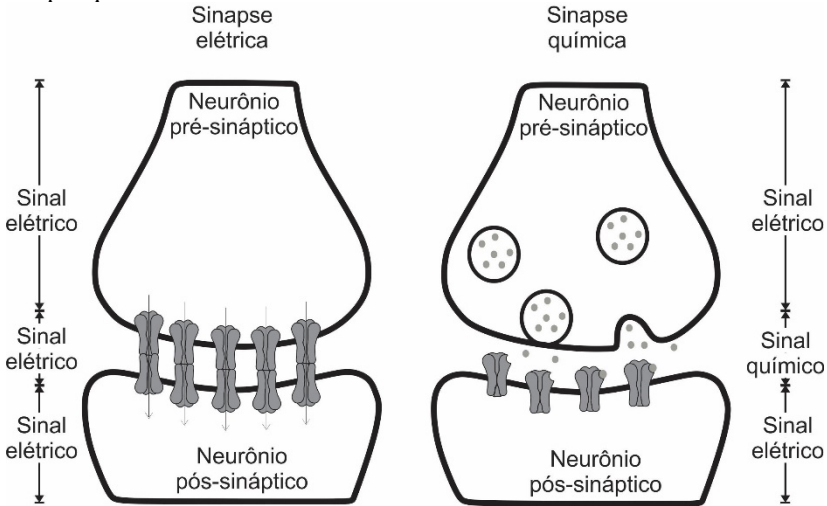
Deste modo, a compreensão sobre o que seria a sinapse tripartite e as características dos elementos que a constituem é essencial para o entendimento dos fenômenos que ocorrem nos astrócitos, uma vez que estão imersos nesse fenômeno biológico.

2.2 SINAPSE TRIPARTITE

A sinapse corresponde à unidade estrutural e funcional da junção entre dois neurônios. O espaço existente entre as membranas dessas células e a transferência de informação nessa região são denominados, respectivamente, fenda sináptica e transmissão sináptica (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008 e DURÁN, 2011).

As sinapses podem ser elétricas ou químicas, dependendo dos fenômenos que as caracterizam. Aquela corresponde à passagem direta de correntes iônicas entre os neurônios por meio de junções especializadas; estas, por sua vez, consistem na liberação de neurotransmissores na fenda sináptica pelo neurônio pré-sináptico, após a chegada do potencial de ação. Esses neurotransmissores dirigem-se aos astrócitos e ao neurônio pós-sináptico. Ao atingir este, provoca abertura de canais de íons que propiciam a despolarização celular, propagando-se assim o potencial de ação ao longo da rede neuronal (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008 e BLAUSTEIN; KAO; MATTESON, 2012). Uma representação das sinapses elétricas e químicas pode ser observada na figura 1.

Figura 1 - Representação da passagem de sinal em uma sinapse elétrica e uma sinapse química.



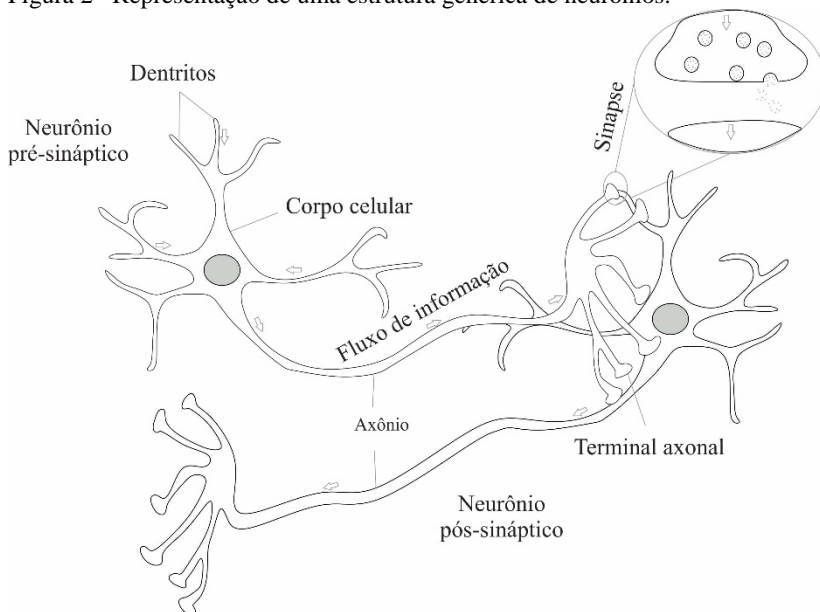
Fonte: desenvolvida pelo autor.

Para melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na sinapse e de como são influenciados pelos astrócitos, discutir-se-ão características pertinentes sobre os elementos que constituem a sinapse tripartite: neurônios e astrócitos.

2.2.1 Neurônios

Os neurônios são células que apresentam três regiões bem definidas: o soma (corpo celular), os dendritos e o axônio. O soma é responsável pela síntese proteica e pelo metabolismo celular. Os dendritos são ramificações do corpo celular que recebem informações advindas de neurônios adjacentes através da sinapse. Os axônios correspondem a outras ramificações do corpo celular cuja função é enviar a informação (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008 e STANFIELD, 2013). A figura 2 ilustra a anatomia dessa célula.

Figura 2– Representação de uma estrutura genérica de neurônios.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

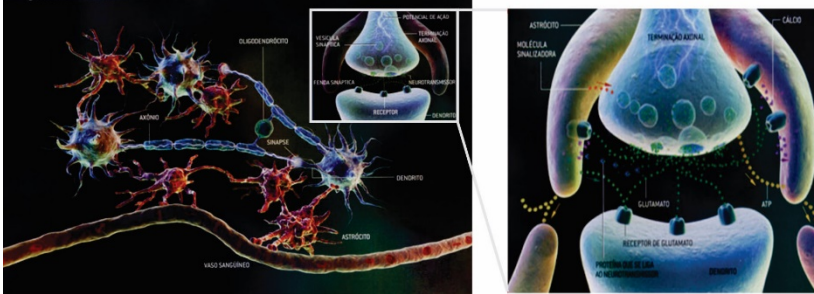
A membrana celular do neurônio, quando em repouso, apresenta um potencial de membrana, V_m , em virtude da diferença entre as concentrações iônicas intra e extracelulares. Alguns tipos de estímulos podem abrir canais iônicos nas membranas celulares, permitindo a passagem de íons e, conseqüentemente, alterando esse potencial. Quando ocorre a despolarização da membrana celular e ela atinge um valor crítico, gera-se o potencial de ação, que se propaga ao longo dos neurônios. Quando esse potencial chega a uma sinapse química, neurotransmissores, tais como adenosina trifosfato (*ATP*) e glutamato, são liberados na fenda sináptica e se dirigem ao neurônio pós-sináptico ou aos astrócitos (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008 e DURÁN, 2011).

2.2.2 Astrócitos

Os astrócitos, células constituídas por um corpo celular ao qual se acoplam inúmeras ramificações, são assim denominados por sua semelhança estrutural às estrelas. Embora apresentem um corpo celular de, aproximadamente, $10\ \mu\text{m}$ de diâmetro, os astrócitos humanos estendem seus prolongamentos de tal forma que a célula pode ocupar

regiões circulares de até $150\ \mu\text{m}$ de diâmetro. Esses prolongamentos se entrelaçam nas ramificações neuronais e envolvem as sinapses. Um astrócito ocupando $66.000\ \mu\text{m}^3$ pode circundar aproximadamente 140.000 sinapses (BUSHONG *et al.*, 2002 e OBERHEIM *et al.*, 2009 e STANFIELD, 2013). A figura 3 mostra a disposição espacial dos astrócitos próximos aos neurônios, envolvendo as sinapses.

Figura 3 - Esquema da disposição espacial dos astrócitos no sistema nervoso.



Fonte: adaptado de Fields (2004).

Os astrócitos desempenham diversas funções no sistema nervoso. Dentre elas destaca-se o suprimento de compostos metabólicos aos neurônios, uma vez que estes contatam poucos vasos sanguíneos, necessitando de uma intermediação. Além disso, essas células são responsáveis pela manutenção da homeostase iônica dos neurônios, uma vez que controlam as concentrações do meio extracelular. O fato de captarem e liberarem transmissores químicos na fenda lhes confere outro papel: suprir os neurônios com os neurotransmissores que serão liberados na fenda durante a transmissão sináptica. Acredita-se que esta última função não se restringe a suprir as necessidades da transmissão sináptica, mas também interfere na mesma, alterando a sua dinâmica (AMIRI; BAHRAMI; JANAHMADI, 2011 e LENT, 2001).

Supõe-se que os astrócitos possam regular a sinapse, quer seja inibindo ou estimulando-a, por meio da regulação de íons no meio extracelular, captura de neurotransmissores da fenda sináptica e regulação da demanda metabólica da transmissão sináptica (BERGLES; JAHR, 1998). Por exemplo, a liberação de glutamato e *ATP* por parte dos astrócitos depende do aumento da concentração intracelular de íons de cálcio. Altas concentrações de íons potássio no meio extracelular geralmente dificultam a propagação das ondas de cálcio intercelulares, o que reduz a liberação de glutamato, prevenindo, assim, que a sinapse seja

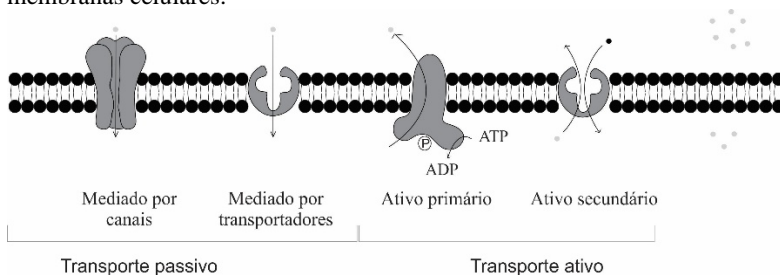
ainda mais estimulada (FRANKE; ILLES, 2006 e FIELDS; STEVENS-GRAHAM, 2002).

Para que toda a dinâmica iônica presente antes, durante e após a transmissão da informação entre os neurônios e astrócitos ocorra, é evidente que a membrana celular de ambas as células seja dotada de mecanismos que possibilitem o transporte de íons do interior para o exterior da célula e vice-versa. Determinadas proteínas presentes na membrana celular são responsáveis por executar essa função e serão melhor descritas na próxima seção.

2.3 TRANSPORTE IÔNICO

Há três tipos principais de transporte iônico: ativo primário, ativo secundário e passivo. No primeiro, o transporte de íons ocorre do meio de menor concentração para o de maior concentração às custas de *ATP* e o transportador é conhecido como “bomba”. No segundo, o transporte também ocorre contra o gradiente de concentração, todavia a fonte de energia é o movimento de outro soluto, para o qual existe gradiente favorável de concentração. No terceiro, não há gasto energético, pois o transporte ocorre a favor do gradiente de concentração, mediado por canais (GECK; HEINZ, 1989). A figura 4 representa esquematicamente o funcionamento desses canais.

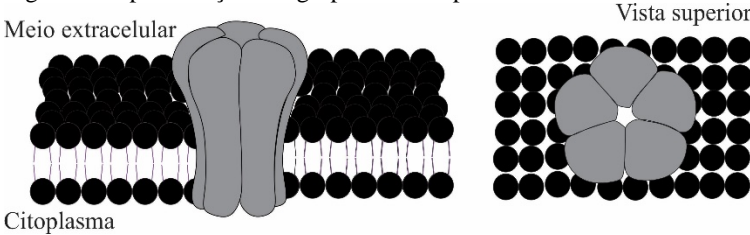
Figura 4—Ilustração dos diferentes transportadores iônicos existentes nas membranas celulares.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

Os canais iônicos correspondem a um agrupamento de 4 a 6 proteínas que formam um poro na membrana celular por onde passam íons, como pode ser observado na figura 5.

Figura 5—Representação do agrupamento de proteínas formando um canal iônico.

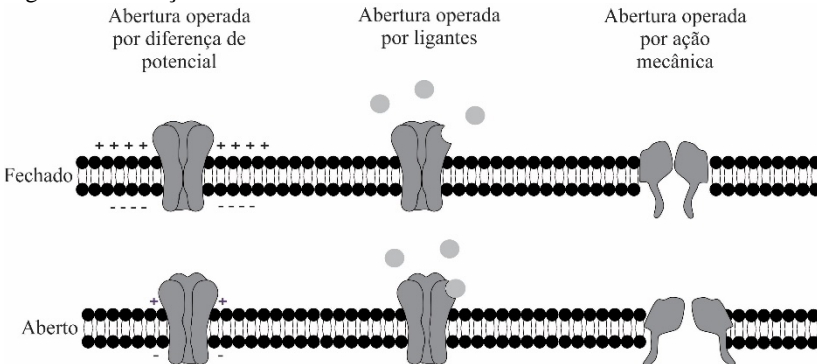


Fonte: desenvolvida pelo autor.

Esses canais possuem altíssima especificidade. São capazes de distinguir entre os íons de potássio, cujo raio é $1,33 \text{ \AA}$, de íons de sódio, cujo raio é $0,95 \text{ \AA}$ (KOCH, 1998). Essa característica deve-se a inúmeros mecanismos, dentre eles, a abundância de água em seu interior, que circunda os íons e os mantém estáveis durante a movimentação. Além disso, as proteínas contêm dipolos estrategicamente posicionados de modo a priorizar a passagem de um íon em detrimento de outro. Outro mecanismo existente é a formação de gaiolas de oxigênio, que aprisionam o íon em seu interior e facilmente atravessam o canal (YELLEN, 2002).

Os canais iônicos abrem ou fecham em função de estímulos elétricos (dependendo da diferença de potencial), mecânicos ou químicos (dependentes de ligantes) (ALBERTS *et al.*, 2008), conforme pode ser observado na figura 6.

Figura 6—Ilustração dos diferentes mecanismos de abertura de canais.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

2.3.1 Canais operados por diferença de potencial

Os canais que são abertos ou fechados em função do valor do potencial de membrana são denominados operados por diferença de potencial (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

Bevan *et al.* (1985), utilizando a técnica denominada “patch-clamp²”, detectaram a presença de canais de íons de sódio, potássio e cloro operados pela diferença de potencial na membrana dos astrócitos do córtex cerebral³ de ratos. Um ano antes, MacVicar (1984) já provara experimentalmente a existência de canais de cálcio operados por diferença de potencial.

2.3.2 Canais operados por ligantes

Os canais operados por ligantes abrem ou fecham a partir da ligação entre determinada molécula (ligante) e um receptor presente na membrana celular. Há dois tipos desses receptores: ionotrópicos e metabotrópicos (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

2.3.2.1 Receptores ionotrópicos

Os receptores ionotrópicos contém um sítio capaz de se ligar a uma entidade química específica. Essa ligação modifica a conformação espacial das proteínas que o constituem, permitindo sua abertura e, conseqüentemente, a passagem de íons a favor do gradiente de concentração. Alguns desses receptores dependem da atuação de agonistas, substâncias que ativam a abertura do canal (PURVES *et al.*, 2004). A figura 7 representa esquematicamente o seu funcionamento.

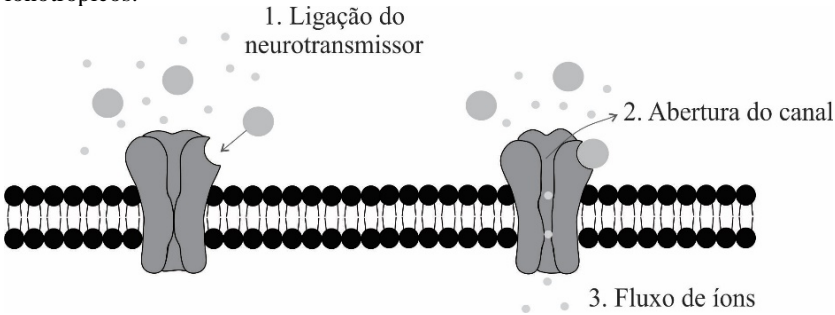
Neary *et al.* (1988) constataram a existência de receptores ionotrópicos nos astrócitos de ratos que, ao se ligarem ao *ATP*, abriam canais que permitiam a entrada de íons de cálcio (Ca^{2+}) no meio intracelular. Koh *et al.* (1995) detectaram receptores de glutamato nos astrócitos do hipocampo cujos agonistas principais eram ácido α -amino-

² A técnica patch-clamp, também denominada técnica de fixação da membrana, permite o registro de correntes iônicas atravessando apenas um canal (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

³ O córtex cerebral corresponde ao local aonde chegam os impulsos nervosos, que posteriormente tornam-se conscientes e são interpretados. Dele “saem os impulsos que iniciam e comandam os movimentos voluntários e com ele estão relacionados os processos psíquicos” (MACHADO, 2006).

3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (*AMPA*) e N-metil-D-aspartato (*NMDA*), que também permitiam a entrada de Ca^{2+} na célula.

Figura 7 - Esquema representando o mecanismo de funcionamento dos receptores ionotrópicos.



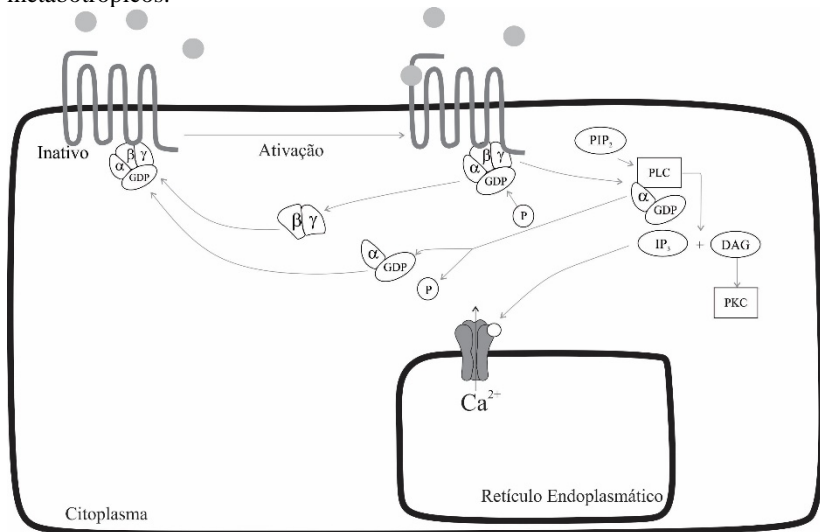
Fonte: desenvolvida pelo autor.

2.3.2.2 Receptores metabotrópicos

Os receptores metabotrópicos também possuem um sítio capaz de se ligar a uma espécie química. Essa ligação dá origem a segundos mensageiros que abrem canais em outros locais da célula.

A ligação do neurotransmissor ao receptor ativa a proteína G, que é composta por 3 unidades (α , β e γ) e está acoplada ao receptor metabotrópico. Essa ativação implica na separação das 3 unidades em dois módulos: um contendo α e outro, β e γ . O módulo α dirige-se à proteína efetora fosfolipase C (*PLC*), ativando-a para a quebra de um lipídeo presente na membrana celular, fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (*PIP₂*), em dois segundos mensageiros: diacilglicerol (*DAG*) e inositol trifosfato (*IP₃*). O *IP₃* dirige-se a sítios presentes em outros canais da célula e os abrem, permitindo a passagem de íons a favor do gradiente de concentração. O *DAG*, por sua vez, estimula a proteína quinase C (*PKC*) a fosforilar diversos substratos (BLAUSTEIN; KAO; MATTESON, 2012). Um esquema ilustrando esse processo pode ser observado na figura 8.

Figura 8 - Esquema ilustrando o mecanismo de funcionamento dos receptores metabotrópicos.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

Foram encontrados na literatura inúmeros tipos de receptores metabotrópicos presentes nos astrócitos (VERKHRATSKY; STEINHÄUSER, 2000), todavia destacar-se-á o mais importante para a dinâmica de funcionamento dessas células: o receptor de glutamato (*m-GluR*). Segundo Ahmed, Lewis e Faber (1990), a ligação do glutamato ao receptor metabotrópico gera o IP_3 , que ativa canais na membrana do retículo endoplasmático (RE), provocando a liberação de cálcio dessa organela para o meio intracelular.

2.3.3 Bombas

As bombas trabalham de modo a transferir substâncias de um meio de menor concentração para outro de maior concentração. Nos astrócitos destaca-se a bomba Na^+/Ca^{2+} , pois ela carrega o cálcio do meio intracelular para o extracelular. Outras proteínas presentes na membrana das células são as ATPases, cuja função é o transporte de cálcio sem um contra-íon. Essas proteínas também estão presentes na membrana do retículo endoplasmático, transferindo cálcio do citoplasma para seu interior (BLAUSTEIN; KAO; MATTESON, 2012 e DEITMER; VERKHRATSKY; LOHR, 1998).

O trabalho conjunto de todos esses canais existentes na membrana celular dos astrócitos dá origem a diversos fenômenos. Dentre todos eles pode-se destacar a sinalização de cálcio.

2.4 SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO

Os astrócitos, embora conhecidos como células não excitatórias, apresentam os chamados “sinais de cálcio”, que correspondem à elevação na concentração citoplasmática de Ca^{2+} . Esse fenômeno é de extrema importância para a compreensão da função do astrócito no processamento da informação cerebral, visto que é o responsável pela liberação de glutamato e *ATP* na fenda sináptica (DEITMER; VERKHRATSKY; LOHR, 1998 e GOLOVINA; BLAUSTEIN, 2000).

O retículo endoplasmático, que consiste em uma rede de tubos interconectados circundando o núcleo celular, é a principal organela que contribui para a sinalização de cálcio nos astrócitos. O cálcio armazenado no retículo é liberado por diversos mecanismos, dentre eles a abertura de canais pelo IP_3 (ALBERTS *et al.*, 2008 e GOLOVINA; MORDECAI, 1997).

Outro incitador de liberação de Ca^{2+} por parte do *RE* é o aumento da concentração citoplasmática deste íon, que acarreta na ativação dos receptores sensíveis à rianodina, fenômeno denominado “liberação de cálcio induzida por cálcio” (CLAPHAM, 1995).

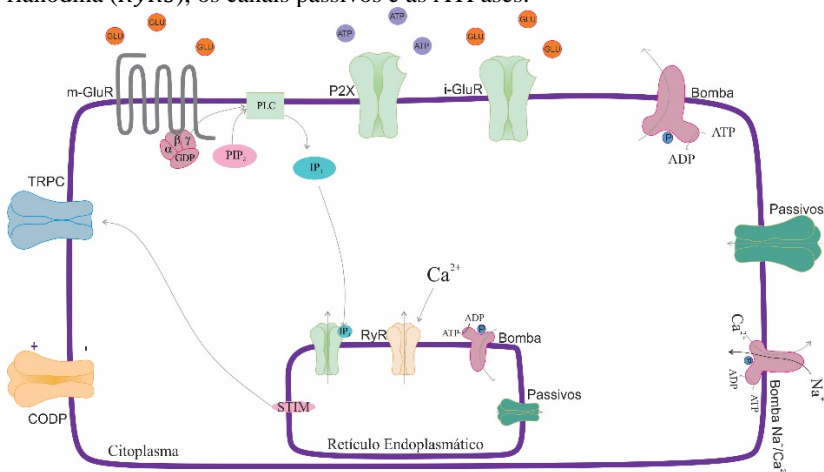
Embora o retículo seja um contribuinte significativo para os “sinais de cálcio”, eles de fato são combinações de diversos outros processos biológicos, destacando-se a atuação de canais abertos pela ativação dos receptores ionotrópicos de *ATP* e glutamato; dos canais operados por diferença de potencial; da bomba de Na^+/Ca^{2+} e das ATPases. Além disso, a célula conta com canais passivos na membrana citoplasmática e na membrana do retículo endoplasmático, que estão permanentemente abertos e trabalham a favor do gradiente de concentração (CLAPHAM, 1995 e VERKHRATSK; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2012).

Há ainda os canais que permitem a entrada de cálcio dependendo do estoque do retículo endoplasmático, ou seja, quando a concentração do retículo diminui, canais são acionados na membrana celular a fim de que entre cálcio para a célula. Verkhratsky e Parpura (2014) afirmam que os principais canais ativados pela carência de Ca^{2+} no *RE* são os receptores transientes de potenciais (*TRPC*, do inglês, transient receptor potential

channel), acionados pela molécula de interação estromal (*STIM*, do inglês, stromal interaction molecule).

A figura 9 compila os principais fenômenos envolvidos na sinalização de cálcio nos astrócitos.

Figura 9 - Representação sintética dos principais fenômenos envolvidos na sinalização de cálcio nos astrócitos. Na membrana celular tem-se a ativação dos receptores ionotrópicos por moléculas de *ATP* e glutamato (*P2X* e *i-GluRs*, respectivamente); ativação de receptores metabotrópicos por glutamato (*m-GluRs*); operação das ATPases e das bombas de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; atuação de canais passivos; abertura de canais operados por diferença de potencial elétrico (*CODP*) e abertura de canais transiente de potenciais (*TRPC*) estimulados pela molécula de interação estromal (*STIM*). No retículo estão presentes os receptores de IP_3 e rianodina (*RyRs*), os canais passivos e as ATPases.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

Munido dessas informações, pode-se descrever a interação entre astrócitos e neurônios durante a transmissão sináptica de forma bastante lógica. O potencial de ação, ao chegar ao terminal do axônio pré-sináptico, provoca liberação de glutamato e *ATP*, que ativa receptores no neurônio pós-sináptico. Algumas dessas moléculas também dirigem-se aos astrócitos e ativam seus receptores ionotrópicos, abrindo canais de Ca^{2+} na membrana celular. Outras moléculas de glutamato, por sua vez, ligam-se a receptores metabotrópicos dos astrócitos, estimulando a formação de IP_3 , que se desloca ao retículo endoplasmático, fazendo-o liberar Ca^{2+} no meio citosol. A somação de todos esses acontecimentos provoca o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} nos astrócitos,

o que os leva a liberarem glutamato e *ATP* no meio extracelular (BERRIDGE, 2014).

Além de se comunicarem com os neurônios, os astrócitos podem se comunicar entre si. Essa interação se dá a nível intracelular, quando as ondas de cálcio passam de uma célula a outra por junções comunicantes⁴; e intercelular, pela existência de mensageiros químicos tais como o ATP que, após serem liberados para o meio extracelular, propagam-se ao longo da rede de astrócitos gerando reações em cadeia (FIELDS e STEVENS-GRAHAM, 2000, 2002).

Embora muito já se tenha estudado a respeito da sinalização de cálcio nos astrócitos, a dúvida sobre sua real função no processamento da informação cerebral ainda permanece em aberto na comunidade científica.

Verkhrastky, Nedergaard e Hertz (2015) escreveram um artigo intitulado “por que os astrócitos são importantes?” e, dentre as várias respostas que propuseram a essa pergunta, não discutiram a possibilidade de modulação sináptica. Perea, Sur e Araque (2014), por sua vez, acreditam que, diante das características estruturais e funcionais dos astrócitos, somadas à sua posição estratégica, seria ingênuo ignorar a possibilidade de que essas células desempenhem um papel significativo no processamento da informação cerebral.

Agulhon *et al.* (2012) concluíram, a partir dos seus resultados experimentais, que astrócitos saudáveis não influenciam a transmissão sináptica. Navarrete *et al.* (2012), por sua vez, inferiram, após a análise de seus resultados, que os astrócitos estão relacionados à plasticidade sináptica, estando diretamente envolvidos no processamento de informação cerebral.

Volterra, Liaudet e Savtchouk (2014) dissertaram sobre a incapacidade de se adotar uma conclusão absoluta sobre o assunto em função dos discrepantes resultados experimentais disponibilizados na literatura. Os autores destacam ainda que essa divergência está associada, principalmente, à falta de equipamentos adequados para se analisar os diferentes fenômenos aos quais os astrócitos estão submetidos.

Vale lembrar que a conclusão absoluta sobre o papel dos astrócitos no processamento da informação cerebral provavelmente não será obtida a partir da análise da sinalização de cálcio em uma única

⁴As junções comunicantes correspondem a canais que conectam duas células distintas, permitindo a passagem de substâncias de uma a outra (ALBERTS *et al.*, 2008).

célula. A interação entre os astrócitos e a propagação desse sinal assume um papel essencial nessa discussão.

Diante dessa dúvida, resta-nos ou continuar esperando o avanço dos aparatos experimentais para que possamos saná-la ou utilizar uma proposta bastante promissora no cenário científico atual – a elaboração de modelos matemáticos. Vale lembrar, todavia, que a experimentação e a modelagem não andam dissociadas, e sim, são complementos uma da outra.

Como uma das questões chave para a compreensão da função dos astrócitos é a sinalização de cálcio, seria interessante a elaboração de um modelo matemático capaz de descrevê-la. A partir desse modelo, poderia se prever, posteriormente, suas consequências no processamento da informação cerebral.

Alguns modelos já foram propostos para a comunidade científica. Deste modo, far-se-á a revisão desses modelos, para que, posteriormente, se discuta as lacunas neles existentes.

2.5 MODELOS MATEMÁTICOS

Ao se elaborar um modelo matemático para determinado problema, diversas são as tomadas de decisões necessárias, uma vez que as mesmas determinarão as equações a serem utilizadas. Deste modo, para que se elabore um modelo que represente significativamente a realidade, é essencial a definição da geometria, dos fenômenos envolvidos, das variáveis e sua dependência funcional. Para a modelagem da sinalização de cálcio nos astrócitos, segue-se essa mesma lógica: a partir de considerações, os modelos são construídos e validados, corroborando ou refutando hipóteses inicialmente adotadas.

Discutir-se-á nesta seção os modelos matemáticos existentes na literatura para sinalização de cálcio nos astrócitos, suas conclusões e contribuições para a discussão sobre o papel dessas células no processamento da informação cerebral.

Alguns dos modelos matemáticos estudados não diferem muito uns dos outros, pois foram construídos sequencialmente, fazendo-se modificações dos anteriores. Por exemplo, os modelos de Postnov *et al.* (2009) e Amiri, Bahrami e Janahmadi (2011) são muitos semelhantes e baseiam-se no de Dupont e Goldbeter (1993). Os de Wade *et al.*, 2011 e Wu *et al.* (2014) baseiam-se no de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006). Assim, optou-se por priorizar o exemplo mais completo de cada caso e explicitar, quando necessário, as peculiaridades de um ou outro.

Deste modo, os modelos aqui destacados serão os de Postnov *et al.* (2009) e Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006). O modelo proposto por Höfer, Venance e Glaume (2002) também será discutido uma vez que o mesmo é o único que considera a célula heterogênea.

2.5.1 Geometria

Alguns modelos matemáticos propostos na literatura para a representação da sinalização de cálcio nos astrócitos não especificaram a geometria adotada, uma vez que a célula foi considerada homogênea e, portanto, sem variação espacial (AMIRI; BAHRAMI; JANAHMADI, 2011 e DUPONT; GOLDBETER, 1993 e POSTNOV *et al.*, 2009 e WADE *et al.*, 2011). Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) e Wu *et al.* (2014) também consideraram-na homogênea, todavia, propuseram que a célula poderia ser representada por uma geometria cúbica. Höfer, Venance e Glaume (2002) também consideraram que a célula correspondia a um cubo.

2.5.2 Variáveis e dependência funcional

Os modelos avaliados preocuparam-se em descrever a dinâmica da concentração de IP_3 citosólico e de Ca^{2+} tanto no citosol quanto no interior do retículo endoplasmático. Os modelos de Postnov *et al.* (2009) e Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), ao assumirem a célula como um domínio homogêneo, consideraram que as concentrações variavam somente ao longo do tempo. Höfer, Venance e Glaume (2002), por sua vez, assumiram que essas concentrações eram também funções da posição espacial nos eixos x e y .

A simplificação de que a variação espacial da concentração de cálcio é bidimensional e não tridimensional deve-se ao fato de os modelos terem sido validados com dados experimentais de células em cultura, todavia, sabe-se que a disposição dos astrócitos no sistema nervoso é muito mais complexa e a sinalização de cálcio pode se dar em todas as direções.

2.5.3 Fenômenos considerados e balanços de massa

A maioria dos modelos propostos na literatura assume que os seguintes fenômenos contribuem para a alteração da concentração citosólica de cálcio nos astrócitos: entrada de cálcio na célula através da membrana celular ($v_{entrada}$); liberação por parte do retículo

endoplasmático devido à atuação de segundos mensageiros ($v_{liberação}$) e saída através da membrana celular ($v_{saída}$). Os segundos mensageiros, por sua vez, participam dos seguintes fenômenos: produção pela ligação de neurotransmissores aos receptores metabotrópicos da membrana celular ($v_{PLC\beta}$), produção induzida por cálcio ($v_{PLC\delta}$) e degradação ($v_{degradação}$).

Outros fenômenos que são computados somente em alguns dos modelos são a atuação das bombas no retículo endoplasmático (v_{bomba}^{RE}), a existência de canais passivos no retículo ($v_{passivos}^{RE}$) e a passagem de compostos de uma célula a outra por junções comunicantes ($v_{junções}$).

A partir da consideração de cada autor a respeito dos fenômenos que incorporariam ou não em seus modelos, eles escreveram as equações que descreveriam a variação da concentração de cálcio e segundos mensageiros nos astrócitos.

2.5.3.1 Postnov *et al.* (2009)

Assumindo que os fenômenos mais importantes para a sinalização de cálcio nos astrócitos seriam a entrada e saída de cálcio pela membrana plasmática, liberação de cálcio pelo *RE* e passagem pelas junções comunicantes, os autores construíram a equação (1) para representar a dinâmica do cálcio nos astrócitos.

$$\tau_{Ca^{2+}} \frac{dC_{Ca^{2+}}}{dt} = v_{entrada} - v_{saída} + v_{liberação} + v_{junções} + D_a \xi(t) \quad (1)$$

O termo $D_a \xi(t)$ corresponde às possíveis perturbações no sistema e $\tau_{Ca^{2+}}$ à constante de tempo da dinâmica de cálcio.

A equação (2) descreve a dinâmica da concentração de IP_3 , uma vez que os autores consideraram que o mesmo é produzido somente pela ligação do glutamato ao receptor metabotrópico, é degradado no meio intracelular e atravessa as junções comunicantes.

$$\tau_{IP_3} \frac{dC_{IP_3}}{dt} = v_{PLC\beta} - v_{degradação} + v_{junções} \quad (2)$$

Na equação (2), τ_{IP_3} corresponde à constante de tempo da dinâmica de IP_3 .

Postnov *et al.* (2009) também descreveram a dinâmica da concentração de cálcio no retículo endoplasmático, dada pela equação (3), assumindo que sua variação se dava pela saída de cálcio através de canais abertos pelo IP_3 :

$$\varepsilon_c \tau_c \frac{dC_{Ca_{RE}^{2+}}}{dt} = f\left(C_{Ca_{cit}^{2+}}, C_{Ca_{RE}^{2+}}\right) \quad (3)$$

O parâmetro $\varepsilon_c \tau_c$ corresponde à constante de tempo da dinâmica de cálcio no retículo endoplasmático. A função $f\left(C_{Ca_{cit}^{2+}}, C_{Ca_{RE}^{2+}}\right)$ será descrita mais detalhadamente posteriormente.

O modelo desenvolvido por Postnov *et al.* (2009) apresenta uma diferença em relação aos demais, uma vez que descreve a consequência da sinalização de cálcio: a liberação de transmissores químicos no meio extracelular. As equações (4) e (5) descrevem a dinâmica do glutamato e ATP na fenda, dependendo da concentração intracelular de cálcio.

$$\tau_{GLU} \frac{dC_{GLU}}{dt} = \left(1 + \tanh\left(s_{GLU}\left(C_{Ca_{cit}^{2+}} - h_{GLU}\right)\right)\right) (1 - C_{GLU}) - \frac{C_{GLU}}{d_{GLU}} \quad (4)$$

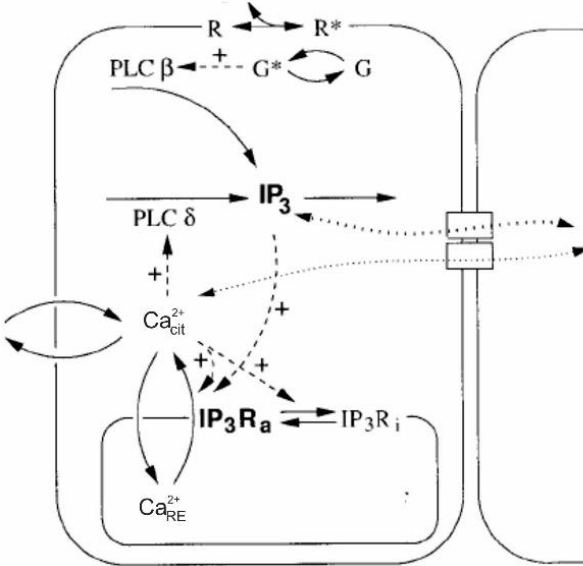
$$\tau_{ATP} \frac{dC_{ATP}}{dt} = \left(1 + \tanh\left(s_{ATP}\left(C_{Ca_{cit}^{2+}} - h_{ATP}\right)\right)\right) (1 - C_{ATP}) - \frac{C_{ATP}}{d_{ATP}} \quad (5)$$

Nas equações (4) e (5) os parâmetros τ_{GLU} e τ_{ATP} representam as constantes de tempo para liberação de glutamato e ATP , respectivamente. s_{GLU} e s_{ATP} são os parâmetros que controlam a velocidade de liberação do glutamato e ATP . h_{GLU} e h_{ATP} correspondem a concentração limiar de cálcio, a partir da qual glutamato e ATP são liberados na fenda. Os parâmetros d_{GLU} e d_{ATP} controlam a taxa de desativação de liberação do glutamato

2.5.3.2 Höfer, Venance e Glaume (2002)

Os principais fenômenos envolvendo a sinalização de cálcio nos astrócitos para Höfer, Venance e Glaume (2002) podem ser visualizados na figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática dos fenômenos considerados por Höfer, Venance e Glaume (2002) para a sinalização de cálcio nos astrócitos. **R** representa um receptor metabotrópico e **R*** este receptor no estado ativado. Os símbolos **G** e **G*** representam a proteína G desativada e ativada, respectivamente.



Fonte: adaptada de Höfer, Venance e Glaume (2002).

Esse modelo apresenta um aspecto diferenciado em relação aos demais modelos estudados uma vez que assume que o transporte de massa se dá por difusão no meio intracelular. Deste modo, suas equações resultantes para a dinâmica das concentrações de cálcio e IP_3 no citosol e de cálcio no RE podem ser descritas pelas equações (6), (7) e (8), respectivamente.

$$\frac{\partial C_{Ca_{cit}^{2+}}}{\partial t} = v_{liberação} - v_{bomba}^{RE} + v_{entrada} - v_{saída} + D_{Ca_{cit}^{2+}} \left(\frac{\partial^2 C_{Ca_{cit}^{2+}}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_{Ca_{cit}^{2+}}}{\partial y^2} \right) \quad (6)$$

$$\frac{\partial C_{IP_3}}{\partial t} = v_{PLC\beta} + v_{PLC\delta} - v_{degradação} + D_{IP_3} \left(\frac{\partial^2 C_{IP_3}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_{IP_3}}{\partial y^2} \right) \quad (7)$$

$$\frac{dC_{Ca_{RE}^{2+}}}{dt} = \frac{1}{\beta} (v_{bomba}^{RE} - v_{liberação}) \quad (8)$$

Na equação (8), β corresponde à relação entre o volume do retículo endoplasmático e o volume celular.

As condições de contorno para as equações (6) e (7) foram descritas matematicamente segundo a equação (9), que representa a passagem de cálcio e IP_3 através das junções comunicantes existentes entre astrócitos adjacentes.

$$-D_j \frac{dC_j}{du} \Big|_{u=u_L} = P_j (C_j|_{u=u_L^-} - C_j|_{u=u_L^+}), j = IP_3, Ca^{2+} \quad (9)$$

O parâmetro P_j corresponde à permeabilidade do cálcio ou do IP_3 através de junções comunicantes.

2.5.3.3 Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006)

As equações principais do modelo de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) se assemelham muito a de Höfer, Venance e Glaume (2002), pois consideram praticamente os mesmos fenômenos, conforme pode ser observado na figura 11. A principal diferença entre eles é que Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) não considera o transporte de massa por difusão e assume que há canais passivos na membrana do retículo endoplasmático.

As dinâmicas das concentrações intracelulares de cálcio e de IP_3 são descritas pelas equações (10) e (11), respectivamente:

$$\frac{dC_{Ca^{2+}_{cit}}}{dt} = v_{liberação} - v_{bomba}^{RE} + v_{passivos}^{RE} + v_{entrada} - v_{saída} \quad (10)$$

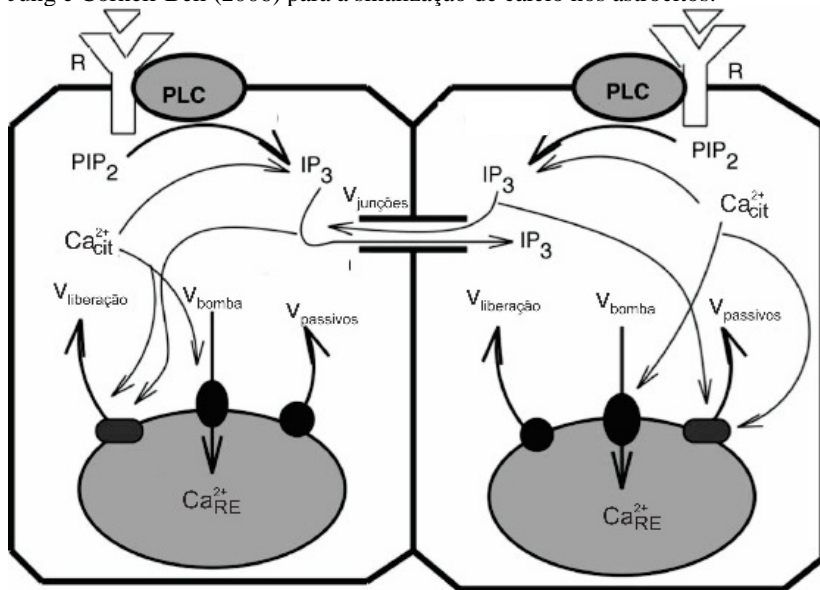
$$\frac{dC_{IP_3}}{dt} = v_{PLC\beta} + v_{PLC\delta} - v_{degradação} + v_{junções} \quad (11)$$

Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) assumiram que a concentração de cálcio do retículo endoplasmático poderia ser dada pela correlação descrita na equação (12).

$$C_{Ca^{2+}_{total}} = C_{Ca^{2+}_{cit}} + \beta C_{Ca^{2+}_{RE}} \quad (12)$$

Sendo $C_{Ca^{2+}_{total}}$ a concentração celular total de cálcio, mantida sempre constante, e β , a relação entre o volume do retículo e o volume do citosol celular.

Figura 11 - Representação esquemática dos fenômenos considerados por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) para a sinalização de cálcio nos astrócitos.



Fonte: adaptado de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006).

Uma das principais diferenças entre os modelos de Höfer, Venance e Glaume (2002) e Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) é que o primeiro considera o meio heterogêneo enquanto o segundo o assume como homogêneo. Uma das implicações diretas é que o modelo de daquele utiliza o fluxo através das junções comunicantes como condição de contorno, enquanto este o coloca na equação principal.

Vale ressaltar que, embora heterogêneo, o modelo de Höfer, Venance e Glaume (2002) coloca os fluxos locais (entradas e saídas que ocorrem em locais específicos da célula) como se ocorressem no domínio como um todo.

Uma vez descritas as equações principais dos modelos, as equações matemáticas que representam todos os fenômenos em cada uma delas podem ser apresentadas.

2.5.4 Descrição matemática dos fenômenos

As equações para cada fenômeno considerado nos três modelos serão aqui descritas. Vale ressaltar que a maioria delas apresenta

formulação absolutamente empírica, enquanto algumas outras apresentam caráter fenomenológico.

2.5.4.1 Entrada de cálcio no citosol através da membrana celular

O modelo proposto por Postnov *et al.* (2009) considera que o fluxo total de entrada de cálcio no citosol através da membrana plasmática é dado pela equação (13):

$$v_{entrada} = (r + \alpha(w_2 - w_2^*) + \delta C_{IP_3}) \quad (13)$$

O parâmetro r corresponde à corrente que constantemente atravessa a membrana celular. O termo $\alpha(w_2 - w_2^*)$ descreve a entrada de cálcio por canais dependentes da diferença de potencial resultantes da despolarização celular devido ao aumento da concentração de potássio. δ corresponde a outro parâmetro, que está relacionado à abertura de canais presentes na membrana celular ativados pelo IP_3 .

Amiri, Bahrami e Janahmadi (2011), que utilizaram a proposta de modelagem de Postnov *et al.* (2009), não computaram a contribuição da entrada de cálcio através dos canais dependentes de voltagem, pois entenderam que o mesmo não contribuía significativamente para a sinalização de cálcio nos astrócitos.

Os modelos de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) e Höfer, Venance e Glaume (2002) utilizaram outra equação para a entrada de cálcio através da membrana celular, aqui representada pela equação (14):

$$v_{entrada} = v_{contínuo} + V_{entrada} \frac{C_{IP_3}^2}{(k_{entrada}^2 + C_{IP_3}^2)} \quad (14)$$

A equação (14) foi construída empiricamente, assumindo a existência de uma corrente contínua para o interior da célula ($v_{contínuo}$) e uma corrente originada devido à abertura de canais pelo IP_3 na própria membrana celular. Esta última apresenta um valor máximo para o fluxo de entrada ($V_{entrada}$) e uma constante de saturação ($k_{entrada}$).

2.5.4.2 Saída de cálcio através da membrana plasmática

O termo de passagem de cálcio para o meio extracelular através da membrana plasmática é computado por Postnov *et al.* (2009) e está explicitado na equação (15).

$$v_{saída} = C_{Ca_{cit}^{2+}} \quad (15)$$

Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) e Höfer, Venance e Glaume (2002) utilizaram a mesma ideia de Postnov *et al.* (2009) para representação da saída de cálcio da célula, considerando que esse fluxo depende apenas da concentração intracelular de cálcio, conforme equação (16).

$$v_{saída} = k_5 C_{Ca_{cit}^{2+}} \quad (16)$$

2.5.4.3 Liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático

A equação (17), proposta por Postnov *et al.* (2009) para representar matematicamente a liberação de cálcio por parte do retículo endoplasmático, é uma correlação empírica que depende apenas da concentração de cálcio no citoplasma e no RE:

$$v_{liberação} = -c_4 f \left(C_{Ca_{cit}^{2+}}, C_{Ca_{RE}^{2+}} \right) \quad (17)$$

Sendo a função $f \left(C_{Ca_{cit}^{2+}}, C_{Ca_{RE}^{2+}} \right)$ dada pela equação (18):

$$f \left(C_{Ca_{cit}^{2+}}, C_{Ca_{RE}^{2+}} \right) = c_1 \frac{C_{Ca_{cit}^{2+}}^2}{1 + C_{Ca_{cit}^{2+}}^2} - \left(\frac{C_{Ca_{RE}^{2+}}^2}{1 + C_{Ca_{RE}^{2+}}^2} \right) \left(\frac{C_{Ca_{cit}^{2+}}^4}{c_2^4 + C_{Ca_{cit}^{2+}}^4} \right) - c_3 C_{Ca_{RE}^{2+}} \quad (18)$$

As constantes c_1 , c_2 , c_3 e c_4 são ajustadas empiricamente.

Höfer, Venance e Glaume (2002) utilizaram uma equação empírica para a liberação de cálcio, mas com fundamento fenomenológico, uma vez que corresponde a uma função de abertura do canal multiplicando o gradiente que motiva o transporte de massa. Essa formulação pode ser visualizada na equação (19):

$$v_{liberação} = \left[V_{contínuo} + V_{liberação} \frac{RC_{Ca_{cit}^{2+}}^2 C_{IP_3}^2}{\left(k_{Ca_{cit}^{2+}}^2 + C_{Ca_{cit}^{2+}}^2 \right) \left(k_{IP_3}^2 + C_{IP_3}^2 \right)} \right] \left(C_{Ca_{RE}^{2+}} - C_{Ca_{cit}^{2+}} \right) \quad (19)$$

Para Höfer, Venance e Glaume (2002), $V_{contínuo}$ corresponde à um fluxo constante que atravessa a membrana do retículo

endoplasmático; $V_{liberação}$ controla o fluxo de liberação de cálcio pelo retículo; R corresponde à concentração de receptores ativados pelo IP_3 ; $k_{Ca_{cit}^{2+}}$ e k_{IP_3} são as constantes de saturação por cálcio e IP_3 na ativação dos receptores de IP_3 .

Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) utilizaram uma equação baseada no formalismo de Hodgkin e Huxley para a representação da liberação de cálcio do retículo endoplasmático, dada pela equação (20). Esse formalismo consiste em estudar os canais iônicos de determinada membrana conjuntamente, e não individualmente. Isto é, um canal só pode estar aberto ou fechado. Não há meio termo. Por outro lado, quando se analisa todo o conjunto de canais, pode-se pensar em frações de canais abertos. Deste modo, a quantidade que estará aberta pode ser descrita por uma função de probabilidade, expressa nesse modelo pelo termo $m_\infty^3 n_\infty^3 h^3$ (LI; RINZEL, 1994).

$$v_{liberação} = \beta V_{liberação} m_\infty^3 n_\infty^3 h^3 \left[C_{Ca_{RE}^{2+}} - C_{Ca_{cit}^{2+}} \right] \quad (20)$$

β é a relação entre o volume do retículo endoplasmático e o volume celular e $m_\infty n_\infty$, que corresponde à ativação do canal, pode ser descrita pela equação (21):

$$m_\infty n_\infty = \frac{C_{IP_3}}{C_{IP_3} + d_1} \frac{C_{Ca_{cit}^{2+}}}{C_{Ca_{cit}^{2+}} + d_5} \quad (21)$$

E h , que representa a inativação do canal, é dado pela equação diferencial (22):

$$\frac{dh}{dt} = \frac{\frac{Q_2}{Q_2 + C_{Ca_{cit}^{2+}}} - h}{a_2 \left(Q_2 + C_{Ca_{cit}^{2+}} \right)} \quad (22)$$

Sendo que Q_2 é dado pela equação (23):

$$Q_2 = d_2 \left[\frac{C_{IP_3} + d_1}{C_{IP_3} + d_3} \right] \quad (23)$$

As constantes a_2 , d_1 , d_3 , d_5 são determinadas empiricamente.

2.5.4.4 Atuação da bomba do retículo endoplasmático

Os dois modelos que consideram a atuação da bomba do retículo endoplasmático são o de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) e Höfer, Venance e Glaume (2002). Este utiliza a equação (24), enquanto aquele a (25).

$$v_{bomba}^{RE} = V_{bomba} C_{Ca_{cit}^{2+}} \quad (24)$$

$$v_{bomba}^{RE} = V_{bomba} \frac{C_{Ca_{cit}^{2+}}^2}{\left(k_{sat}^2 + C_{Ca_{cit}^{2+}}^2\right)} \quad (25)$$

Ambas as equações dependem apenas da concentração citosólica de cálcio e estão associadas à uma constante, V_{bomba} , todavia, para Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), há um limite para a operação da bomba, controlado por k_{sat} .

2.5.4.5 Atuação dos canais passivos

O único modelo que prevê a atuação de canais passivos é o de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006). Sua proposta baseia-se na ideia que o fluxo através desses canais está associado à uma velocidade característica do canal, $V_{passivos}$, e ao gradiente entre a concentração de cálcio no *RE* e no citosol, conforme pode ser observado na equação (26).

$$v_{passivos} = \beta V_{passivos} \left(C_{Ca_{RE}^{2+}} - C_{Ca_{cit}^{2+}} \right) \quad (26)$$

β corresponde à relação entre o volume do retículo endoplasmático e o volume celular.

2.5.4.6 Produção do IP_3 mediada pela ligação do glutamato ao receptor metabotrópico

O modelo proposto por Postnov *et al.* (2009) computa a produção de IP_3 unicamente pela ligação do glutamato ao receptor metabotrópico. A equação que descreve essa produção está descrita na equação (27) e tem caráter exclusivamente empírico.

$$v_{PLC\beta} = \left(1 + \tanh\left(s_{IP_3}(z - h_{IP_3})\right)\right) (1 - C_{IP_3}) \quad (27)$$

Os autores consideraram que existe um limiar, h_{IP_3} , a partir do qual haverá produção de IP_3 . Eles também introduziram um parâmetro, z , que está associado à atividade dos neurônios vizinhos ao astrócito em questão. s_{IP_3} controla a velocidade de produção do IP_3 .

A equação proposta por Höfer, Venance e Glaume (2002) para a produção de IP_3 a partir da ligação do glutamato ao receptor metabotrópico dos astrócitos é constante e dada pela relação descrita na equação (28)

$$v_{PLC\beta} = v_8 \left[(1 + k_G) \left(\frac{k_G}{1 + k_G} + \alpha_0 \right) \right]^{-1} \alpha_0 \quad (28)$$

v_8 corresponde à velocidade de produção do IP_3 e k_G e α_0 são parâmetros do modelo ajustados pelos autores.

Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), por outro lado, consideraram que a produção de IP_3 depende da concentração de glutamato no meio extracelular e pode ser representada pela equação (29)

$$v_{PLC\beta} = v_g \frac{C_{GLU}^n}{k_g^n + C_{GLU}^n} \quad (29)$$

A equação (29) foi baseada na proposta de Hill, que desenvolveu equações que correlacionam o fluxo através de determinado canal com a concentração do ligante capaz de se acoplar ao seu receptor (WEISS, 1997). Esse fluxo tem um valor máximo, v_g , e um coeficiente n , que está relacionado às características estruturais do canal e à quantidade de ligantes necessárias para abri-lo.

2.5.4.7 Produção do IP_3 mediada pela concentração intracelular de cálcio

As equações propostas por Höfer, Venance e Glaume (2002) e Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) para a produção de IP_3 estimulada pelo aumento da concentração intracelular de cálcio são descritas pelas equações (30) e (31), respectivamente.

$$v_{PLC\delta} = v_7 \frac{C_{Ca^{2+}_{cit}}^2}{k_{Ca^{2+}}^2 + C_{Ca^{2+}_{cit}}^2} \quad (30)$$

$$v_{PLC\delta} = v_7 \left(\frac{C_{Ca^{2+}_{cit}} + (1 - \alpha)k_{Ca^{2+}}}{C_{Ca^{2+}_{cit}} + k_{Ca^{2+}}} \right) \quad (31)$$

As equações (30) e (31) indicam que há uma velocidade máxima para a produção de IP_3 induzida por cálcio (v_7) e um coeficiente de saturação ($k_{Ca^{2+}}$).

2.5.4.8 Degradação do IP_3

O modelo proposto por Postnov *et al.* (2009) e o de Höfer, Venance e Glaume (2002) consideram que a degradação do IP_3 depende apenas da concentração intracelular desse composto, e, deste modo, elas são muito semelhantes. Ambas podem ser visualizadas nas equações (32) e (33), respectivamente.

$$v_{degradação} = \frac{C_{IP_3}}{d_{IP_3}} \quad (32)$$

$$v_{degradação} = k_3 C_{IP_3} \quad (33)$$

A equação proposta por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) para a degradação do IP_3 é dada pela equação (34) e é diferente em relação às demais, pois considera que a degradação ocorre apenas enquanto a concentração de IP_3 está acima da concentração do regime estacionário ($C_{IP_3}^*$).

$$v_{degradação} = \frac{1}{\tau_r} [C_{IP_3} - C_{IP_3}^*] \quad (34)$$

2.5.4.9 Passagem de compostos através das junções comunicantes

Conforme já discutido anteriormente, Höfer, Venance e Glaume (2002) incorporam a passagem de compostos através das junções comunicantes como condição de contorno. Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) e Postonov *et al.* (2009), por sua vez, a incorporam na equação do

balanço de massa e a descrevem matematicamente segundo a equação (35).

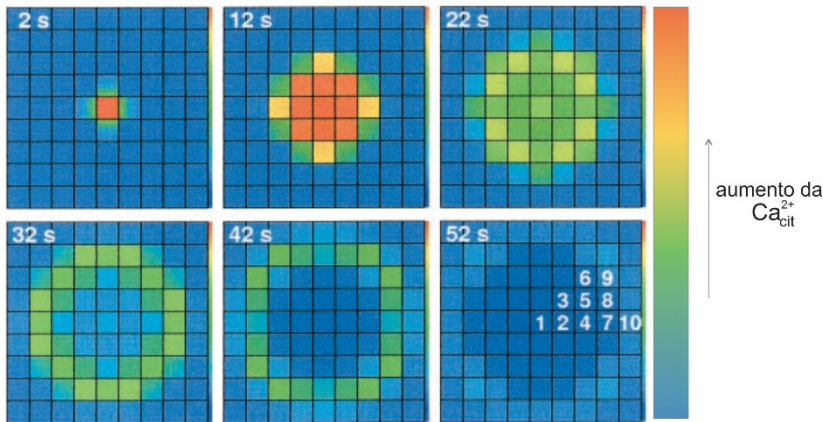
$$v_{junções} = \sum_i k [C_j|_i - C_j|_{i'}], j = IP_3, Ca^{2+} \quad (35)$$

É interessante ressaltar que, enquanto Höfer, Venance e Glaume (2002) e Postonov *et al.* (2009) assumem que tanto cálcio quanto IP_3 passam pelas junções, Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) consideram que esse fenômeno só é relevante para o IP_3 .

2.5.5 Contribuições dos modelos discutidos

O modelo de Höfer, Venance e Glaume (2002) conseguiu uma boa previsão teórica não somente da sinalização de cálcio em uma célula, mas da propagação desse sinal ao longo de uma rede, esquematizada na figura 12. Além disso, os autores concluíram que o principal componente a propagar o sinal através das junções comunicantes é o IP_3 .

Figura 12 - Resultados de Höfer, Venance e Glaume (2002) para a sinalização de cálcio se propagando ao longo de uma rede de astrócitos. Cada quadrado corresponde a uma célula.



Fonte: Höfer, Venance e Glaume (2002).

É interessante ressaltar que Höfer, Venance e Glaume (2002) não estavam preocupados com as consequências da onda de cálcio, mas sim com a verificação se os fenômenos considerados estavam adequados e

representavam a realidade. Nesse sentido, obtiveram um resultado positivo.

Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) conseguiram validar seus resultados de maneira satisfatória e corroboraram a hipótese que o IP_3 é o grande responsável pela propagação da sinalização de cálcio aos astrócitos vizinhos. Do mesmo modo que Höfer, Venance e Glaume (2002), esses autores estavam preocupados em descrever a sinalização de cálcio, e não em discutir seus efeitos.

Postnov *et al.* (2009), por outro lado, estavam preocupados com as consequências dessa sinalização e propagação do sinal. Os autores conseguiram resultados muito próximos aos experimentais e discutiram a existência da comunicação bidirecional entre astrócitos e neurônios, contudo, não defenderam a modulação da sinapse por parte dos astrócitos.

Amiri, Bahrami e Janahmadi (2011), a partir de seus resultados, concluíram que os astrócitos regulam a “intensidade” da sinapse e que, quando saudáveis, monitoram a atividade sináptica apropriadamente, atuando com um feedback adequado. Todavia, esses autores não estudaram os astrócitos em rede, e sim, individualmente.

2.5.6 Considerações gerais

Os modelos existentes na literatura para a sinalização de cálcio nos astrócitos, embora já tenham contribuído para a discussão do papel desempenhado por essas células no processamento da informação cerebral, ainda apresentam possibilidades de melhoria e discussão. Dentre elas, destaca-se a utilização de uma geometria mais plausível biologicamente, uma vez que essa célula é bastante irregular e o fato de ela contatar sinapses distantes do ponto em que o sinal foi iniciado pode ser uma das chaves para verificação da contribuição dos astrócitos na transmissão sináptica.

Outro ponto interessante é que, nos modelos apresentados na literatura, os fluxos de entrada e saída do fluido intracelular são computados no balanço de massa como se ocorressem em todo o domínio citosólico, todavia eles ocorrem em regiões específicas das células. Além disso, as equações que descrevem esses fluxos, em sua maioria, são de cunho empírico. Uma alternativa seria considerar os fluxos como condições de contorno e elaborar equações fenomenológicas que os descrevam.

Outra questão seria a realização de balanços de massa fenomenológicos para os compostos que são influenciados pela sinalização de cálcio, tais como *ATP* e glutamato. Estudar a forma e a

quantidade com que são liberados nas fendas sinápticas é outro aspecto para melhor compreensão da atuação dos astrócitos nas sinapses.

Vale ressaltar que a descrição de uma única célula muito provavelmente não permite a conclusão absoluta sobre o papel dos astrócitos no processamento da informação cerebral, uma vez que o todo, nesse caso, não é a soma das partes. Ou seja, quando se tem um conjunto em operação, ele corresponde a atuação de cada elemento em particular somado às interações entre eles. Todavia, ainda sim se faz necessária a compreensão da parte para que se faça inferências sobre o todo.

Nesse panorama, é fato que um modelo fenomenológico e plausível biologicamente, que represente uma única célula, mas que ela seja colocada nesse contexto de rede, contribuiria significativamente para a discussão atual sobre o papel dos astrócitos no processamento da informação. Deste modo, o presente trabalho visa preencher algumas dessas lacunas para contribuir à solução dessa questão.

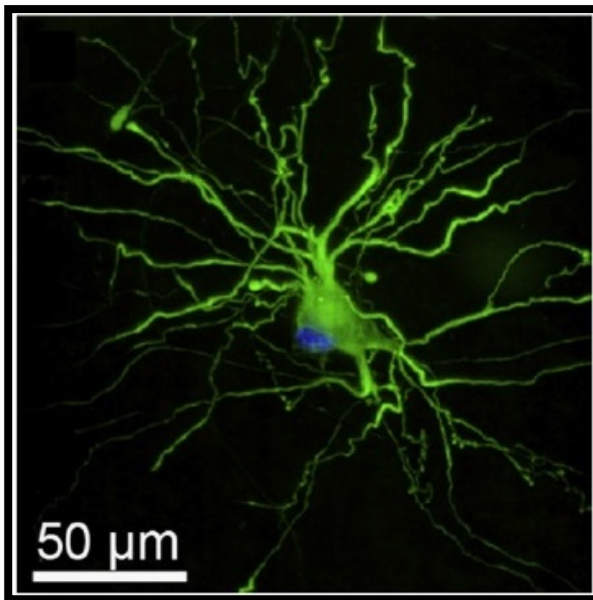
3 MODELAGEM MATEMÁTICA

Após a análise dos fenômenos físicos e biológicos envolvidos na sinalização de cálcio nos astrócitos, foi desenvolvido um modelo matemático com o intuito de descrever sua dinâmica. Este capítulo destina-se à exposição das hipóteses adotadas, das equações do modelo e suas condições de contorno.

3.1 GEOMETRIA

A figura 13 apresenta a estrutura do astrócito que inspirou a geometria utilizada no modelo.

Figura 13– Morfologia de um astrócito humano

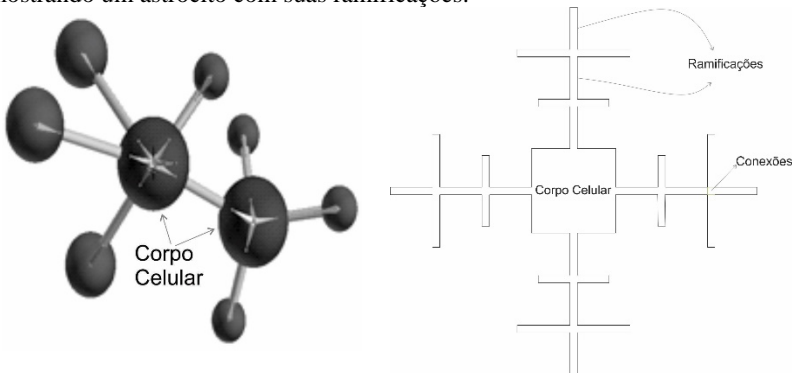


Fonte: Placone *et al.* (2015).

A morfologia real desta célula é bastante complexa e pode dificultar consideravelmente a elaboração do modelo matemático. Deste modo, a idealização de um corpo celular esférico contendo inúmeras ramificações cilíndricas é uma aproximação razoável da estrutura celular do astrócito e facilita a descrição matemática do domínio de cálculo. Por

outro lado, muitos dados são obtidos em experimentos com culturas de astrócitos semeados em monocamadas, resultando em uma distribuição bidimensional destas células. Para este caso, as geometrias esféricas e cilíndricas são inapropriadas, pois elas implicam na necessidade de variação em três direções espaciais. Deste modo, para o modelo bidimensional, propôs-se que tanto o corpo celular quanto as ramificações correspondem a prismas retangulares e que as ramificações são conectadas umas às outras por pequenos prismas retangulares, aqui denominados conexões. Exemplos das duas representações podem ser vistas na figura 14.

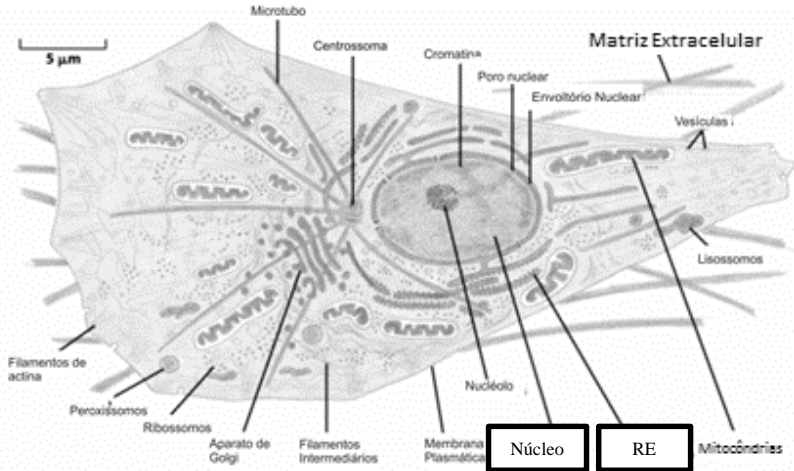
Figura 14 - Estruturas utilizadas para modelar redes de astrócitos. (a) tridimensional, mostrando corpos celulares de dois astrócitos. (b) bidimensional, mostrando um astrócito com suas ramificações.



Fontes: (a) Blender Artistis (2015), (b) desenvolvida pelo autor.

Além da geometria celular, é necessário definir a geometria do retículo endoplasmático, pois o mesmo é umas das peças chaves para a sinalização de cálcio. O retículo consiste em uma rede de tubos que envolve o núcleo celular, conforme ilustrado na figura 15. Dada sua complexidade estrutural para ser modelado de forma contínua e macroscópica, optou-se por uma simplificação que ainda mantivesse razoável significado biológico. Considerou-se o núcleo centralizado no corpo celular, cuja geometria corresponde a um prisma retangular, e o retículo endoplasmático envolvendo-o, seguindo o mesmo padrão geométrico.

Figura 15 - Desenho esquemático do interior de um astrócito. Os retículos contornam o núcleo celular, exigindo, para um modelo contínuo e macroscópico, uma simplificação estrutural.



Fonte: adaptado de Alberts *et al.* (2008).

3.2 VARIÁVEIS E DEPENDÊNCIA FUNCIONAL

A partir da revisão bibliográfica realizada, assumiu-se que as principais variáveis envolvidas na sinalização de cálcio nos astrócitos seriam as concentrações citoplasmáticas de IP_3 (C_{IP_3}) e de cálcio ($C_{Ca^{2+}_{cit}}$) e a concentração de cálcio no retículo endoplasmático ($C_{Ca^{2+}_{RE}}$).

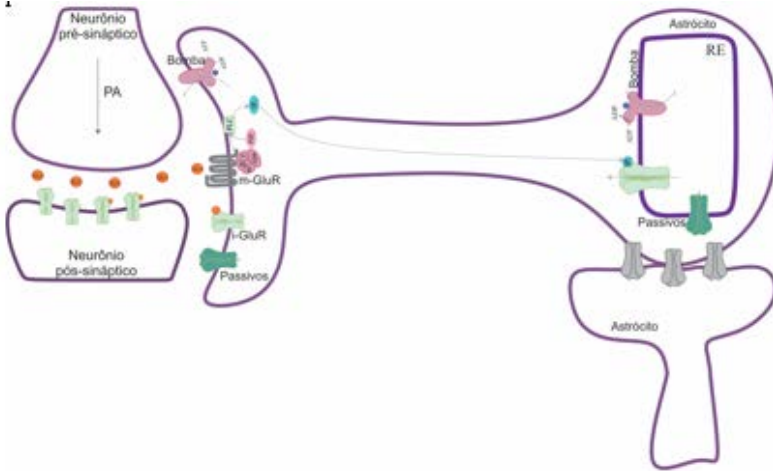
Considerou-se que o citosol não é homogêneo, ou seja, as variáveis em seu interior são funções de duas direções espaciais no modelo bidimensional: x e y . Além disso, essas variáveis são funções do tempo.

Em função da pequena espessura do retículo e sua distribuição uniforme em todas as direções do corpo celular, o interior do retículo endoplasmático foi considerado homogêneo, ou seja, as concentrações em seu interior não variam espacialmente, apenas ao longo do tempo.

3.3 FENÔMENOS E BALANÇO DE MASSA

Assumiu-se, para a elaboração do modelo matemático, que a sinalização de cálcio é influenciada pelos fenômenos ilustrados esquematicamente na figura 16.

Figura 16 - Esquema dos fenômenos considerados para o modelo matemático. Membrana celular - ativação dos *i* – *GluRs* e *m* – *GluRs*; passagem através de junções comunicantes; atuação da bomba e dos canais passivos. Retículo endoplasmático - abertura de canais pelo IP3; atuação da bomba e canais passivos.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

A partir da definição das variáveis e de sua dependência funcional, além da suposição dos fenômenos nos quais estão envolvidas, é possível construir as equações matemáticas que descrevem suas dinâmicas.

O modelo do presente trabalho baseia-se na propriedade de conservação da massa em determinado volume de controle (*V.C.*), que pode ser representada genericamente conforme a equação (36):

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Taxa de} \\ \text{aumento} \\ \text{de massa} \\ \text{no V.C.} \end{array} \right\} = \left\{ \begin{array}{l} \text{Taxa de} \\ \text{entrada} \\ \text{de massa} \\ \text{no V.C.} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Taxa de} \\ \text{saída de} \\ \text{massa} \\ \text{no V.C.} \end{array} \right\} + \left\{ \begin{array}{l} \text{Taxa de} \\ \text{geração ou} \\ \text{consumo} \\ \text{de massa} \\ \text{no V.C.} \end{array} \right\} \quad (36)$$

O fluido citoplasmático e o RE apresentam diferentes volumes de controle, o que resultará em equações distintas para cada um deles, como poderá ser observado nos itens a seguir.

3.3.1 Fluido Citoplasmático – Ca^{2+} e IP_3

O fluido citoplasmático, ou citosol, preenche uma grande parcela dos astrócitos, desde os prolongamentos até o corpo celular, contornando estruturas tais como o núcleo, o aparato de Golgi e o retículo endoplasmático. Ele é formado por uma solução aquosa, composta principalmente por proteínas, sais minerais e açúcares. A solução forma um meio coloidal, semifluido, no qual estão suspensas organelas e outras estruturas que dificultam a movimentação livre dos íons e das moléculas. Neste meio, o principal mecanismo de transferência de massa é o difusivo (STANFIELD, 2013 e HÖFER; VENANCE; GLAUME, 2002).

Em função da variação espacial existente no citosol, os fluxos ilustrados na figura 16 não influenciam todos os volumes de controle, ou seja, eles contribuem apenas àqueles que estão nos contornos do domínio. Deste modo, não são computados no balanço de massa, e sim como condições de contorno.

Após essas considerações, é possível traduzir genericamente a equação (36) à linguagem matemática, expressando-a em termos molares, conforme a equação (37) (BIRD *et al.*, 2012):

$$\frac{\partial C_j}{\partial t} = \nabla^2(D_j C_j) + \sum v_j \quad (37)$$

Sendo que v_j corresponde a qualquer fenômeno de produção ou degradação do componente j que ocorra no volume de controle.

Além disso, é razoável assumir que a difusividade não varia espacialmente. Deste modo, a equação (37) é reescrita, dando origem à equação (38), que descreve a dinâmica tanto da concentração citosólica de IP_3 quanto de Ca^{2+} nos astrócitos:

$$\frac{\partial C_j}{\partial t} = D_j \nabla^2(C_j) + \sum v_j \quad (38)$$

Para o modelo bidimensional, o corpo celular, as ramificações e as conexões são prismas retangulares. Consequentemente, utilizou-se coordenadas cartesianas para ambas as regiões e, deste modo, a dinâmica das concentrações em seu interior pode ser descrita pela equação (39):

$$\frac{\partial C_j}{\partial t} = D_j \frac{\partial^2 C_j}{\partial x^2} + D_j \frac{\partial^2 C_j}{\partial y^2} + \sum v_j \quad (39)$$

O cálcio e o IP_3 não apresentam nenhum fenômeno de produção ou degradação no volume de controle, ou seja, $\sum v_{Ca_{cit}^{2+}} = \sum v_{IP_3} = 0$.

3.3.2 Retículo endoplasmático – Ca^{2+}

O retículo endoplasmático, diferentemente do citosol, é homogêneo e, portanto, as variáveis em seu interior são independentes da posição. A implicação direta dessa consideração é que os fluxos nele considerados, embora aconteçam nos contornos, são computados no balanço de massa.

Deste modo, a equação que descreve o perfil de concentração em seu interior é dada pela equação (40)

$$V_{RE} \frac{dC_{Ca_{RE}^{2+}}}{dt} = \sum v_{Ca_{RE}^{2+}} \quad (40)$$

Sendo que $\sum v_{Ca_{RE}^{2+}}$ corresponde ao somatório dos fluxos que contribuem para a variação mássica do cálcio no retículo endoplasmático. O modelo proposto nesse trabalho considera que a variação da concentração de cálcio no RE depende da atuação das bombas e canais passivos, assim como da abertura de canais pelo IP_3 . Sendo assim, a equação (40) é reescrita conforme a equação (41).

$$V_{RE} \frac{dC_{Ca_{RE}^{2+}}}{dt} = v_{bomba}^{RE} - v_{passivos}^{RE} - v_{liberação} \quad (41)$$

Agora, tendo o balanço para todas as regiões e componentes, pode-se elencar as equações que compõem o modelo matemático da sinalização de cálcio nos astrócitos para o modelo bidimensional (quadro 1).

Quadro 1 - Lista das equações do modelo que visa descrever a dinâmica do cálcio nos astrócitos.

Variáveis	Balço de massa
IP_3	$\frac{\partial C_{IP_3}}{\partial t} = D_{IP_3} \left\{ \frac{\partial^2 C_{IP_3}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_{IP_3}}{\partial y^2} \right\} \quad (42)$
Ca_{cit}^{2+}	$\frac{\partial C_{Ca_{cit}^{2+}}}{\partial t} = D_{Ca_{cit}^{2+}} \left\{ \frac{\partial^2 C_{Ca_{cit}^{2+}}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_{Ca_{cit}^{2+}}}{\partial y^2} \right\} \quad (43)$
Ca_{RE}^{2+}	$V_{RE} \frac{dC_{Ca_{RE}^{2+}}}{dt} = v_{bomba}^{RE} - v_{passivos}^{RE} - v_{libera\c{c}ao} \quad (44)$

Tendo discutido os modelos, torna-se necessário definir as condioes de contorno para as equaoes (42) e (43). Como as condioes de contorno envolvem equaoes específicas para os diferentes fenômenos envolvidos na sinalizaao de cálcio (ativaao de receptores, passagem de Ca^{2+} através de canais, produao e degradaao do IP_3), estas serão descritas antes de se discutir aquelas. Além disso, os termos $v_{libera\c{c}ao}$, v_{bomba}^{RE} e $v_{passivos}^{RE}$, presentes na equaao (44), devem ser especificados.

3.4 FLUXOS DE CÁLCIO NAS MEMBRANAS

3.4.1 Fluxo de cálcio através das bombas

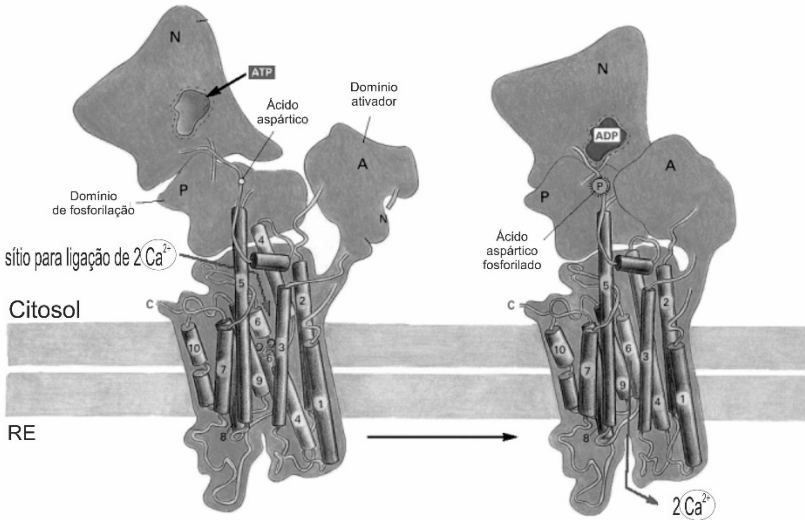
Dentre as propostas apresentadas na literatura para descrever o fluxo de cálcio resultante da aao das bombas na membrana do RE, a de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), explicitada na equaao (45), se destaca pela sua coerência com relaao ao fenômeno em questão.

$$v_{bomba}^{RE} = k_{bomba}^{RE} \frac{C_{Ca_{cit}^{2+}}^2}{k_{bomba}^{sat} + C_{Ca_{cit}^{2+}}^2} \quad (45)$$

A equaao (45) foi construída a partir do raciocínio que a concentraao de cálcio intracelular estimula a operaao da bomba, mas há um limite físico para isto, a partir do qual a bomba não depende mais dessa concentraao. Deste modo, há uma constante de saturaao, k_{bomba}^{sat} . O expoente da concentraao  2, uma vez que esse tipo de bomba

transporta dois íons de Ca^{2+} simultaneamente, conforme pode ser observado na figura 17.

Figura 17 - Esquema ilustrando o mecanismo de funcionamento das bombas de Ca^{2+} .



Fonte: Adaptada de Alberts *et al.* (2002).

A equação (45) foi proposta para um modelo homogêneo, sendo incorporada, portanto, à equação do balanço de massa. Por outro lado, no presente trabalho, o fluxo através das bombas fará parte das condições de contorno, o que implica na necessidade de se fazer uma pequena adaptação da equação (45), cujo resultado pode ser observado na equação (46).

$$v_{bomba}^{RE} = A_{canais}^{bomba,RE} k_{bomba}^{RE} \frac{C_{Ca_{cit}^{2+}}^2}{k_{bomba}^{sat} + C_{Ca_{cit}^{2+}}^2} \quad (46)$$

A área ocupada pelas bombas na membrana do retículo endoplasmático, $A_{canais}^{bomba,RE}$, é constante e dada pela equação (47). A incorporação dessa área à equação implica na mudança das dimensões do parâmetro k_{bomba}^{RE} , que agora será expresso em termos de massa por área por tempo.

$$A_{canais}^{bomba,RE} = f_{\acute{a}rea}^{bomba,RE} \acute{A}rea \quad (47)$$

Sendo que "*Área*" corresponde à área perpendicular à direção em que ocorre o fluxo.

Os modelos encontrados na literatura, tais como o de Höfer, Venance e Glaume (2002) e Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), embora tenham considerado a existência de um fluxo de saída de cálcio através da membrana celular, não especificaram o fenômeno ao qual está associado. Todavia, é fato que as bombas estão presentes na membrana citoplasmática e são responsáveis pela restauração da concentração de equilíbrio de cálcio no fluido intracelular (VERKHRATSK; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2012). Deste modo, sua atuação será levada em conta no presente modelo.

A equação que descreve o fluxo de saída de cálcio em função da atuação das bombas na membrana celular é análoga à equação para as bombas do *RE*, uma vez que apresentam o mesmo mecanismo de funcionamento. Após essa consideração, é possível escrever a equação (48), que descreve o fluxo de cálcio decorrente da atuação das bombas na membrana celular.

$$v_{bomba}^{membrana} = A_{canais}^{bomba,membrana} k_{bomba}^{membrana} \frac{C_{Ca_{cit}^{2+}}^2}{k_{bomba}^{sat} + C_{Ca_{cit}^{2+}}^2} \quad (48)$$

A área ocupada pelas bombas na membrana celular é dada pela equação (49).

$$A_{canais}^{bomba,membrana} = f_{\acute{a}rea}^{bomba,membrana} \acute{A}rea \quad (49)$$

3.4.2 Fluxo de cálcio através dos canais passivos

A equação que representa o fluxo de cálcio através dos canais passivos presentes na membrana do *RE* foi inspirada na equação de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), explicitada na equação (50).

$$v_{passivos}^{RE} = \beta V_{passivos} (C_{Ca_{RE}^{2+}} - C_{Ca_{cit}^{2+}}) \quad (50)$$

Foi necessária uma adaptação da equação (50), utilizada pelos autores no balanço de massa, para que pudesse ser computada no modelo deste trabalho como condição de contorno. Essa adaptação baseou-se no fato que o fluxo através dos canais passivos depende da área ocupada pelos canais na membrana do RE, de um coeficiente de transferência de massa e de um gradiente, conforme pode ser observado na equação (51).

$$v_{passivos}^{RE} = A_{canais}^{passivos,RE} h_{passivos}^{RE} \left(C_{Ca_{RE}^{2+}} - C_{Ca_{cit}^{2+}} \right) \quad (51)$$

A área de canais passivos na membrana do RE é dada pela equação (52).

$$A_{canais}^{passivos,RE} = f_{\acute{a}rea}^{passivos,RE} \acute{A}rea \quad (52)$$

Para a membrana celular, todos os modelos descritos na revisão bibliográfica consideram que há uma corrente constante de entrada de cálcio na célula. Todavia, sabe-se que essa corrente deve-se a atuação de canais passivos tais como os existentes no retículo. Deste modo, o fluxo através desses canais pode ser descrito por uma equação análoga à equação (51), que pode ser visualizada na equação (53).

$$v_{passivos}^{membrana} = A_{canais}^{passivos,membrana} h_{passivos}^{membrana} \left(C_{Ca_{fenda}^{2+}} - C_{Ca_{cit}^{2+}} \right) \quad (53)$$

A área de canais passivos na membrana celular é dada pela equação (54).

$$A_{canais}^{passivos,membrana} = f_{\acute{a}rea}^{passivos,membrana} \acute{A}rea \quad (54)$$

3.4.3 Fluxo de cálcio através dos canais abertos pelo IP_3

A complexidade envolvida nos processos de abertura e fechamento de canais iônicos dificulta a descrição matemática do fluxo de cálcio que atravessa os canais ativados pelo IP_3 . Algumas propostas que já foram apresentadas na literatura serão discutidas e, posteriormente, a equação sugerida no presente trabalho para descrição deste fenômeno será explicitada.

Os trabalhos mais relevantes a serem discutidos, dentre eles o de Maio (2008), Li e Rinzell (1994) e Means *et al.* (2006), apresentam formulações semelhantes uma vez que consideram que o fluxo depende

de um coeficiente de transferência de massa, de uma função que descreve a abertura ou o fechamento dos canais e de um gradiente concentração, conforme pode ser observado na equação (55).

$$v_{liberação} = \left\{ \begin{array}{l} \text{função de} \\ \text{abertura e} \\ \text{fechamento} \end{array} \right\} \{coeficiente\} (C_{Ca_{RE}^{2+}} - C_{Ca_{cit}^{2+}}) \quad (55)$$

O principal desafio para a descrição matemática da abertura e fechamento dos canais iônicos reside no fato de cada canal apresentar sua própria dinâmica. Essa característica traz duas possibilidades com relação à forma como o fenômeno pode ser analisado: individual, considerando a dinâmica de cada canal e, deste modo, o conjunto corresponderia à soma de todos eles; ou global, assumindo que o comportamento do conjunto de canais pode ser descrito por uma função. Means *et al.* (2006) optaram pela primeira abordagem, enquanto Maio (2008) e Li e Rinzel (1994) optaram pela segunda.

Para Means *et al.* (2006), que avaliaram a dinâmica de cada canal independentemente, só existem dois estados possíveis para os canais: fechado (1) ou aberto (0). Deste modo, propuseram a função descrita na equação (56), que representa a quantidade de canais abertos ao somar o estado em que cada um deles se encontra.

$$\begin{aligned} \text{número de} \\ \text{canais abertos} = \sum_{i=1}^{N_{\text{canais}}} \frac{1}{2} \{1 + \tanh[(t - t_{\text{abertura}}^i) \eta]\} - \\ \frac{1}{2} \{1 + \tanh[(t - t_{\text{fechamento}}^i) \eta]\} \end{aligned} \quad (56)$$

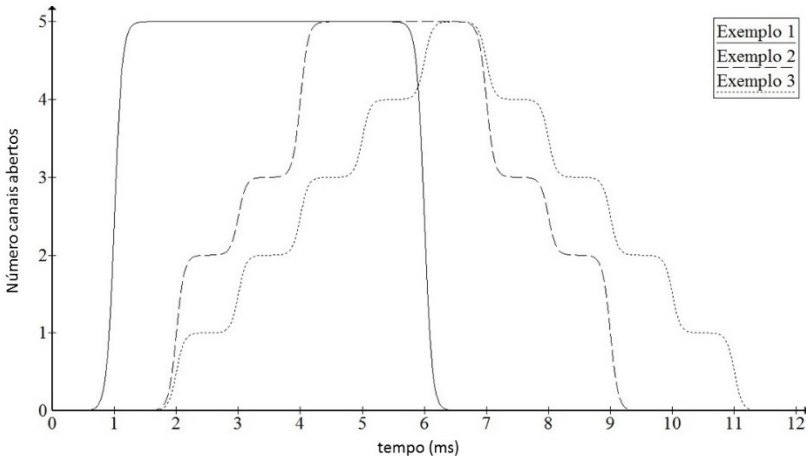
t_{abertura}^i corresponde ao momento em que o canal passa a permitir o fluxo e iônico e, $t_{\text{fechamento}}^i$, o momento em que esse fluxo cessa. η controla o formato da tangente hiperbólica. A figura 18 ilustra o funcionamento da equação (56) em três situações hipotéticas para 5 canais. O quadro 2 apresenta os tempos de abertura e fechamento de cada canal para cada uma das três possibilidades analisadas.

Quadro 2 - Tempos de abertura e fechamento para três situações hipotéticas com 5 canais, em ms.

Canal i	Exemplo 1		Exemplo 2		Exemplo 3	
	$t_{abertura}^i$	$t_{fechamento}^i$	$t_{abertura}^i$	$t_{fechamento}^i$	$t_{abertura}^i$	$t_{fechamento}^i$
1	1	6	2	7	2	7
2	1	6	2	7	3	8
3	1	6	3	8	4	9
4	1	6	4	9	5	10
5	1	6	4	9	6	11

Fonte: desenvolvido pelo autor.

Figura 18 - Números de canais abertos em função do tempo para três situações hipotéticas utilizando o modelo de Means *et al.* (2006) e $\eta = 8$.

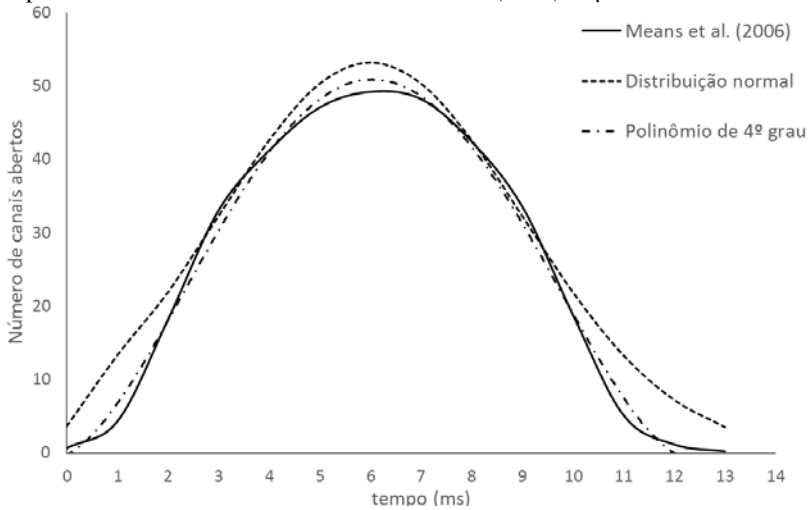


Fonte: desenvolvida pelo autor.

A partir do quadro 2, constata-se o principal inconveniente com relação à utilização do modelo de Means *et al.* (2006): a grande quantidade de parâmetros decorrentes da necessidade de se saber o momento exato de abertura e fechamento de cada canal. Por esse motivo, a equação (56) não será incorporada ao modelo deste trabalho.

Mesmo não utilizando-a, pode-se extrair uma informação bastante pertinente a partir da equação (56). Quando aplicada a um grande número de canais abrindo e fechando em momentos distintos, essa equação permite concluir que a quantidade de canais abertos ao longo do tempo pode ser aproximada por uma função contínua, como pode ser observado na figura 19.

Figura 19 - Números de canais abertos em função do tempo para 50 canais hipotéticos utilizando o modelo de Means *et al.* (2006) e $\eta=8$.



Fonte: desenvolvida pelo autor

Baseado nessa característica, Maio (2008) propôs a equação (57), que indica a fração de canais abertos ao longo do tempo, a fim de representar a dinâmica de um conjunto de canais:

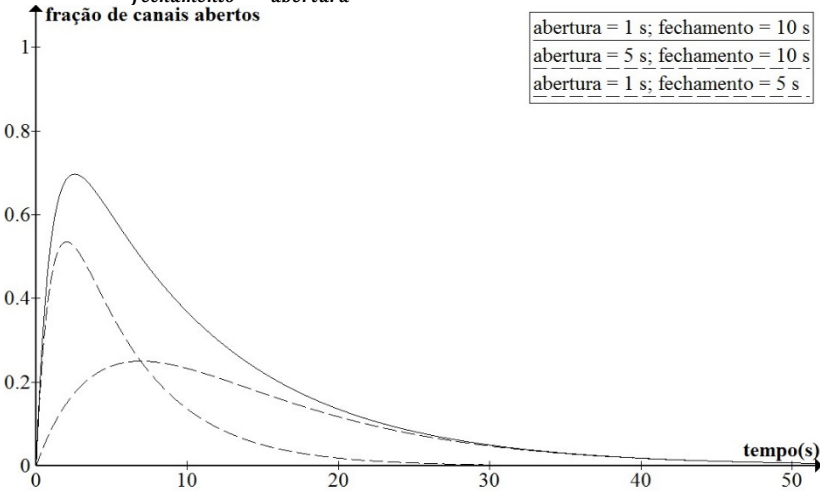
$$\text{fração de canais abertos} = e^{-\frac{t}{t_{\text{fechamento}}}} - e^{-\frac{t}{t_{\text{abertura}}}} \quad (57)$$

$t_{\text{fechamento}}$ é um parâmetro que regula o decaimento da função e, t_{abertura} , a ascensão.

A necessidade de apenas dois parâmetros torna a equação (57) significativamente mais viável quando comparada à de Means *et al.* (2006). Seu comportamento pode ser observado na figura 20.

Embora a equação de Maio (2008) seja mais conveniente quando as informações sobre os canais são limitadas, ela não é fenomenológica. O modelo de Li e Rinzel (1994), por sua vez, é baseado nos fenômenos envolvidos na abertura e fechamento dos canais, tornando-se mais adequado para a proposta do presente trabalho.

Figura 20 - Comportamento da curva proposta por Maio (2008) para diferentes valores de $t_{fechamento}$ e $t_{abertura}$.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

A equação resultante das hipóteses estabelecidas por Li e Rinzel (1994) pode ser observada na equação (58).

$$\text{fração de canais abertos} = \left[\frac{C_{IP_3}}{C_{IP_3} + d_1} \right] \left[\frac{C_{Ca_{cit}^{2+}}}{C_{Ca_{cit}^{2+}} + d_5} \right] h \quad (58)$$

h , que representa a inativação do canal, é dado pela equação diferencial (59):

$$\frac{dh}{dt} = \frac{\frac{Q_2}{Q_2 + C_{Ca_{cit}^{2+}}} - h}{a_2 (Q_2 + C_{Ca_{cit}^{2+}})} \quad (59)$$

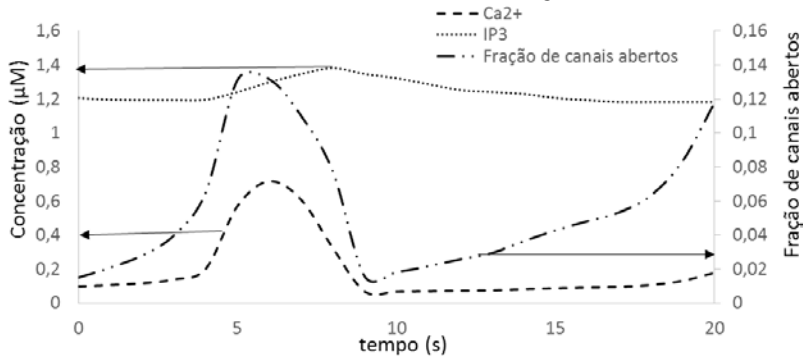
Sendo que Q_2 é dado pela equação (60):

$$Q_2 = d_2 \left[\frac{C_{IP_3} + d_1}{C_{IP_3} + d_3} \right] \quad (60)$$

As constantes a_2 , d_1 , d_3 , d_5 são determinadas empiricamente.

Para ilustrar o funcionamento da equação (58), extraiu-se os dados das concentrações de Ca^{2+} e IP_3 obtidas por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), que utilizaram a equação de Li e Rinzel (1994), e, a partir desses valores obteve-se a curva da fração de canais abertos ao longo do tempo, cujo comportamento pode ser observado na figura 21.

Figura 21 - Fração de canais abertos ao longo do tempo utilizando o modelo de Li e Rinzel (1994) com base nos dados de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006).



Fonte: desenvolvida pelo autor.

Pelo fato de o modelo de Li e Rinzel (1994) ser fenomenológico, ele pode ser utilizado apenas para receptores ativados por IP_3 . Uma analogia poderia ser feita para receptores ativados por outros compostos, todavia, a quantidade de parâmetros que precisariam ser estipulados passaria a ser significativa, tornando essa alternativa questionável. Deste modo, optou-se por desenvolver uma equação que combine os modelos anteriormente discutidos, mantendo parte da fenomenologia, mas garantindo generalidade.

As considerações realizadas para a proposta da equação é que a área de canais abertos é uma função que incorpora diversos elementos: a função de abertura do canal, que depende do composto que ativa os canais; a função que corresponde à dinâmica de fechamento do canal, com dependência apenas do tempo; a área máxima desse tipo de canal, que corresponde ao produto entre a área analisada e a fração dessa área ocupada pelos canais em questão. Toda essa frase aplicada aos canais ativados por IP_3 , traduzida à linguagem matemática, pode ser escrita conforme a equação (61).

$$A_{\text{canais}}^{\text{liberação}} = g_{IP_3}(C_{IP_3})f_{IP_3}(t)f_{\text{área}}^{\text{liberação}}Área \quad (61)$$

O produto $g_{IP_3}(C_{IP_3})f_{IP_3}(t)$ deve ter um comportamento semelhante à curva da fração de canais abertos da figura 21. Esse perfil pode ser obtido a partir da proposição de uma função de abertura crescente e uma de fechamento decrescente. Retomando a ideia de Maio (2008), supõem-se também que essas funções podem ser exponenciais, ambas variando de 0 a 1.

Após essa análise, propõem-se a função $g_{IP_3}(C_{IP_3})$, dada pela equação (62). Vale ressaltar que essa função é válida somente enquanto a concentração de IP_3 for igual ou superior à concentração do regime estacionário ($C_{IP_3}^*$). Quando isso não ocorrer, a função $g_{IP_3}(C_{IP_3})$ assume o valor zero.

$$g_{IP_3}(C_{IP_3}) = \begin{cases} 1 - \frac{1}{e^{[k_{abertura}^{IP_3}(C_{IP_3} - C_{IP_3}^*)]}} , & \text{para } (C_{IP_3} - C_{IP_3}^*) \geq 0 \\ 0 & , \text{para } (C_{IP_3} - C_{IP_3}^*) < 0 \end{cases} \quad (62)$$

A função $f_{IP_3}(t)$, que descreve a dinâmica de fechamento, pode ser dada pela equação (63). Ela assume o valor zero durante um curto intervalo de tempo em função de a célula apresentar um período refratário.

$$f_{IP_3}(t) = \begin{cases} 1 - \frac{1}{e^{\left\{ k_{tempo}^{IP_3} \left[\left(t_{fechamento}^{IP_3} + t_{oscilação} \cdot \text{int} \left(\frac{t}{t_{oscilação}} \right) \right) - t \right] \right\}}} , & \text{para } t < t_{fechamento}^{IP_3} \\ 0, & \text{para } t \geq t_{fechamento}^{IP_3} \end{cases} \quad (63)$$

$t_{fechamento}^{IP_3}$ corresponde ao intervalo de tempo, a partir do momento de abertura, necessário para o fechamento de todos os canais ativados por IP_3 e, $t_{oscilação}$, ao período dos ciclos de abertura e fechamento.

Vale destacar que a curva de abertura proposta na equação (62) funciona bem para o 1º ciclo. A partir do segundo, caso a C_{IP_3} não retorne ao valor do regime estacionário, a curva de abertura não iniciará em zero. Deste modo, adaptou-se esta equação a fim de que ela comece em zero a cada ciclo, incorporando uma função muito semelhante àquela de fechamento. A função de abertura, após a adaptação, passa a ser descrita pela equação (64).

$$g_{IP_3}(C_{IP_3}) = \left\{ 1 - \frac{1}{e^{[k_{abertura}^{IP_3}(C_{IP_3} - C_{IP_3}^*)]}} \right\} \left\{ 1 - \frac{1}{e^{(t - t_{oscilação})}} \right\} , \text{para } (C_{IP_3} - C_{IP_3}^*) \geq 0 \quad (64)$$

Finalmente, a equação que representa o fluxo de liberação de cálcio através de canais presentes na membrana do retículo endoplasmático é dada pela equação (65).

$$v_{liberação} = A_{canais}^{liberação} h_{liberação} \left(C_{Ca_{RE}^{2+}} - C_{Ca_{cit}^{2+}} \right) \quad (65)$$

3.4.4 Fluxo de cálcio através de canais abertos a partir da ativação de receptores ionotrópicos de glutamato

A equação (66), que representa o fluxo de entrada de cálcio através da membrana celular a partir da ativação de receptores ionotrópicos pelo glutamato, é análoga à equação para os canais ativados por IP_3 .

$$v_{entrada} = A_{canais}^{GLU} h_{ionotrópicos} \left(C_{Ca_{fenda}^{2+}} - C_{Ca_{cit}^{2+}} \right) \quad (66)$$

A área de canais abertos ao longo do tempo, A_{canais}^{GLU} , foi construída de forma análoga à $A_{canais}^{liberação}$, considerando que depende da função de abertura do canal, da função de fechamento e da área máxima desse tipo de canal. Deste modo, a A_{canais}^{GLU} pode ser representada pelo equação (67).

$$A_{canais}^{GLU} = g_{GLU}(C_{GLU}) f_{GLU}(t) f_{área}^{GLU} \quad (67)$$

A função $g_{GLU}(C_{GLU})$, que descreve a abertura do canal, pode ser dada pela equação (68). Vale ressaltar que essa função é válida somente enquanto a concentração de glutamato for igual ou superior à concentração do regime estacionário. Quando isso não ocorrer, a função $g_{GLU}(C_{GLU})$ assume o valor zero.

$$g_{GLU}(C_{GLU}) = \begin{cases} 1 - \frac{1}{e^{[k_{abertura}^{GLU}(C_{GLU} - C_{GLU}^*)]}} \left\{ 1 - \frac{1}{e^{(t - t_{oscilação})}} \right\}, & \text{para } (C_{GLU} - C_{GLU}^*) \geq 0 \\ 0, & \text{para } (C_{GLU} - C_{GLU}^*) < 0 \end{cases} \quad (68)$$

C_{GLU}^* corresponde a concentração de glutamato na fenda do regime estacionário.

A função $f_{GLU}(t)$, que descreve a dinâmica de fechamento, pode ser dada pela equação (69).

$$f_{GLU}(t) = \begin{cases} 1 - \frac{1}{e^{\left\{k_{tempo}^{GLU} \left[\left(t_{fechamento}^{GLU} + t_{oscilacao} * \text{int} \left(\frac{t}{t_{oscilacao}} \right) - t \right] \right) \right\}}}, & \text{para } t < t_{fechamento}^{GLU} \\ 0, & \text{para } t \geq t_{fechamento}^{GLU} \end{cases} \quad (69)$$

$t_{fechamento}^{GLU}$ corresponde ao tempo em que os receptores ionotrópicos de glutamato estarão totalmente fechados.

3.5 FLUXOS DE PRODUÇÃO E DEGRADAÇÃO DE IP_3

3.5.1 Produção de IP_3

O IP_3 é produzido devido ao acoplamento do glutamato ao receptor metabotrópico na membrana celular. Além disso, sua produção depende da concentração de cálcio intracelular, pois o mesmo mantém a ativação da proteína efetora. Uma das propostas existentes na literatura que computa esses dois fenômenos é a de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), apresentada na equação (70).

$$v_{produção} = v_g \frac{C_{GLU}^n}{k_g^n + C_{GLU}^n} + v_7 \frac{C_{Ca^{2+}}}{k_{Ca^{2+}} + C_{Ca^{2+}}} \quad (70)$$

A equação (70) necessita ser adaptada a fim de ser incorporada como condição de contorno. Além disso, considerou-se inadequado que os dois termos da equação (70) fossem somados, uma vez que, se a concentração de glutamato na fenda é zero, ainda se teria produção do IP_3 , o que não ocorre na realidade. Deste modo, propôs-se que esses termos deveriam ser multiplicados. A partir dessa análise, construiu-se a equação (71) para representar o fluxo de produção do IP_3 .

$$v_{produção} = A_{canais}^{produção} k_{produção} \left[\frac{C_{GLU_{fenda}^n}}{k_{GLU}^n + C_{GLU_{fenda}^n}} \right] \left[\frac{C_{Ca^{2+}}}{k_{Ca} + C_{Ca^{2+}}} \right] \quad (71)$$

A área de canais, $A_{canais}^{produção}$, corresponde ao produto, descrito na equação (72), entre a área analisada e a fração de área que os receptores metabotrópicos ocupam na membrana celular.

$$A_{canais}^{produção} = f_{área}^{produção} \text{Área} \quad (72)$$

3.5.2 Degradação do IP_3

O IP_3 é degradado pelo metabolismo celular. Em função da complexidade desse processo, ele será descrito por uma equação simplificada, assim como a de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), que assume uma cinética de degradação de primeira ordem, eliminando IP_3 até que o valor de sua concentração retorne ao do regime estacionário. A fim de que o IP_3 chegue ao retículo, esse fluxo foi computado no próprio retículo e não em todo o volume celular. A equação a ser utilizada no modelo é dada pela equação (73).

$$v_{degradação} = \pm \text{Área} f_{\text{área}}^{degradação} h_{degradação} (C_{IP_3} - C_{IP_3}^*) \quad (73)$$

3.6 CONDIÇÕES DE CONTORNO

Diferentes condições de contorno foram utilizadas em diferentes regiões celulares, deste modo, elas serão aqui especificadas de maneira genérica.

3.6.1 Isolamento

A condição de isolamento corresponde, fisicamente, à inexistência de fluxo através de uma determinada área. Matematicamente pode ser representada conforme a equação (74).

$$\left. \frac{\partial C_j}{\partial u} \right|_{u=u_L} = 0 \quad (74)$$

Foram consideradas isoladas as áreas laterais das ramificações e as áreas das conexões sem contato com as ramificações. Eventualmente, esta condição também foi adotada para as extremidades das ramificações em que não havia junções prismáticas.

3.6.2 Continuidade

A condição de contorno de continuidade está atrelada ao fato de que as concentrações e fluxos são funções contínuas, sem saltos, e pode ser representada matematicamente pelas equações (75) e (76).

$$\left. \frac{\partial C_j}{\partial u} \right|_{u=u_L^+} = \left. \frac{\partial C_j}{\partial u} \right|_{u=u_L^-} \quad (75)$$

$$C_j \Big|_{u=u_L^+} = C_j \Big|_{u=u_L^-} \quad (76)$$

Essa condição foi utilizada para a intersecção entre ramificações-conexões e ramificações-corpo celular. Por apresentar uma peculiaridade, será discutida mais detalhadamente no próximo capítulo.

3.6.3 Fluxos de cálcio na membrana do retículo endoplasmático

Os íons cálcio atravessam a membrana do retículo endoplasmático por, principalmente, três mecanismos: canais abertos pelo IP_3 , canais passivos e atuação de bombas. Esses três fluxos são incorporados no próprio balanço de massa do retículo endoplasmático. Todavia, no balanço de massa no citosol celular ele é visto como condição de contorno. A construção matemática dessa condição, explicitada na equação (77), está relacionada ao fato que, tudo que chega por difusão ao retículo, pode atravessá-lo por uma das três possibilidades descritas anteriormente.

$$v_{liberação} + v_{passivos}^{RE} - v_{bomba}^{RE} = -Área D_{Ca_{cit}^{2+}} \left. \frac{\partial C_{Ca_{cit}^{2+}}}{\partial u} \right|_{u=u_L} \quad (77)$$

$v_{liberação}$, $v_{passivos}^{RE}$ e v_{bomba}^{RE} são dados pelas equações (65), (51) e (46), respectivamente.

3.6.4 Fluxos de cálcio na membrana celular

Os íons cálcio atravessam a membrana celular por três mecanismos: passagem através de canais abertos pelo glutamato; passagem através de canais permanentemente abertos (canais passivos) e atuação de bombas. Assim, sabe-se que, o fluxo mássico que chega ou sai por difusão nessa interface é fruto da combinação desses três fenômenos. A construção matemática dessa condição de contorno está explicitada na equação (78).

$$v_{entrada} + v_{passivos}^{membrana} - v_{bomba}^{membrana} = -\acute{A}rea D_{Ca^{2+}_{cit}} \frac{\partial C_{Ca^{2+}_{cit}}}{\partial u} \Big|_{u=u_L} \quad (78)$$

$v_{entrada}$, $v_{passivos}^{membrana}$, e $v_{bomba}^{membrana}$ são dados pelas equações (66), (53) e (48), respectivamente.

3.6.5 Fluxo de IP_3 na membrana celular

A condição de contorno para o IP_3 nas ramificações está relacionada ao fato de que todo o IP_3 produzido se desloca por difusão. Deste modo, a representação matemática desta condição é dada pela equação (79):

$$v_{produção} = -\acute{A}rea D_{IP_3} \frac{\partial C_{IP_3}}{\partial u} \Big|_{u=u_L} \quad (79)$$

$v_{produção}$ é dado pela equação (71).

3.6.6 Fluxo de IP_3 na membrana do retículo endoplasmático

A condição de contorno para o IP_3 no retículo é dada pela equação (80), que considera que, o fluxo de IP_3 que chega por difusão é degradado.

$$v_{degradação} = -\acute{A}rea D_{IP_3} \frac{\partial C_{IP_3}}{\partial u} \Big|_{u=u_L} \quad (80)$$

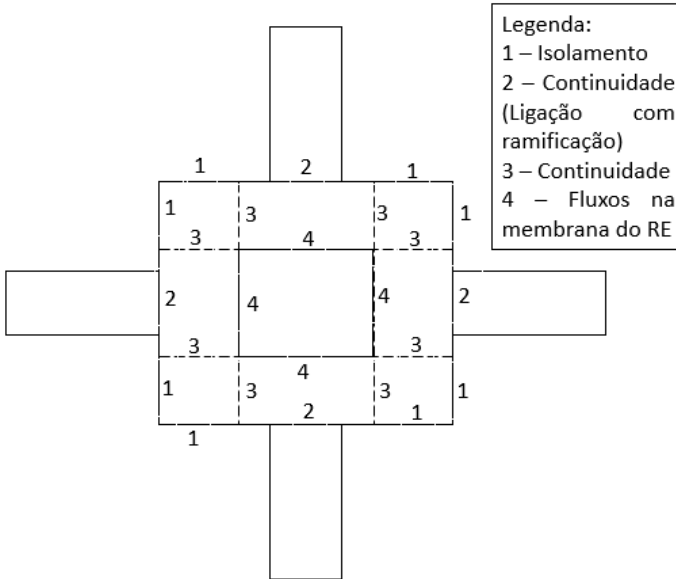
$v_{degradação}$ é dado pela equação (73).

Após a elaboração do modelo matemático, analisou-se a possibilidade de resolvê-lo analiticamente ou numericamente.

Em função de o corpo celular apresentar diferentes condições de contorno em determinadas regiões, conforme pode ser observado na figura 22, ele deveria ser subdividido em 9 regiões para a solução analítica. Além disso, para cada uma das ramificações e conexões seria proposta a solução analítica. Como todas essas regiões estão acopladas pelas condições de continuidade, seria possível somente uma solução analítico-

numérica para o problema. Em função da complexidade envolvida para esse procedimento, optou-se pela solução numérica.

Figura 22 - Subdivisão do corpo celular necessária para a proposição de uma solução analítica para o modelo matemático.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

Deste modo, o modelo matemático foi resolvido numericamente através do método das diferenças finitas em um aplicativo computacional desenvolvido utilizando a linguagem FORTRAN®, cujas peculiaridades serão discutidas no próximo capítulo.

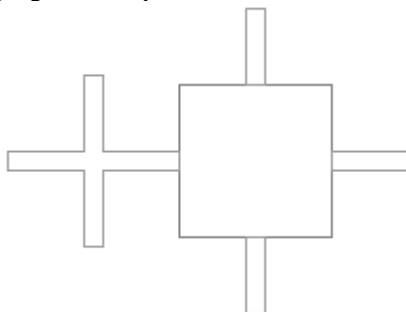
4 APLICATIVO COMPUTACIONAL

Foi desenvolvido um aplicativo computacional versátil para resolver numericamente o modelo proposto para as ondas de cálcio nos astrócitos a partir de estímulos glutamatérgicos. Sua construção permite que complexas geometrias sejam facilmente simuladas e apresenta certo grau de liberdade com relação à escolha dos tipos de condições de contorno adotadas. Deste modo, destinou-se esse capítulo para explicar algumas potencialidades que possui e a forma como estão descritas no código computacional.

4.1 ENTRADA DE DADOS PARA A GEOMETRIA

A fim de ilustrar o processo de construção da geometria no aplicativo computacional, optou-se por um exemplo simples, representado na figura 23.

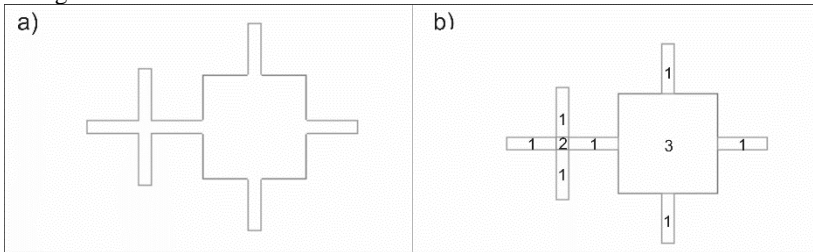
Figura 23 - Exemplo de uma possível estrutura de astrócito a ser resolvida no programa computacional.



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

A fim de se ter certa liberdade com relação à geometria escolhida para representar os astrócitos, sua estrutura, ao invés de ser considerada como uma forma única, foi dividida em prismas retangulares acoplados, conforme pode ser observado na figura 24. Os prismas foram classificados em três tipos, dependendo de sua função: ramificações (1 - que podem ou não estar em contato com sinapses), prismas de conexão (2 - conectam ramificações) e corpo celular (3 - local em que se encontra o retículo endoplasmático).

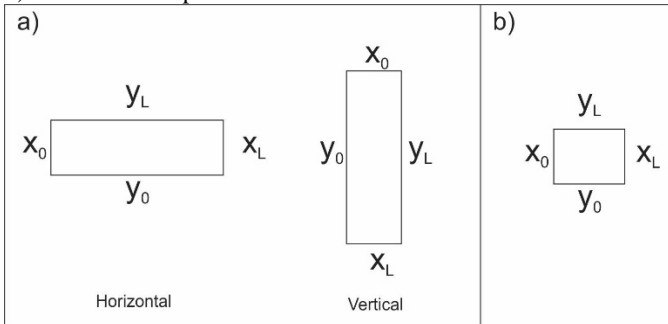
Figura 24— Representação planar da geometria do astrócito a) quando considerada como uma estrutura única e b) quando subdividida em diversos prismas retangulares.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

O balanço de massa foi resolvido individualmente para cada uma das regiões. Deste modo, cada uma apresenta condições de contorno nos pontos x_0 , x_L , y_0 e y_L , padronizados conforme representação na figura 25.

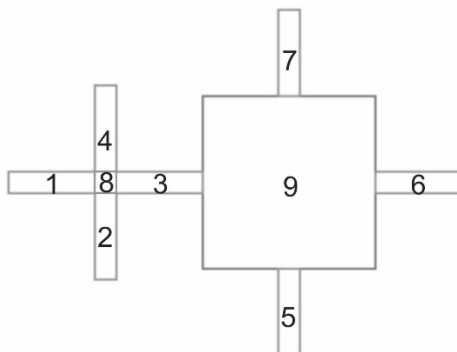
Figura 25 - Representação das posições em cada região para as quais é necessário especificar as condições de contorno. a) Ramificações na horizontal e na vertical; b) conexões e corpo celular.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

Após a decisão da estrutura a ser considerada para a célula, as regiões precisam ser numeradas. Uma das restrições do programa é que todas as ramificações devem ser numeradas antes dos cubos das conexões e do corpo celular. Isso se deve à forma como implementou-se a condição de contorno nos acoplamentos ramificação-conexão e ramificação-corpo celular, que será discutida posteriormente. A numeração das regiões da figura 23 foi realizada conforme pode ser observado na figura 26.

Figura 26 - Exemplo de numeração de uma geometria proposta para o astrócido.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

No programa, há dois arquivos de dados que precisam ser preenchidos para a criação da geometria. O primeiro deles, “structure01”, requer que o usuário especifique o número da região; o tipo (ramificação, conexão ou corpo celular); suas dimensões; o número de divisões da malha e as condições de contorno, cuja legenda pode ser observada no quadro 3. Vale ressaltar que deve-se especificar o tipo de condição de contorno para cada componente uma vez que podem ser distintas.

Quadro 3 - Legenda das condições de contorno que podem ser utilizadas no programa computacional.

Número da condição de contorno	Tipo de condição de contorno
2	Isolamento
3	Fluxo dos canais passivos, da bomba e outra forma de fluxo de entrada
4	Fluxo dos canais passivos e da bomba
10	Acoplamento entre duas regiões distintas

Fonte: desenvolvido pelo autor.

Para a estrutura representada na figura 23, um exemplo do arquivo de dados “Structure01” pode ser visto na figura 27.

Figura 27 - Exemplo do arquivo de dados "structure01" elaborado para a estrutura de um astrócito representada na figura 23.

Region Geometry		Dimensions (um) malha		Bound. Cond. IP3				Bound. Cond. Ca				
		x	y	x0	xL	y0	yL	x0	xL	x0	xL	
1	1	4.000	1.0000	1	3	10	2	2	3	10	2	2
2	1	4.000	1.0000	1	10	3	2	2	10	3	2	2
3	1	4.000	1.0000	1	10	10	2	2	10	10	2	2
4	1	4.000	1.0000	1	3	10	2	2	3	10	2	2
5	1	4.000	1.0000	1	10	3	2	2	10	3	2	2
6	1	4.000	1.0000	1	10	3	2	2	10	3	2	2
7	1	4.000	1.0000	1	3	10	2	2	3	10	2	2
8	2	1.0000	1.0000	1	10	10	10	10	10	10	10	10
9	3	8.0000	8.0000	1	10	10	10	10	10	10	10	10

Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

O outro arquivo que precisa ser preenchido para a construção da estrutura da célula é o "Network01", que visa especificar a maneira como cada geometria está acoplada a outra. É necessário primeiramente especificar ou um cubo de conexão ou um corpo celular e, posteriormente, as ramificações às quais está acoplado, como pode ser observado na figura 28. Caso um dos seus lados não esteja conectado a nenhuma ramificação, o valor inserido no arquivo será zero.

Figura 28 - Exemplo do arquivo de dados "Network01" elaborado para a estrutura de um astrócito representada na figura 23.

Cube	x0	y0	xL	yL
8	1	2	3	4
9	3	5	6	7

Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

Após a inserção desses dados, as rotinas do programa se encarregam da construção da geometria. Esse processo se dá a partir da ramificação "1" e, como o programa atribui um ponto de referência para cada região (localizado na extremidade superior esquerda), ele facilmente monta o restante da geometria.

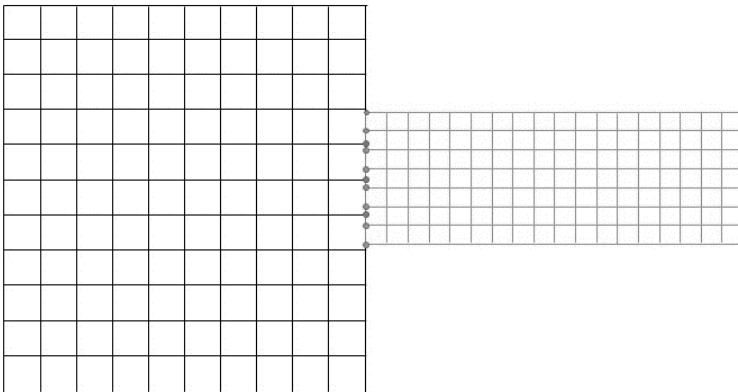
Deste modo, observa-se a facilidade com que geometrias complexas podem ser inseridas no programa até mesmo por um usuário que desconhece os cálculos nele realizados. Exemplos de possíveis variações poderão ser observadas no próximo capítulo.

4.2 ACOPLAMENTO ENTRE DIFERENTES REGIÕES

No programa computacional desenvolvido, dentre os diferentes tipos de condição de contorno possíveis, existe aquela que corresponde ao acoplamento entre ramificações e conexões ou ramificações e corpo celular. A solução numérica para essa condição de contorno é uma peculiaridade e será melhor descrita nessa seção.

Continuidade é o tipo de condição de contorno adotada para as interfaces e é amplamente utilizada em diversos modelos matemáticos. Sua particularidade neste trabalho consiste na existência de diferentes malhas para diferentes regiões. Ou seja, no contorno, as malhas das diferentes regiões não se sobrepõem, conforme pode ser observado na figura 29. Para contornar esse problema, deve-se criar pontos que se sobreponham para que a concentração ou o fluxo seja igualado nesses pontos.

Figura 29 - Exemplo de malha para o corpo celular e uma ramificação indicando que, no contorno, elas não se sobrepõem.

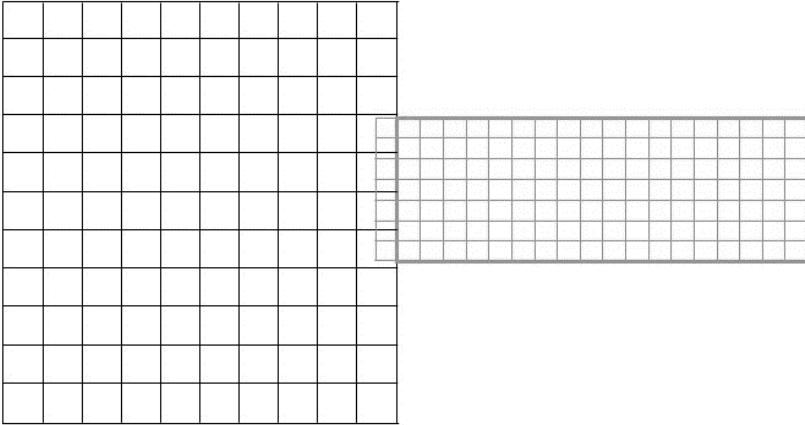


Fonte: desenvolvida pelo autor.

Antes de se discutir os procedimentos realizados pelo programa para a condição de contorno, deve-se entender as implicações diretas de se considerar igualdade de fluxo (utilizada para as ramificações) ou de concentração (utilizada para conexões e corpo celular).

A igualdade de fluxo consiste em igualar os fluxos difusivos no mesmo ponto para domínios diferentes. A discretização dessas equações permite a criação de pontos imaginários além do domínio analisado, conforme pode ser observado na figura 30.

Figura 30—Ilustração dos pontos criados além do domínio da ramificação como uma ferramenta matemática para solução numérica através do método das diferenças finitas.

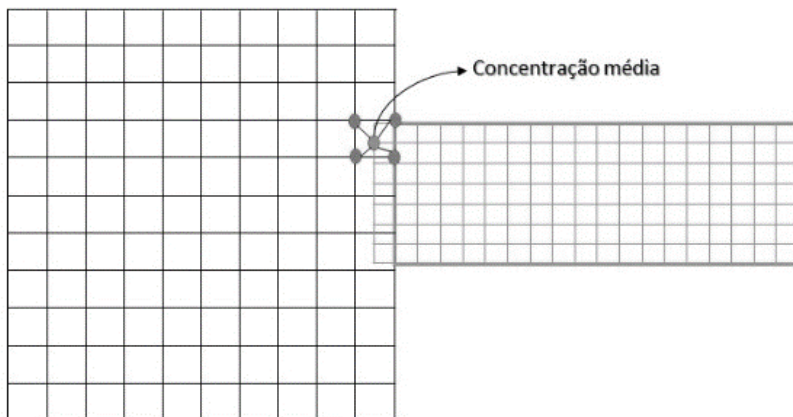


Fonte: desenvolvida pelo autor.

Quando o programa está resolvendo uma ramificação e precisa da condição de contorno do acoplamento, ele chama uma sub-rotina que realiza os seguintes procedimentos:

- a) Calcula as coordenadas dos eixos x e y de um determinado ponto imaginário;
- b) Encontra os quatro pontos da malha do corpo celular ou da conexão que o cercam, cuja representação pode ser vista na figura 31;
- c) Calcula a distância de cada um dos pontos da malha ao ponto imaginário;
- d) Calcula a concentração média ponderada pela distância dos quatro pontos ao ponto imaginário;
- e) Iguala a concentração do ponto imaginário à concentração média calculada.

Figura 31 - Representação do ponto imaginário e dos quatro pontos que o circundam no corpo celular, utilizados para o cálculo da concentração.

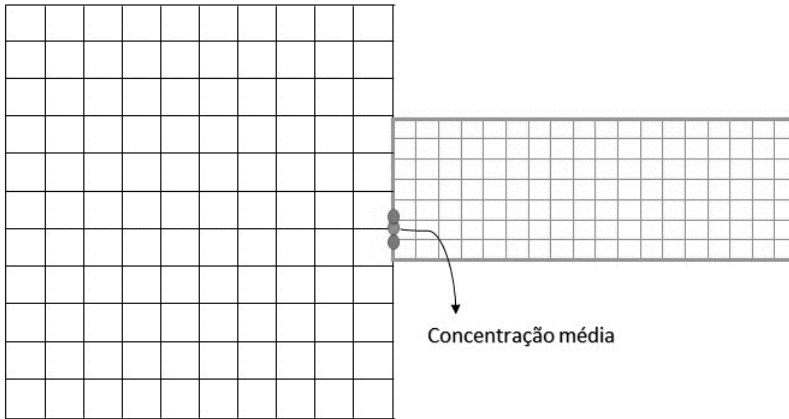


Fonte: desenvolvida pelo autor.

Para as conexões e o corpo celular, quando o programa necessita da condição de contorno de acoplamento, uma sub-rotina que realiza os seguintes procedimentos é chamada:

- a) Calcula as coordenadas do eixo y de determinado ponto da conexão ou do corpo celular na interface;
- b) Encontra dois pontos da malha da ramificação que o cercam, cuja representação pode ser vista na figura 32;
- c) Calcula a distância de cada um dos pontos da malha da ramificação ao ponto para o qual está sendo calculada a condição de contorno;
- d) Calcula a concentração média ponderada pela distância dos dois pontos ao ponto para o qual está sendo calculada a condição de contorno;
- e) Iguala a concentração do ponto estudado à concentração média calculada.

Figura 32 - Representação do ponto imaginário e dos quatro pontos que o circundam no corpo celular, utilizados para o cálculo da concentração.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

Para a ramificação, é criado um ponto imaginário, que pode ser calculado na sub-rotina para o tempo presente. Para as conexões e o corpo celular, por sua vez, o ponto calculado pertence ao próprio domínio e deve ser calculado para o tempo futuro. Como este último depende do valor daquele, as ramificações devem ser calculadas primeiramente.

4.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O programa desenvolvido é versátil no que diz respeito às geometrias que podem ser resolvidas numericamente através do mesmo e com relação à facilidade com que se modificam as condições de contorno. Além disso, é de fácil tratamento, o que possibilita sua utilização por leigos em modelagem matemática e simulação numérica. Sua versatilidade e eficácia poderá ser vista com mais propriedade no próximo capítulo, cujo tema compreende a simulação de situações reais às quais os astrócitos foram submetidos e avaliou-se a resposta da simulação numérica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

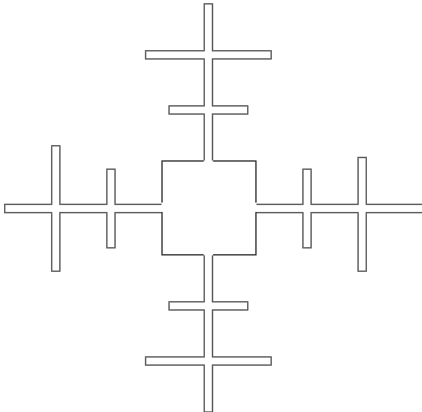
O modelo matemático proposto para descrever as ondas de cálcio em astrócitos induzidas por estímulos glutamatérgicos foi resolvido numericamente para diferentes situações biológicas. Este capítulo destina-se a especificá-las, discutir os resultados obtidos e compará-los com os resultados experimentais encontrados na literatura.

5.1 APLICATIVO COMPUTACIONAL

O aplicativo computacional foi desenvolvido com o intuito de possibilitar simulações com diferentes tipos de geometria. O usuário insere as informações nas sub-rotinas “Structure01” e “Network01” e o programa monta a estrutura desejada para a célula.

A figura 33 apresenta uma possibilidade de geometria que foi construída no programa. Os arquivos que as geraram encontram-se no Apêndice A.

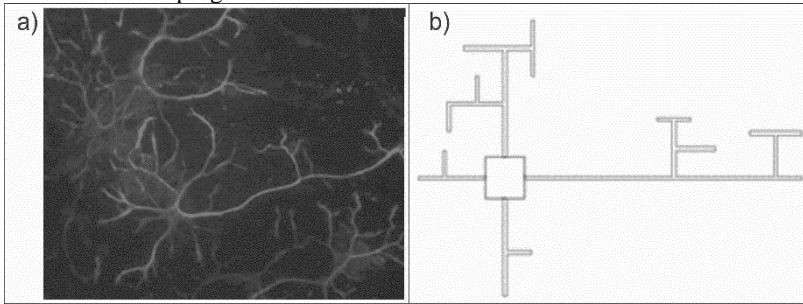
Figura 33 - Exemplo de uma estrutura que pode ser montada no programa computacional.



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

Essa flexibilidade com relação à geometria permite que um usuário, ao conhecer a estrutura de determinada célula, possa representá-la o mais próximo possível da realidade. Para demonstrar essa possibilidade criou-se a figura 34, que ilustra uma imagem real de um astrócito e uma aproximação dessa geometria que pode ser criada no programa.

Figura 34 – Comparação entre um a) astrócito real e uma b) geometria desenvolvida no programa.

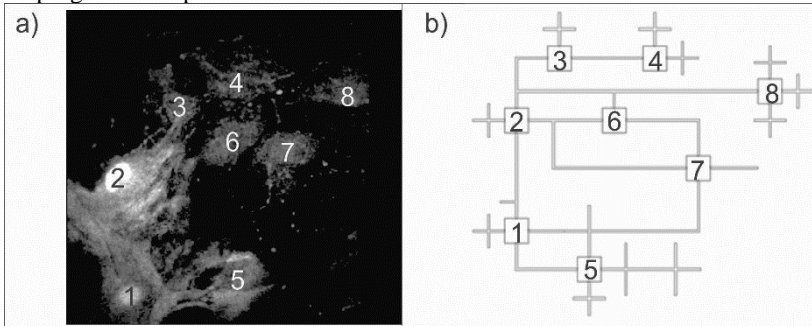


Fonte: a) ABCAM DISCOVERY MORE (2015), b) programa computacional desenvolvido pelo autor.

Os arquivos que geraram a figura 34 encontram-se no Apêndice A.

A potencialidade da forma como as geometrias são inseridas no programa não se restringe à elaboração de geometrias complexas, mas também se estende à possibilidade de se criarem redes de astrócitos, com arranjos semelhantes à de redes reais, conforme pode ser observado na figura 35.

Figura 35 - Exemplo de uma rede de astrócitos a) real e b) que pode ser construída no programa computacional desenvolvido.

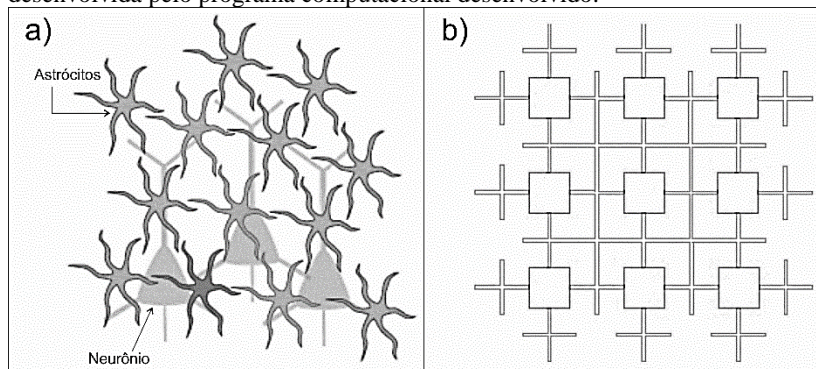


Fonte: a) Fields e Stevens-Graham (2002), b) programa computacional desenvolvido pelo autor.

O arquivo de dados que dá origem à figura 35 pode ser visualizado no Apêndice A.

Outra típica representação de rede de astrócitos pode ser observada na figura 36a. Nesse tipo de rede há mais conexões entre as células e elas são homogeneamente distribuídas. O aplicativo desenvolvido neste trabalho também é capaz de criar uma estrutura semelhante, conforme pode ser observado na figura 36b.

Figura 36 - Exemplo de rede de astrócitos a) disponível na literatura e b) desenvolvida pelo programa computacional desenvolvido.



Fonte: a) Adaptada de Min, Santello e Nevian (2012), b) programa computacional desenvolvido pelo autor.

Deste modo, observa-se que o programa desenvolvido, de fato, apresenta muita flexibilidade com relação à geometria celular e até mesmo com relação à criação de redes complexas de células.

5.2 COMPARAÇÃO COM RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Para cada situação específica há um modelo e um conjunto de parâmetros que visam descrevê-la. Todavia, há parâmetros gerais, que serão considerados os mesmos para todos os casos e estes serão descritos separadamente.

5.2.1 Parâmetros globais

A concentração inicial de cálcio citosólico e do retículo endoplasmático foi considerada $0,1 \mu M$ e $10,3 \mu M$, respectivamente. Ambos os valores foram assumidos segundo os propostos por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006). A concentração inicial de IP_3 considerada foi a do regime estacionário, também descrita por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006).

A concentração de cálcio no meio extracelular não foi sugerida por nenhum autor de modelo matemático para sinalização de cálcio nos astrócitos. No presente trabalho considerou-se que é de 2 mM , visto que esse é o valor no fluido extracelular do sistema nervoso (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

O valor utilizado para o coeficiente de difusão do IP_3 foi de $280\ \mu\text{m}^2/\text{s}$, assim como Hofer, Venance e Glaume (2002) sugeriram. Para o cálcio, o valor considerado foi de $35\ \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Ullah; Jung, 2006).

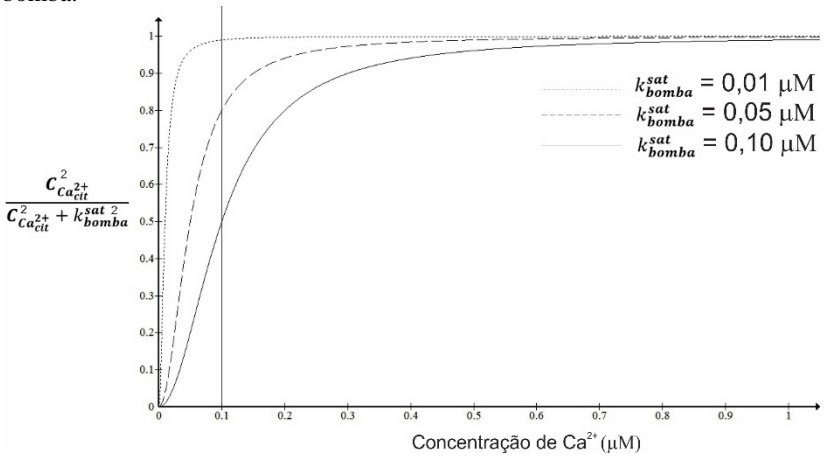
A fração volumétrica ocupada pelo retículo foi estimada a partir de dados fornecidos por Alberts *et al.* (2006). Os autores afirmaram que o citosol celular ocupa 54% do volume total da célula. Deste modo, supôs-se que todas as organelas ocupam 46% do corpo celular. Como a fração média celular ocupada pelo retículo endoplasmático é de 17%, a fração de organelas que corresponde ao RE é de 37%.

Com relação a constante de saturação da bomba, k_{bomba}^{sat} , embora Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) tenham-na especificado com o valor de $0,1\ \mu\text{M}$, refletiu-se sobre esse valor e o seu significado. A fim de facilitar essa reflexão, construiu-se as curvas da figura 37, cuja análise permite concluir que, quanto maior o valor da constante de saturação da bomba, maior é a concentração de cálcio necessária para saturá-la. Sabendo que a operação da bomba não é prioridade para a célula, uma vez requer significativo gasto energético, optou-se por utilizar uma constante de saturação menor. Como para o valor de $0,01\ \mu\text{M}$ a bomba já estaria praticamente saturada à concentração inicial de cálcio, optou-se por utilizar um valor intermediário, $0,05\ \mu\text{M}$.

Para coeficiente de Hill, n , utilizado na equação (71), assumiu-se o valor 0,3, conforme recomendado por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006). Para esta mesma equação ainda é necessário especificar valores para as constantes de dissociação de glutamato e cálcio, k_{GLU} e $k_{Ca_{ctt}^{2+}}$.

O valor utilizado para a constante $k_{Ca_{ctt}^{2+}}$ foi o mesmo de Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), $1,1\ \mu\text{M}$. Para k_{GLU} , esses autores propuseram o valor de $0,78\ \mu\text{M}$, que é incoerente com relação ao seu significado, uma vez que esse valor corresponde à saturação dos receptores ionotrópicos pelo glutamato, cuja concentração varia entre 10 e $100\ \mu\text{M}$. Deste modo, optou-se por utilizar um valor intermediário para saturação, $50\ \mu\text{M}$.

Figura 37 - Representação do efeito da mudança no coeficiente de saturação da bomba.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

Os produtos $k_{bomba}^{RE} * f_{\acute{a}rea}^{bomba,RE}$ e $k_{bomba}^{membrana} * f_{\acute{a}rea}^{bomba,membrana}$, embora dependam da situação analisada, são estimados da mesma forma em todas elas: iguala-se o fluxo da bomba à soma dos fluxos dos canais passivos e de liberação (RE) ou entrada (membrana celular), pois considera-se que, nesse momento, a célula está em equilíbrio. A equação que descreve o seu cálculo na membrana do retículo é dada por (81) e na membrana celular, por (82).

$$k_{bomba}^{RE} * f_{\acute{a}rea}^{bomba,RE} = (v_{passivos}^{RE} + v_{libera\c{c}ao}^{RE}) \left(\frac{k_{bomba}^{sat} + C_{Ca^{2+}}^2}{C_{Ca^{2+}}^2} \right) \quad (81)$$

$$k_{bomba}^{membrana} * f_{\acute{a}rea}^{bomba,membrana} = (v_{passivos}^{membrana} + v_{entrada}^{membrana}) \left(\frac{k_{bomba}^{sat} + C_{Ca^{2+}}^2}{C_{Ca^{2+}}^2} \right) \quad (82)$$

O quadro 4 contém um resumo dos parâmetros que foram utilizados para todas as situações que serão descritas nas próximas seções.

Quadro 4 - Parâmetros globais utilizados no modelo.

Parâmetro	Valor	Fonte
$C_{Ca_{cit}^{2+}} \text{ inicial}$	0,1 μM	Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006)
$C_{Ca_{RE}^{2+}} \text{ inicial}$	10,3 μM	Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006)
$C_{IP_3} \text{ inicial}$	0,16 μM	Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006)
$C_{Ca_{extracelular}^{2+}}$	2 mM	Bear, Connors, Paradiso (2008)
$D_{Ca_{cit}^{2+}}$	35 $\mu m^2/s$	Ullah e Jung (2006)
D_{IP_3}	280 $\mu m^2/s$	Hofer, Venance Glaume (2002)
$f_{organelas}$	0,46	Alberts <i>et al.</i> (2006)
$f_{retículo}$	0,37	Estimado
k_{GLU}	50 μM	Avaliado segundo a realidade biológica
$k_{Ca_{cit}^{2+}}$	1,1 μM	Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006)
n	0,3	Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006)
k_{bomba}^{sat}	0,05 μM	Avaliado segundo a realidade biológica
$k_{bomba}^{RE} * f_{bomba}^{\acute{a}rea,RE}$	-	Calculado para o equilíbrio no início da simulação
$k_{bomba}^{membrana} * f_{bomba}^{\acute{a}rea,membrana}$	-	Calculado para o equilíbrio no início da simulação

Fonte: desenvolvido pelo autor.

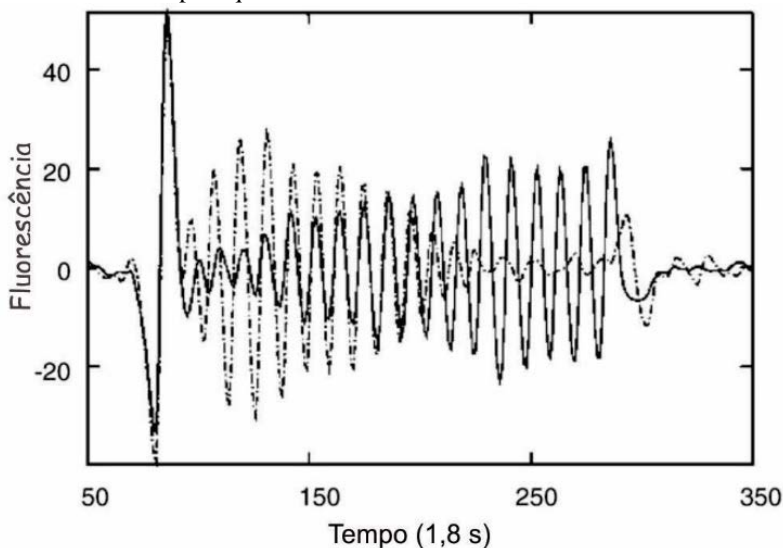
5.2.2 Uma célula em cultura

A primeira situação proposta para o estudo da validade do modelo foi a de células astrocitárias em cultura. Optou-se por analisar as especificações e os resultados do experimento realizado por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006). Os autores cultivaram astrócitos das regiões CA1-CA3 do hipocampo de ratos. As células foram carregadas com o indicador de cálcio Fluo-3AM e perfundidas com uma solução salina contendo 137 mM de cloreto de sódio, 5 mM de cloreto de potássio, 3 mM de

cloreto de cálcio, 1 *mM* de cloreto de magnésio, 10 *mM* de HEPES e 20 *mM* de sorbitol. Posteriormente foram submetidas a uma solução contendo 100 μM de glutamato.

A curva com os resultados experimentais apresentada pelos autores pode ser observada na figura 38.

Figura 38 - Resultados experimentais de uma cultura de astrócito imersa em solução contendo 100 μM de glutamato. A diferença entre a curva contínua e a pontilhada é a célula para qual cada uma delas foi analisada.



Fonte: Adaptado de Ullah, Jung e Cornell-Bell, 2006.

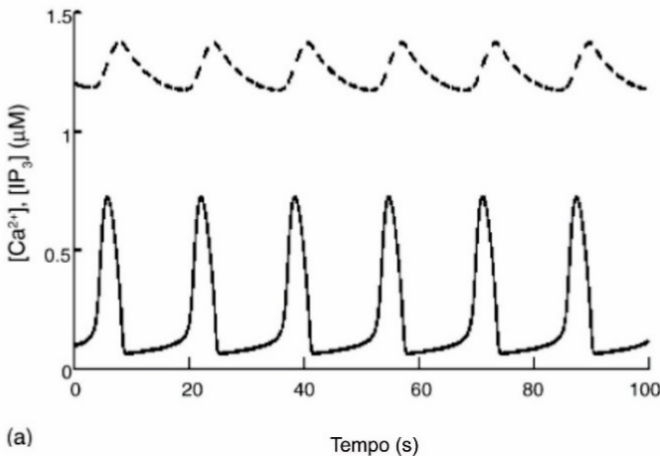
Os valores experimentais foram apresentados somente em fluorescência e não foi disponibilizada a curva de calibração a fim de que fossem convertidos em concentração de cálcio, embora essa seja a variável avaliada no modelo proposto por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), conforme pode ser observado na figura 39.

É interessante destacar que, ainda que os autores tenham afirmado que validaram o seu modelo, o resultado obtido para a oscilação da concentração de cálcio difere do resultado experimental. Isso porque, experimentalmente, os picos não atingem sempre o mesmo patamar e a fluorescência não retorna ao valor basal a cada ciclo.

O tipo de comportamento padronizado obtido por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) só é possível em função da simplicidade do seu modelo, que não leva em conta a variação espacial das concentrações de

cálcio e IP_3 , a complexidade da geometria dos astrócitos e a localização específica dos fluxos de entrada e saída do citosol. Além disso, os autores não incorporaram em seu modelo fenômenos tais como a ativação dos receptores ionotrópicos de glutamato e a existência de bombas e canais passivos na membrana celular.

Figura 39 - Concentrações de cálcio (linha contínua) e IP_3 (linha pontilhada) obtida por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) de acordo com o seu modelo matemático.

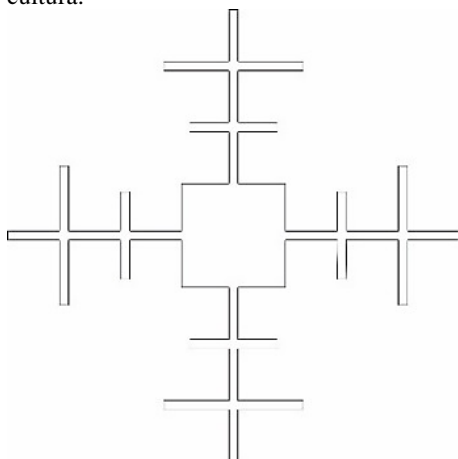


Fonte: Adaptado de Ullah, Jung e Cornell-Bell, 2006.

Conclui-se, portanto, que Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) conseguiram, a partir do seu modelo, descrever qualitativamente uma situação ideal de sinalização de cálcio, onde o sistema é perturbado, mas consegue retornar ao patamar inicial e repetir esse padrão sequencialmente. Como esse tipo de comportamento em um sistema tão complexo é inviável, como pode ser observado na figura 38, far-se-á a comparação dos resultados obtidos neste trabalho somente com os resultados experimentais dos autores, destacando que ainda há dificuldade para comparação uma vez que um está em fluorescência e outro em concentração.

A fim de encontrar parâmetros coerentes para o modelo e validá-lo comparando-o com resultados experimentais, propôs-se a geometria para um astrócito conforme a figura 40.

Figura 40 - Geometria do astrócito considerada para o modelo de um astrócito em cultura.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

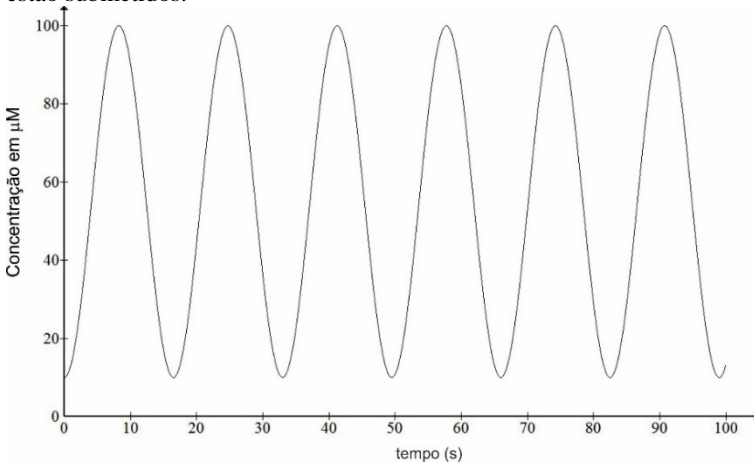
Quanto à concentração de glutamato, foram consideradas duas situações distintas: a) concentração constante e igual a $100 \mu M$; b) concentração variando ao longo do tempo, em virtude da dinâmica das células em cultura. Deste modo, para a segunda hipótese, propôs-se que a concentração de glutamato poderia ser representada pela função descrita na equação (83).

$$C_{GLU} = 55,0 + 45,0 \operatorname{sen}\left(\frac{2\pi}{t_{oscilação}}t + 1,5\pi\right) \quad (83)$$

Como a concentração máxima é de $100 \mu M$, considerou-se razoável propor que ela variaria em um intervalo entre 10 e $100 \mu M$. O período desta curva, $t_{oscilação}$, foi considerado 16,5 s uma vez que este é o período que os autores Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006) sugeriram para oscilação de cálcio na célula. Além disso, utilizou-se um atraso para que a resposta fosse computada a partir de uma diminuição inicial da concentração de glutamato.

A curva que representa a equação (78) pode ser observada na figura 41.

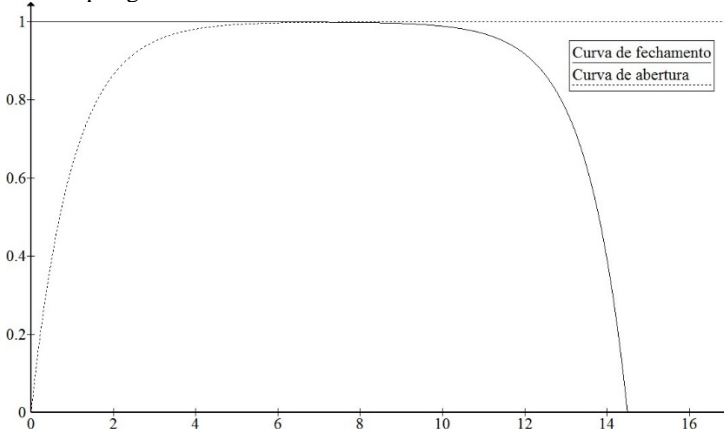
Figura 41 - Concentração de glutamato ao longo do tempo à qual os astrócitos estão submetidos.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

As constantes de abertura e fechamento foram estimadas de modo a se obter o resultado qualitativo esperado para a dinâmica dos canais. Utilizando os valores de $0,1 \mu\text{M}^{-1}$ para a abertura e $1,0 \text{s}^{-1}$ para o fechamento dos canais ativados por glutamato, obtém-se curvas de abertura e fechamento, cujos comportamentos podem ser observados na figura 42.

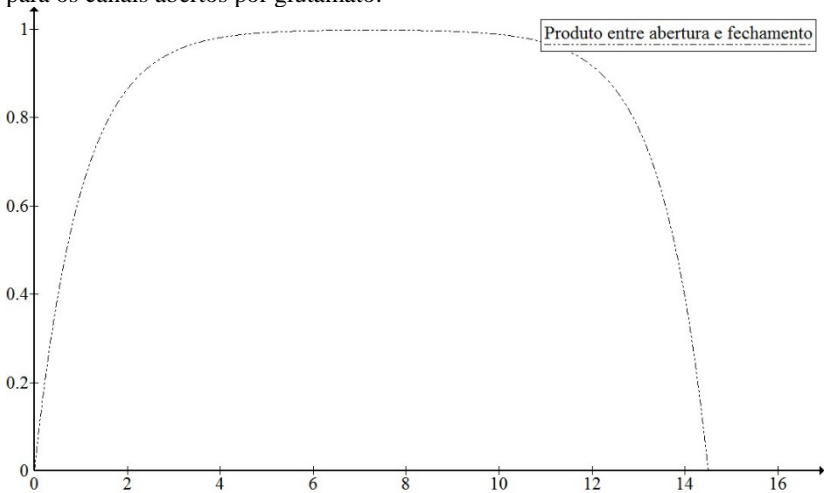
Figura 42 - Comportamento das curvas de abertura e fechamento para os canais abertos por glutamato.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

O produto entre as curvas de abertura e fechamento, que corresponde à dinâmica dos canais como um todo, pode ser observado na figura 43.

Figura 43 - Comportamento do produto entre a curva de abertura e de fechamento para os canais abertos por glutamato.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

Assumiu-se que o tempo para o completo fechamento dos canais é de 14,5 s. Esse valor foi estipulado de modo a se ter um período refratário, nesse caso 2 s, suficiente para que a célula consiga reestabelecer a concentração de cálcio e IP_3 antes do início do próximo ciclo.

A constante de fechamento dos canais ativados por IP_3 é a mesma daqueles ativados por glutamato, $1,0 s^{-1}$. A constante de abertura, por outro lado, será 100 vezes maior, $10 \mu M^{-1}$, uma vez que a concentração de IP_3 é da ordem de 100 vezes menor que a do glutamato.

As constantes associadas às velocidades de produção e de decaimento do IP_3 , $k_{produção} * f_{área}^{produção}$ e $h_{degradação} * f_{área}^{degradação}$, foram ajustadas de modo que se obtivesse uma variação de IP_3 na célula satisfatória com relação à liberação de cálcio por parte do retículo endoplasmático.

As constantes associadas aos canais passivos, $h_{passivos}^{RE} * f_{área}^{passivos,RE}$ e $h_{passivos}^{membrana} * f_{área}^{passivos,membrana}$, foram ajustados de

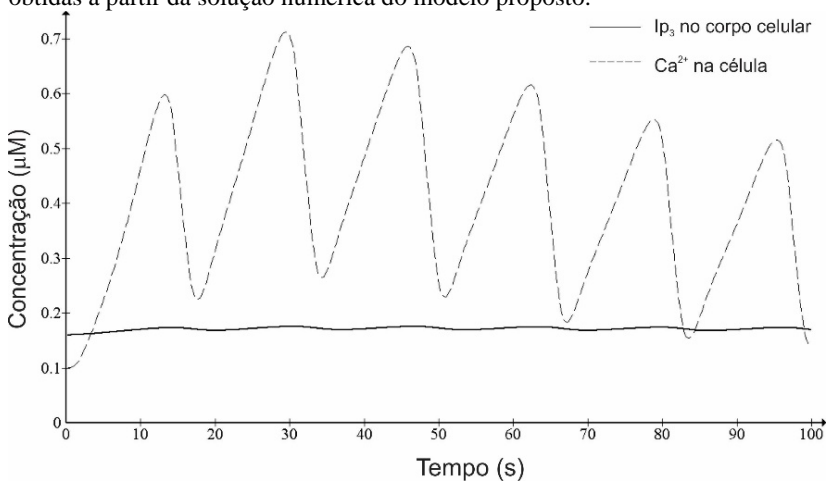
modo que se obtivessem fluxos de saída suficientes para que a célula e aproximasse dos valores do regime estacionário dentro do período de oscilação determinado. Após esse cálculo, pode-se calcular as constantes associadas às bombas.

O produto $h_{liberação} * f_{área}^{liberação}$ foi otimizado de modo que a contribuição do retículo para o aumento da concentração intracelular de cálcio fosse significativa.

Os valores adotados podem ser observados no quadro 5.

A dinâmica de cálcio e IP_3 para os parâmetros acima adotados, considerando a concentração de glutamato variando ao longo do tempo, pode ser observada na figura 44.

Figura 44 - Dinâmica das concentrações médias de Ca^{2+} e IP_3 na citosol celular obtidas a partir da solução numérica do modelo proposto.



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

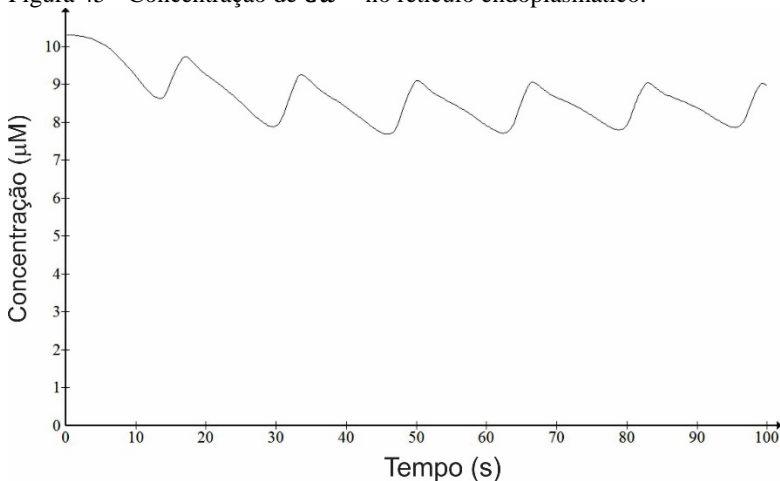
Quadro 5 - Parâmetros do modelo para uma célula em cultura.

Parâmetro	Valor	Fonte
$k_{fechamento}^{GLU}$	$1,0 s^{-1}$	Escolha a partir do comportamento qualitativo desejado
$k_{fechamento}^{IP_3}$	$1,0 s^{-1}$	Escolha a partir do comportamento qualitativo desejado
$k_{abertura}^{GLU}$	$0,1 \mu M^{-1}$	Escolha a partir do comportamento qualitativo desejado
$k_{abertura}^{IP_3}$	$10 \mu M^{-1}$	Escolha a partir do comportamento qualitativo desejado
$h_{ionotrópicos} * f_{área}^{GLU}$	$4,5 \cdot 10^{-4} \frac{\mu m}{s}$	Ajustado
$k_{produção} * f_{área}^{produção}$	$0,5 \cdot 10^{-15} \frac{\mu mol}{\mu m^2 s}$	Ajustado
$h_{degradação} * f_{área}^{degradação}$	$1,0 \frac{\mu m}{s}$	Ajustado
$h_{passivos}^{RE} * f_{área}^{passivos,RE}$	$0,07 \frac{\mu m}{s}$	Ajustado
$k_{bomba}^{RE} * f_{área}^{bomba,RE}$	$0,9 \cdot 10^{-15} \frac{\mu mol}{\mu m^2 s}$	Calculado para o equilíbrio
$h_{passivos}^{membrana} * f_{área}^{passivos,membrana}$	$1,4 \cdot 10^{-3} \frac{\mu m}{s}$	Ajustado
$k_{bomba}^{membrana} * f_{área}^{bomba,membrana}$	$3,5 \cdot 10^{-15} \frac{\mu mol}{\mu m^2 s}$	Calculado para o equilíbrio
$h_{liberação} * f_{área}^{liberação}$	$0,5 \frac{\mu m}{s}$	Ajustado

Fonte: desenvolvido pelo autor.

A concentração de cálcio no retículo endoplasmático pode ser observada na figura 45.

Figura 45 - Concentração de Ca^{2+} no retículo endoplasmático.



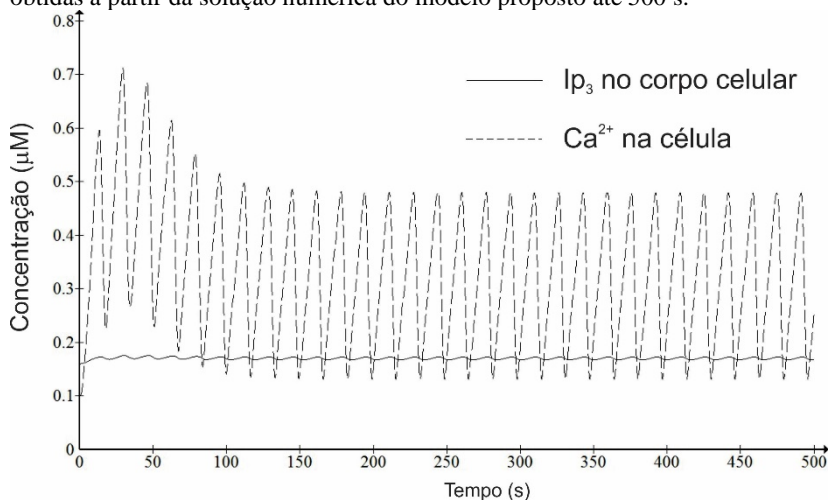
Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

Observa-se que as curvas das figuras 44 e 45 apresentam comportamento qualitativo coerente. A concentração de cálcio começa a aumentar na célula em função da entrada através dos canais ionotrópicos e da liberação pelo retículo endoplasmático. Quando a produção de IP_3 diminui e os canais ionotrópicos e metabotrópicos desativam, a concentração aumenta mais lentamente até que os fluxos de saída e de retorno para o retículo começam a ser mais significativos, diminuindo a concentração intracelular de cálcio.

Os resultados obtidos neste trabalho são consistentes com resultados experimentais apresentados por Ullah, Jung e Cornell-Bell (2006), expostos na figura 38, uma vez que a concentração de cálcio não mantém os picos em um patamar fixo, e sim os pontos de máximo decaem ao longo do tempo.

Quando o sistema é analisado para longos intervalos de tempo, percebe-se que após um período de instabilidade, provocado pela perturbação, o sistema passa a oscilar regularmente. Esse comportamento pode ser observado no gráfico da figura 46, que mostra o resultado das concentrações citosólicas de cálcio e IP_3 até 500 s.

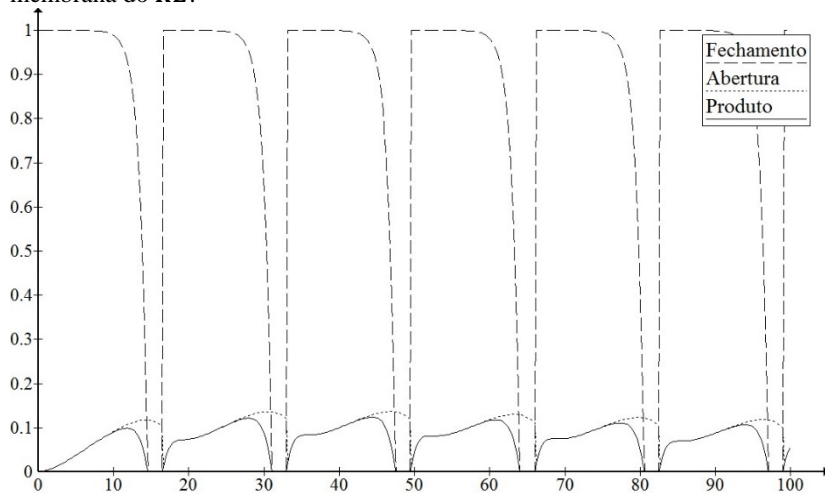
Figura 46 - Dinâmica das concentrações médias de Ca^{2+} e IP_3 na citosol celular obtidas a partir da solução numérica do modelo proposto até 500 s.



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

O comportamento das curvas de abertura e fechamento dos canais ativados por IP_3 pode ser observado na figura 47.

Figura 47 - Curva de abertura, fechamento e o seu produto para um ponto da membrana do **RE**.

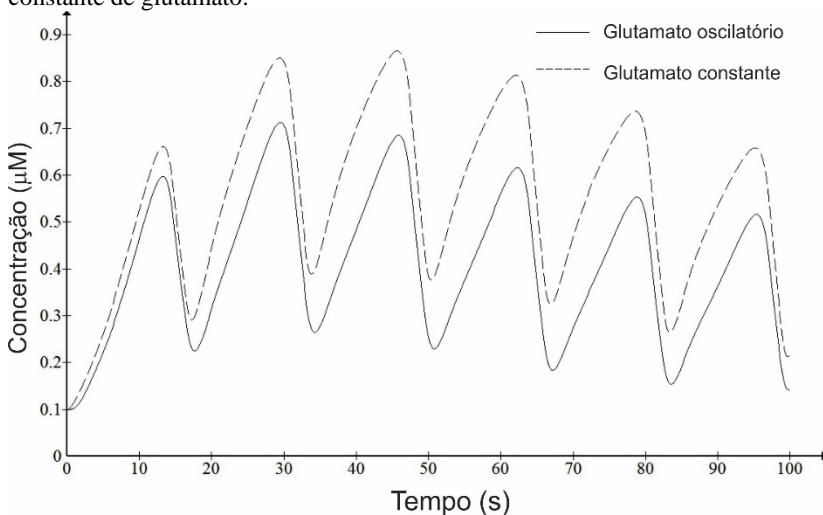


Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

A partir da figura 47, observa-se que a curva de fechamento parte de 1 e decai a 0, onde permanece durante o período refratário. Posteriormente, no próximo ciclo, ela retorna ao valor 1. A curva de abertura, por sua vez, parte de zero e cresce até o próximo ciclo, quando retorna a 0. O produto entre essas duas curvas satisfaz o desejado para uma curva de abertura e fechamento de canais.

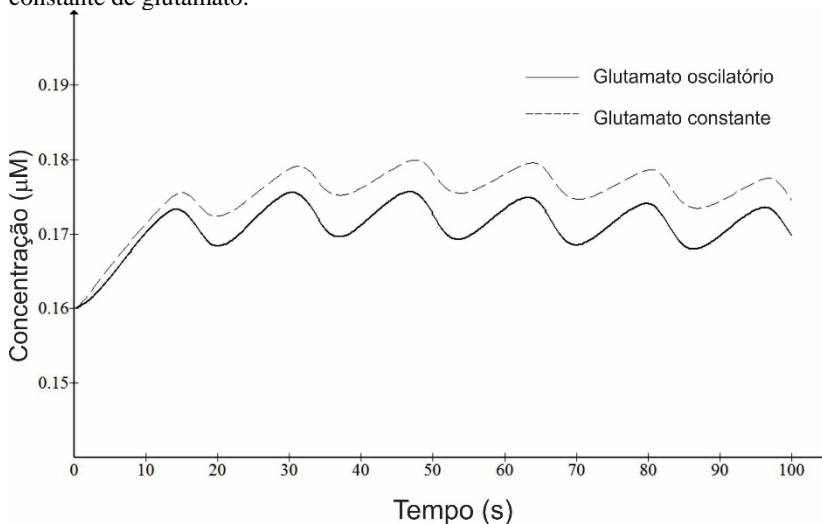
É interessante observar que o comportamento oscilatório das curvas de IP_3 e Ca^{2+} é consequência das curvas de abertura e fechamento e não da possível oscilação da concentração de glutamato no meio extracelular. Esse fato pode ser constatado a partir da observação das figuras 48 e 49, que comparam os resultados das concentrações de Ca^{2+} e IP_3 , respectivamente, para duas situações: concentração constante e oscilatória de glutamato.

Figura 48 - Concentração de Ca^{2+} avaliada para concentração oscilatória e constante de glutamato.



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

Figura 49 - Concentração de IP_3 avaliada para concentração oscilatória e constante de glutamato.

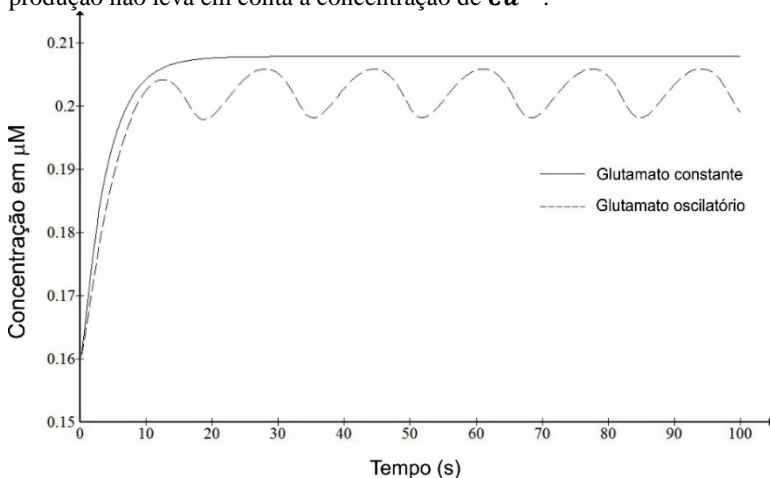


Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

A partir das figuras 48 e 49 é possível verificar que, mantendo a concentração de glutamato constante, eleva-se a concentração de Ca^{2+} na célula, justamente pela elevação da concentração de IP_3 . Isso ocorre porque, para o caso em que a concentração de glutamato é oscilatória, a equação que descreve a produção de IP_3 aumenta e diminui periodicamente. Para concentração constante, por outro lado, o termo de produção associado à concentração de glutamato permanece constante.

Vale destacar que a oscilação da curva do IP_3 está intrinsecamente relacionada à contribuição do Ca^{2+} na equação que descreve sua produção. Quando o termo da equação de produção que incorpora a concentração de Ca^{2+} não é incluído no modelo, a curva de IP_3 passa a depender exclusivamente da forma como é considerada a curva de glutamato, conforme pode ser observado na figura 50.

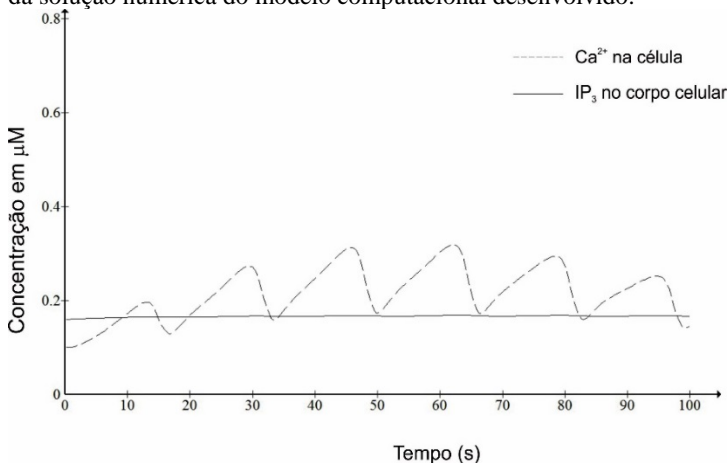
Figura 50 - Concentração de IP_3 para o caso em que a equação que descreve sua produção não leva em conta a concentração de Ca^{2+} .



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

É importante ressaltar que o modelo proposto neste trabalho considera a contribuição dos receptores ionotrópicos. Caso eles não fossem considerados, a dinâmica de cálcio e IP_3 seria outra, conforme pode ser observado na figura 51.

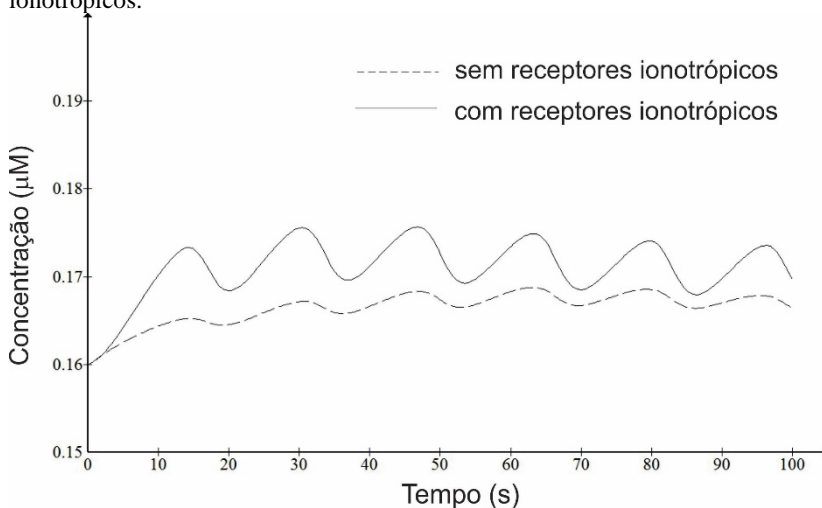
Figura 51 - Dinâmica das concentrações de Ca^{2+} e IP_3 na célula obtidas a partir da solução numérica do modelo computacional desenvolvido.



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

A diferença entre os resultados obtidos levando em conta ou não os receptores ionotrópicos é melhor compreendida quando se compara o comportamento da concentração de IP_3 para os dois casos, conforme pode ser observado na figura 52.

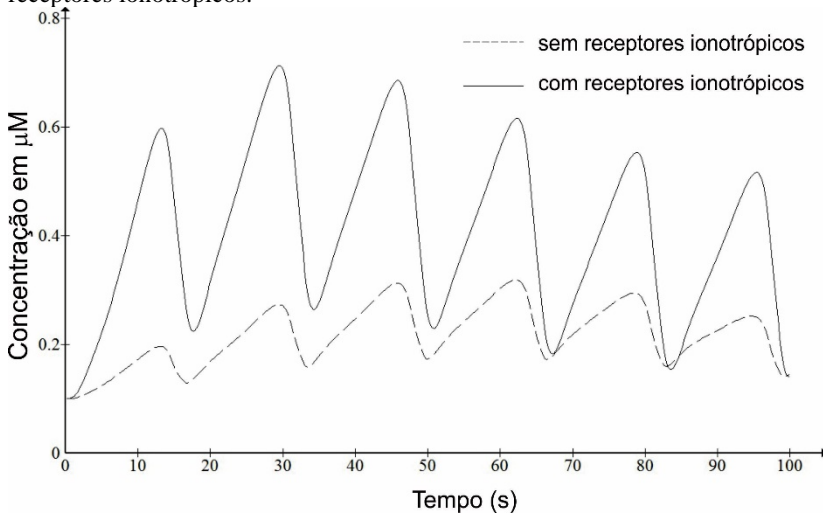
Figura 52 - Concentração de IP_3 com e sem a ativação de receptores ionotrópicos.



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

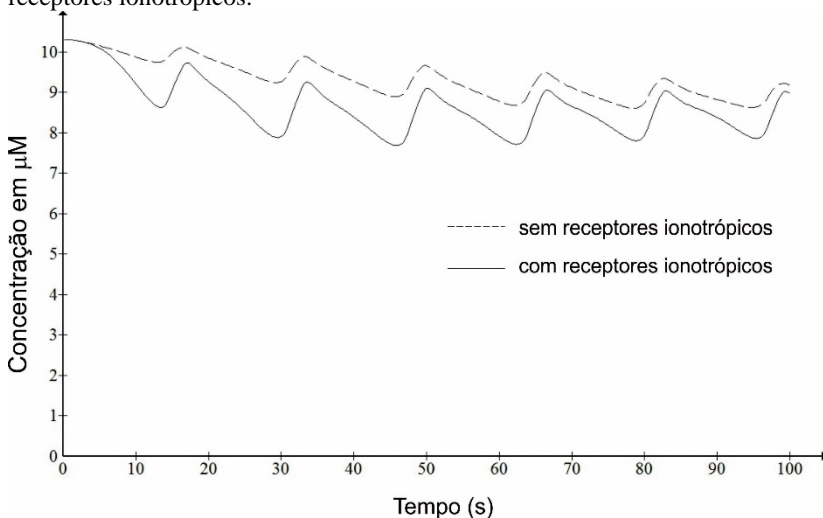
Para o caso em que os receptores ionotrópicos são ativados, ocorre a entrada de cálcio pelos canais da membrana celular, aumentando a concentração intracelular de cálcio, o que favorece a produção de IP_3 . Consequentemente, os canais ativados por IP_3 são abertos. Quando os receptores ionotrópicos não são ativados, a concentração intracelular de cálcio assume valores inferiores, conforme pode ser observado na figura 53. Deste modo, menos canais são ativados por IP_3 , resultando em menor liberação de cálcio pelo retículo. A concentração de cálcio no retículo para os dois casos pode ser observada na figura 54.

Figura 53 - Concentração celular de cálcio para ativação e não ativação dos receptores ionotrópicos.



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

Figura 54 - Concentração de cálcio no **RE** para ativação e não ativação dos receptores ionotrópicos.



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

Observa-se na figura 54 que em nenhuma das situações o **RE** consegue reestabelecer a concentração de cálcio inicial. Isso faz com que

a quantidade disponível para liberação diminua gradativamente. Deste modo, percebe-se que uma das falhas do modelo é a inexistência de um mecanismo eficiente de reposição de cálcio ao RE, tal como a abertura de canais transientes de potenciais acionados pela molécula de interação estromal.

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que o modelo proposto descreve a sinalização de cálcio nos astrócitos a partir de estímulos glutamatérgicos em concordância com resultados experimentais disponíveis na literatura. Possíveis discrepâncias podem estar associadas a alguns fatores tais como a falta de informação sobre a geometria da célula analisada; o desconhecimento da dinâmica de glutamato no meio extracelular; a falta de parâmetros disponíveis na literatura; e, principalmente, a dificuldade de elaboração de equações para fenômenos complexos tais como abertura e fechamento de canais.

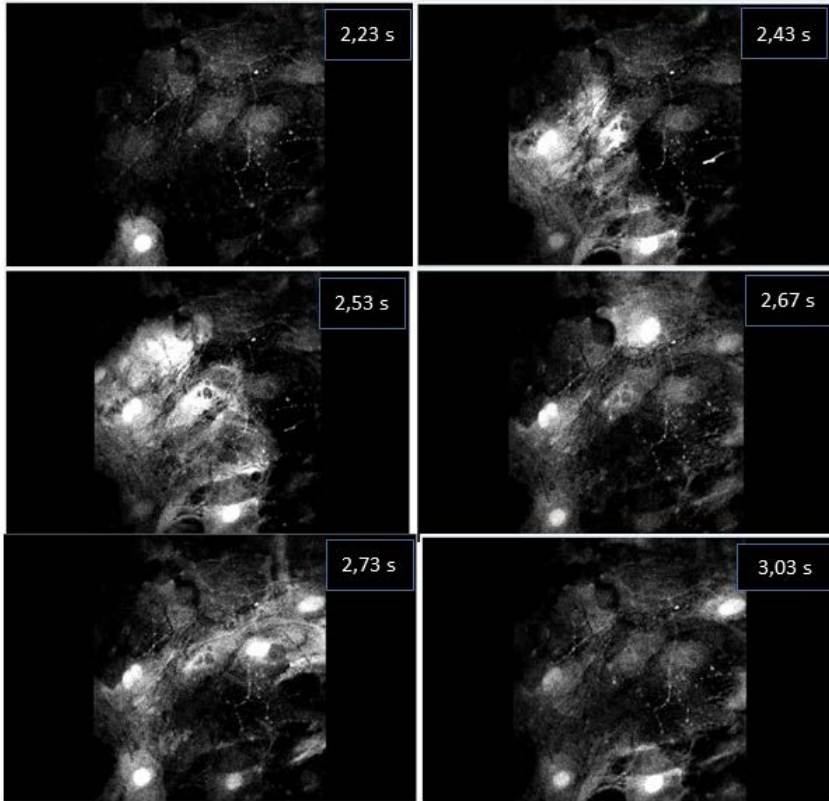
Embora a quantidade de parâmetros utilizadas no modelo seja significativa, é importante lembrar que área de estudo ainda não está consolidada e depende do desenvolvimento de tecnologias que permitam a realização de experimentos mais apropriados. Deste modo, esse modelo contribui para a constatação de que tipos de experimentos poderiam ser realizados e, a partir de sua realização e definição dos parâmetros, o modelo seria alimentado e corrigido. Esse ciclo continua até que se obtenha um modelo que prediga a dinâmica de cálcio nos astrócitos adequadamente e, a partir da mesma, possa se fazer inferências sobre a função desempenhadas pelos astrócitos no processamento da informação cerebral.

5.2.3 Rede de astrócitos

A fim de verificar o comportamento dos astrócitos em rede, realizou-se a simulação de uma rede inspirada em um experimento desenvolvido por Fields e Stevens-Graham (2002). Esses autores disponibilizaram um vídeo a partir do qual é possível observar a onda de cálcio avançando nas células, conforme pode ser observado em quadros retirados no vídeo na figura 55.

As regiões iluminadas correspondem a locais onde a concentração de cálcio atingiu o limiar capaz de ser detectado por um leitor de fluorescência.

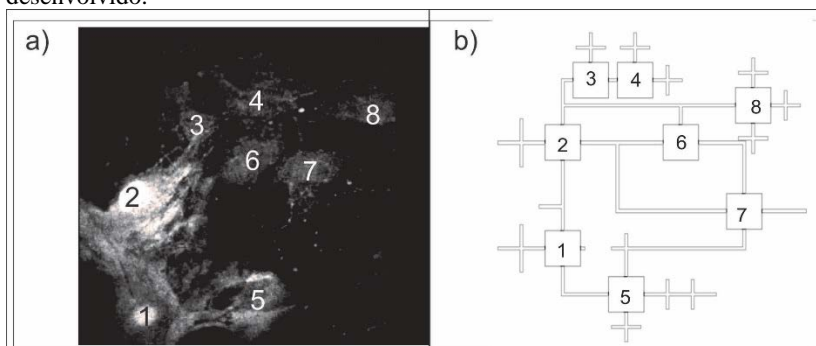
Figura 55 - Quadros retirados do vídeo de Fields e Stevens-Graham (2002) mostrando o avanço da onda de cálcio em uma rede de astrócitos.



Fonte: adaptado de Fields e Stevens-Graham (2002).

A primeira etapa para a simulação da rede é a decisão da disposição espacial adotada para as células e suas ramificações, que pode ser observada na figura 56.

Figura 56 - Rede de astrócitos utilizada a) no experimento de Fields e Stevens-Graham (2002) e b) na simulação realizada no programa computacional desenvolvido.



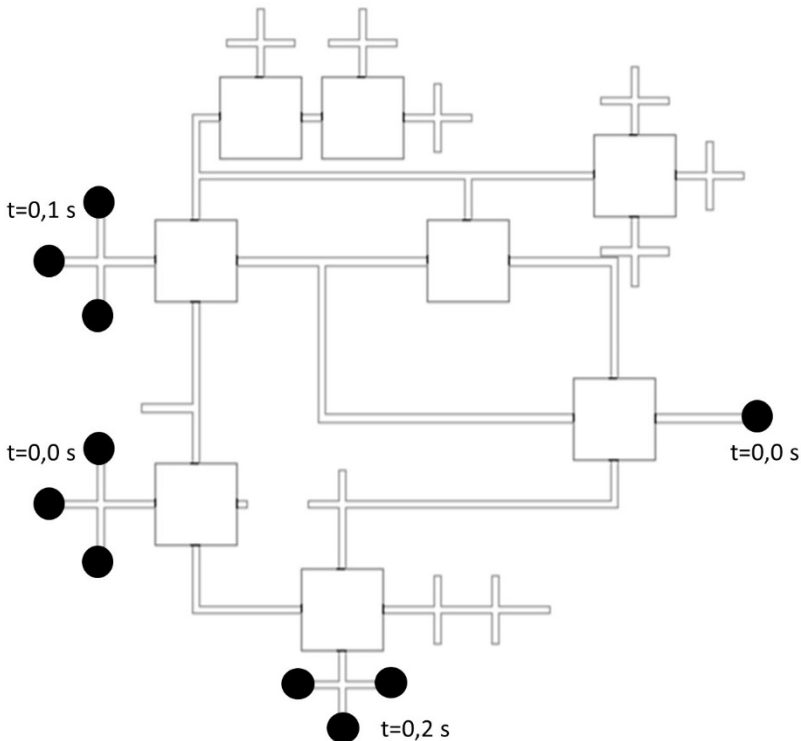
Fonte: a) Fields e Stevens-Graham (2002), b) programa computacional desenvolvido pelo autor.

A concentração de glutamato agora não varia em todo o meio extracelular, e sim nas fendas sinápticas em que ocorre transmissão sináptica. Deste modo, optou-se por alocar as sinapses em locais específicos, identificados na figura 57 por pontos pretos. Além disso, considerou-se que as sinapses ocorrem em momentos distintos, também destacados nesta figura.

A concentração de glutamato do regime estacionário na fenda é de $3 \mu M$ (DANBOLT, 2001). Considerando que uma média de 4000 moléculas sejam liberadas na fenda durante a transmissão sináptica e que ela apresente um volume de $2,0 \cdot 10^6 \text{ nm}^3$, a concentração atinge $4003 \mu M$ (ALLAM *et al.*, 2012). Para representar essa variação, supôs uma curva senoidal para a concentração de glutamato. Essa curva é interessante, pois, ao se desprezar a parte negativa, é possível garantir um período refratário para a célula. A figura 58 apresenta a curva de glutamato e a parte sombreada corresponde a parte desprezada da curva.

O tempo de oscilação e fechamento dos canais deve ser coerente com essa nova ordem de grandeza temporal. Deste modo, considerou-se o período de oscilação de 2 s e tempo de fechamento de 1,0 s que corresponde ao momento em que a curva de glutamato retorna ao valor do regime estacionário.

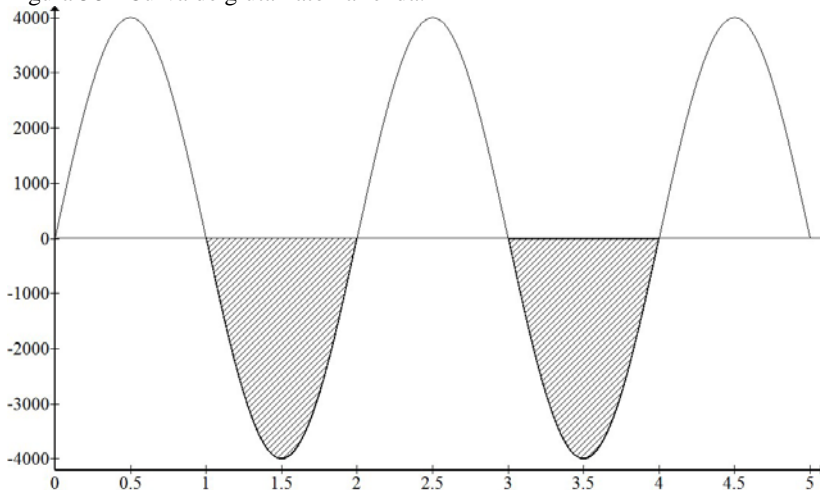
Figura 57 - Rede de astrócitos simulada computacionalmente. Os pontos pretos indicam ramificações de astrócitos que envolvem fendas nas quais ocorrerá transmissão sináptica.



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

Os parâmetros utilizados foram os mesmos descritos no item 5.2.2 com exceção dos produtos $k_{produção} * f_{área}^{produção}$ e $h_{liberação} * f_{área}^{liberação}$, que assumem os valores $8.10^{-15} \frac{\mu mol}{\mu m^2 s}$ e $5 \frac{\mu m}{s}$, respectivamente. Essa modificação é necessária, pois agora a variação de cálcio tem que atingir os mesmos patamares em um intervalo de tempo menor.

Figura 58 - Curva de glutamato na fenda.



Fonte: desenvolvida pelo autor.

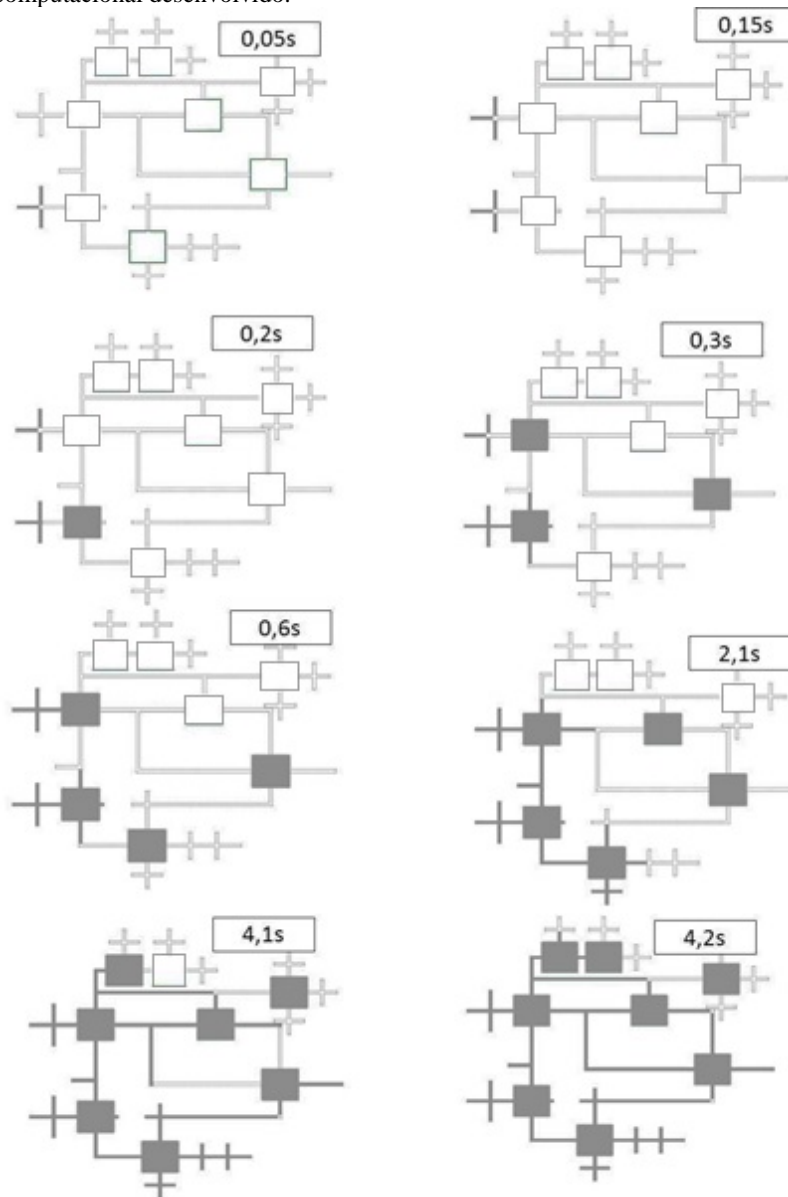
A figura 59 mostra o avanço da onda de cálcio nos astrócitos. As células que estão acesas (coloridas) atingiram um limiar acima de 5% da concentração inicial de cálcio.

Observa-se que, para o modelo proposto, as ondas de cálcio apresentam um comportamento qualitativo coerente, pois avançam ao longo da rede adequadamente em um intervalo de tempo razoável.

Vale destacar que, as células que acenderam antes de suas conexões acenderem, tiveram o inicial aumento da concentração intracelular de cálcio devido à liberação de cálcio do retículo endoplasmático, corroborando a hipótese que o IP_3 é o principal composto que contribui para as ondas de cálcio nos astrócitos.

Embora o tempo para propagação da onda tenha sido de 4,2 s, enquanto o vídeo de Fields e Stevens-Graham (2002) mostra um avanço em menos de 1 s, ainda sim é possível afirmar que o modelo proposto está em concordância com os resultados experimentais. A fim de melhorar esse resultado seria necessário conhecer aspectos estruturais da rede de Fields e Stevens-Graham (2002) tais como as conexões entre os astrócitos e as localizações da sinapse. A dinâmica do sistema tais como a localização e o momento das transmissões sinápticas.

Figura 59 - Evolução da onda de cálcio nos astrócitos obtida a partir do programa computacional desenvolvido.



Fonte: programa computacional desenvolvido pelo autor.

Além disso, vale destacar que o artigo de Fields e Stevens-Graham (2002) dá ênfase justamente ao papel do *ATP* na propagação das ondas de cálcio nos astrócitos, o qual não foi incorporado ao modelo proposto. Deste modo, caso esse composto fosse considerado, a onda avançaria mais rapidamente, possivelmente atingindo a escala de tempo dos autores.

6 CONCLUSÃO

Um modelo matemático que descreve bidimensionalmente a sinalização de cálcio induzida por estímulo glutamatérgico em astrócitos foi proposto através de uma abordagem fenomenológica e biológica. Alguns parâmetros do modelo foram extraídos da literatura e outros foram ajustados. A partir desse ajuste foi possível comparar os resultados do modelo com um resultado experimental descrito na literatura e houve coerência entre eles.

Evidentemente, os parâmetros do modelo necessitam ser calculados a partir de resultados experimentais, que ainda são escassos na área em estudo. Todavia, o modelo contribuiu para que se identificassem essas necessidades, para posterior desenvolvimento de técnicas experimentais.

Foi possível também, a partir do modelo desenvolvido, verificar a consistência de sua utilização em redes de astrócitos, predizendo o comportamento de ondas de cálcio em astrócitos a partir de estímulos glutamatérgicos. Essa abordagem é interessante, uma vez que o laboratório em que a pesquisa está sendo desenvolvida trabalha com redes de neurônios. Assim, essas redes poderão, futuramente, ser acopladas e a função dos astrócitos no processamento da informação cerebral poderá ser discutida com bastante propriedade.

O aplicativo computacional desenvolvido é versátil quanto às geometrias a serem simuladas e às possibilidades de condições de contorno. Embora ainda esteja em construção, já apresenta ferramentas interessantes para análises diversas.

Deste modo, o presente trabalho representou um avanço no estudo sobre as ondas de cálcio em redes de astrócitos, as quais já foram detectadas experimentalmente. Os resultados obtidos se assemelharam, qualitativa e quantitativamente, aos dados existentes em artigos experimentais recentes. Todavia, ainda há muitas possibilidades de melhora e avanço na pesquisa, conforme explicitado a seguir.

6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar experimentos que permitam estimar os parâmetros do modelo mais adequadamente;
- Elaborar um modelo tridimensional para as ondas de cálcio;
- Propor uma equação adequada para a descrição da abertura e fechamento dos canais iônicos, uma vez que

esse processo é bastante complexo e não se encontra na literatura equações adequadas e fenomenológicas.

- Incorporar outros fenômenos no modelo, tais como a ativação de receptores ionotrópicos por *ATP* e abertura de canais sensíveis à rianodina na membrana do retículo endoplasmático;
- Elaborar uma interface gráfica mais simples, onde o usuário possa desenhar a geometria (não mais escrevê-la em sub-rotinas) e o programa a transforme nos dados de entrada que ele necessita;
- Criar um banco de funções que descrevam os diversos fenômenos que os astrócitos participam a fim de que o usuário possa selecionar somente aqueles que deseja considerar. A disponibilização do aplicativo na internet, que está prevista para esse ano, contribuirá para a criação desse banco;
- Melhorar a saída de dados do aplicativo de modo que se tenha uma visualização clara do avanço da sinalização de cálcio;
- Relacionar as ondas de cálcio à liberação de compostos no meio extracelular;
- Incorporar os astrócitos em redes neuronais e verificar o comportamento de ambas as células, permitindo, deste modo, conclusões mais concretas sobre as funções dos astrócitos no processamento da informação cerebral.

REFERÊNCIAS

- ABCAM DISCOVERY MORE. Anti-GFAP antibody - Astrocyte Marker (ab16997). Disponível em: <http://www.abcam.com/gfap-antibody-astrocyte-marker-ab16997.html#description_images_1>. Acesso em: 20 maio 2015.
- AHMED, Z.; LEWIS, C. A.; FABER, D. S. Glutamate stimulates release of Ca²⁺ from internal stores in astroglia. *Brain Research*, v. 516, n. 1, p.165-169, 1990.
- AGULHON, Cendra; SUN, Min-Yu; MURPHY, Thomas; MYERS, Timothy; LAUDERDALE, Kelli; FIACCO, Todd. Calcium signaling and gliotransmission in normal vs. reactive astrocytes. *Frontiers in pharmacology*, v. 3, p. 1-16, jul. 2012.
- ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. *Molecular biology of the cell*. 5. ed. New York: Garland Science, 2008.
- ALLAM, Sushmita L; GHADERI, Viviane; BOUTEILLER, Jean-Marie; LEGENDRE, Arnaud; AMBERT, Nicolas; GREGET, Renaud; BISCHOFF, Serge; BAUNDRY, Michel; BERGER, Theodore. A Computational Model to Investigate Astrocytic Glutamate Uptake Influence on Synaptic Transmission and Neuronal Spiking. *Frontiers In Computational Neuroscience*, v. 6, p.1-16, out. 2012. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fncom.2012.00070.
- AMIRI, Mahmood; BAHRAMI, Fariba; JANAHMADI, Mahyar. Functional modeling of astrocytes in epilepsy: a feedback system perspective. *Neural Computing and Applications*, v. 20, p.1131-1139, 2011.
- BEAR, Mark; CONNORS, Barry; PARADISO, Michael. **Neurociências**: desvendando o sistema nervoso. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BERGLES, Dwight; JAHR, Craig. Glial contribution to glutamate uptake at schaffer collateral–commissural synapses in the

hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, v. 18, p. 7709-7716, 1 out. 1998.

BERRIDGE, M. J., *Cell Signalling Biology*; doi:10.1042/csb0001006, 2014.

BEVAN, Stuart; CHIU, S. Y.; GRAY, P. T. A.; RITCHIE, J. M. The presence of voltage-gated sodium, potassium and chloride channels in rat cultured astrocytes. *Proceedings Royal Society B: biological sciences*, v. 225, p.299-313, 23 set. 1985.

BIRD, Robert Byron; STEWART, Warren Earl; LIGHTFOOT, Edwin. *Fenômenos de Transporte*. 2. ed. Rio de Janeiro: Ltc, 2012.

BLAUSTEIN, Mordecai; KAO, Joseph; MATTESON, Donald (Ed.). *Cellular physiology and neurophysiology*. 2. ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2012.

BLENDER ARTISTS. 3D molecule. Disponível em: <<http://blenderartists.org/forum/index.php>>. Acesso em: 04 maio 2015.

BUSHONG, Eric; MARTONE, Maryann; JONES, Ying; ELLISMAN, Mark. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of Neuroscience*, v. 22, n. 1, p. 183-192, 1 jan. 2002.

CLAPHAM, David. Calcium signalling. *Cell*, v. 80, p.259-268, 27 jan. 1995.

CORNELL-BELL, Ann; FINKBEINER, Steve. Ca^{2+} waves in astrocytes. *Cell Calcium*, v. 12, p.185-204, 1991.

DANBOLT, Niels. Glutamate uptake. *Progress In Neurobiology*, v. 65, p.1-105, 2001.

DEITMER, J. W.; VERKHRATSKY, Alexei. J.; LOHR, C. Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium*, v. 24, p.405-416, 1998.

DITYATEV, Alexander; RUSAKOV, Dmitri. Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 21, p.353-359, 2011.

DUPONT, G.; GOLDBETER, A. One-pool model for Ca^{2+} oscillations involving Ca^{2+} and inositol 1,4,5-trisphosphate as coagonists for Ca^{2+} release. *Cell calcium*, v. 14, p. 311-322, 1993.

DURÁN, José Henrique Rodas. *Biofísica: conceitos e aplicações*. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2011.

FIELDS, Douglas. A outra metade do cérebro. *Scientific American Brasil*, v. 24, n. 2, p.47-53, maio 2004.

FIELDS, Douglas; STEVENS-GRAHAM, Beth. ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends in Neurosciences*, v. 23, n. 12, p. 625-633, 2000.

FIELDS, Douglas; STEVENS-GRAHAM, Beth. New insights into neuron-glia communication. **Science**, v. 298, p.556-562, 18 out. 2002.

FRANKE, Heike; ILLES, Peter. Involvement of P_2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 109, n. 3, p.297-324, mar. 2006.

GECK, Peter; HEINZ, Erich. Secondary active transport. *Kidney International*, v. 36, p.334-341, 1989.

GOLOVINA, Vera; BLAUSTEIN, Mordecai. Unloading and refilling of two classes of spatially resolved endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores in astrocytes. *Glia*, v. 31, p. 15-28, 2000.

GOLOVINA, Vera; BLAUSTEIN, Mordecai. Spatially and functionally distinct Ca^{2+} stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science*, v. 275, p. 1643-1648, 14 mar.1997.

HÖFER, Thomas; VENANCE, Laurent, GIAUME, Christian. Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. *The Journal of Neuroscience*, v. 22, n. 12, p. 4850-4859, jun. 2015.

KETTENMANN, Helmut; RANSOM, Bruce Robert. Neuroglia. 2. ed. Oxford University Press, 2004.

KIMELBERG, Harold. Occurrence and functional significance of serotonin and catecholamine uptake by astrocytes. *Biochemical Pharmacology*, v. 35, n. 14, p.2273-2281, 1986.

KOCH, Christof. Biophysics of computation: information processing in single neurons. Oxford University Press, 1998.

KOH, D.-S.; GEIGER, J. R. P; JONAS, P.; SAKMANN, B. Ca^{2+} -permeable AMPA and NMDA receptor channels in basket cells of rat hippocampal dentate gyrus. *Journal of Physiology*, v. 485, n. 2, p.383-402, 1995.

LENT, Roberto. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências. São Paulo: Atheneu, 2001.

LI, Yue-Xian; RINZEL, John. Equations for $InsP_3$ receptor mediated $[Ca^{2+}]_i$ oscillations derived from a detailed kinetic model: a Hodgkin-Huxley like formalism. *Journal of theoretical biology*, v. 166, p. 461-473, 1994.

MACHADO, Angelo Barbosa Monteiro. Neuroanatomia funcional. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

MACVICAR, Brian. Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science*, v. 226, n. 4680, p.1345-1347, 14 dez. 1984.

MAIO, Vito Di. Regulation of information passing by synaptic transmission: a short review. *Brain Research*, v. 1225, p.26-38, 2008.

MARTINEZ-HERNANDEZ, Antonio; BELL, Katherine; NOREMBERG, Michael. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*, v. 195, p.1356-1358, 25 mar. 1977.

MEANS, Shawn; SMITH, Alexander; SHEPHERD, Jason; SHADID, John; FOWLER, John; WOJCIKIEWICK, Richard; MAZEL, Tomas; SMITH, Gregory; WILSON, Bridget. Reaction

Diffusion Modeling of Calcium Dynamics with Realistic ER Geometry. *Biophysical Journal*, v. 91, n. 2, p.537-557, jul. 2006.

MIN, Rogier; MIRKOSANTELO; NEVIAN, Thomas. The computational power of astrocyte mediated synaptic plasticity. *Frontiers In Computational Neuroscience*, v. 6, p.1-15, 01 nov. 2012.

NAVARRETE, Marta; ARAQUE, Alfonso. The Cajal school and the physiological role of astrocytes: a way of thinking. *Frontiers in Neuroanatomy*, v. 8, p.1-5, 2014.

NAVARRETE, Marta; PEREA, Gertrudis; SEVILLA, David Fernandez de; GÓMEZ-GONZALO, Marta; NÚÑEZ, Angel; MARTÍN, Eduardo; ARAQUE, Alfonso. Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *Plos Biology*, v. 10, n. 2, p.1-12, fev. 2012.

NEARY, Joseph; VAN BREEMEN, C.; FORSTER, E.; NOREMBERG, Luz-Oliva; NOREMBERG, Michael. ATP stimulates calcium influx in primary astrocyte cultures. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, v. 157, n. 3, p.1410-1416, 30 dez. 1988.

OBERHEIM, Nancy Ann; TAKANO, Takahiro; HAN, Xiaoning; HE, Wei; LIN, Jane; WANG, Fushun; XU, Qiwu; WYATT, Jeffrey; PILCHER, Webster; OJEMANN, Jeffrey; RANSOM, Bruce; GOLDMAN, Steven; NEDERGAARD, Maiken. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 10, p. 3276-3287, mar. 2009.

PARRI, Harri Rheinallt; GOULD, Timothy Michael; CRUNELLI, Vincenzo. Spontaneous astrocytic Ca^{2+} oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nature Neuroscience*, v. 4, n. 8, p.803-812, ago. 2001.

PARPURA, Vladimir; GRUBIŠIĆ, Vladimir; VERKHRATSKY, Alexei. Ca^{2+} sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1813, p.984-991, 2011.

PEREA, Gertrudis; NAVARRETE, Marta; ARAQUE, Alfonso. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neuroscience*, v. 32, n. 8, p.421-431, ago. 2009.

PEREA, Gertrudis; SUR, Mriganka; ARAQUE, Alfonso. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 8, n. 378, p.1-8, nov. 2014.

POSTNOV, D. E.; KORESHKOV, R. N.; BRAZHE, N. A.; BRAZHE, A. R.; SOSNOVTSEVA, O. V. Dynamical patterns of calcium signaling in a functional model of neuron-astrocytes networks. *Journal of Biological Physics*, v. 35, p. 425-445, 2009.

PURVES, Dale; AUGUSTINE, George; FITZPATRICK, David; HALL, William; LAMANTIA, Anthony-Samuel; MCNAMARA, James; Williams, Mark. *Neuroscience*. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2004.

SANTELLLO, Mirko; VOLTERRA, Andrea. Synaptic modulation by astrocytes via Ca^{2+} -dependent glutamate release. *Neuroscience*, v. 158, p.253-259, 2009.

SOMJEN, George. Physiology of glial cells. In: SALÁNKI, J. *Physiology of non-excitabile cells*. Pergamon Press, 1980. p. 23-43.

SOMJEN, George. Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia*, v. 1, n. 1, p.2-9, 1988.

STANFIELD, Cindy. *Fisiologia humana*. 5. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2013.

ULLAH, Ghanim; JUNG, Peter; CORNELL-BELL, Ann. Anti-phase calcium oscillations in astrocytes via inositol (1,4,5)-trisphosphate regeneration. *Cell calcium*, v. 39, p. 197-208, 2006.

ULLAH, Ghanim; JUNG, Peter. Modeling the statistics of elementary calcium release events. *Biophysical Journal*, v. 90, p.3485-3495, maio 2006.

VERKHRATSKY, Alexei. Glial calcium signaling in physiology and pathophysiology. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 27, n. 7, p.773-780, jul. 2006.

VERKHRATSKY, Alexei; NEDERGAARD, Maiken; HERTZ, Leif. Why are astrocytes important? *Neurochemical Research*, v. 40, p.389-401, 2015.

VERKHRATSKY, Alexei; PARPURA, Vladimir. Store-operated calcium entry in neuroglia. *Neuroscience Bulletin*, v. 30, n. 1, p.125-133, 2014.

VERKHRATSKY, Alexei; RODRÍGUEZ, José; PARPURA, Vladimir. Calcium signalling in astroglia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 353, p.45-56, 2012.

VERKHRATSKY, Alexei; STEINHÄUSER, Christian. Ion channels in glial cells. *Brain Research Reviews*, v. 32, p.380-412, 2000.

VOLTERRA, Andrea; LIAUDET, Nicolas; SAVTCHOUK, Iaroslav. Astrocyte Ca²⁺ signalling: an unexpected complexity. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 15, p. 327-335, maio 2014.

VOLTERRA, Andrea; MELDOLESI, Jacopo. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, p.626-640, ago. 2005.

WADE, John; MCDAID, Liam; HARKIN, Jim; CRUNELLI, Vincenzo; KELSO, Scott. Bidirectional coupling between astrocytes and neurons mediates learning and dynamic coordination in the brain: a multiple modeling approach. *PLoS One*, v. 6, n. 12, dez. 2011.

WEISS, James. The Hill equation revisited: uses and misuses. *The FASEB Journal*, v. 11, 835-841, 1997.

WU, Yu-Wei; TANG, Xiaofang; ARIZONO, Misa; BANNAI, Hiroko; SHIH, Pei-Yu; DEMBITSKAYA, Yulia; KAZANTSEV, Victor; TANAKA, Mika; ITOHARA, Shigeyoshi; MIKOSHIBA,

Katsuhiko; SEMYANOV, Alexey. Spatiotemporal calcium dynamics in single astrocytes and its modulation by neuronal activity. *Cell calcium*, v. 55, p. 119-129, 2014.

YELLEN, Gary. The voltage-gated potassium channel and their relatives. *Nature*, v. 419, p. 35-42, 5 set. 2002.

APÊNDICE A – Arquivos de entrada para geração de diferentes geometrias

Arquivo de entrada de dados para geração da geometria representada na figura 33.

structure01

Region	Geometry	Dimensions (um)		malha	Bound.		Cond.		IP3		Bound.		Cond.		Ca
		x	y		x0	xL	y0	yL	x0	xL	x0	xL			
1	1	4.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	4	10	2	2			
2	1	5.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	4	2	2			
3	1	4.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2			
4	1	5.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	4	10	2	2			
5	1	3.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	4	2	2			
6	1	4.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2			
7	1	3.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	4	10	2	2			
8	1	5.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	4	10	2	2			
9	1	4.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	4	2	2			
10	1	5.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	4	2	2			
11	1	4.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2			
12	1	3.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	4	10	2	2			
13	1	3.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	4	2	2			
14	1	4.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2			
15	1	3.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	4	10	2	2			
16	1	4.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2			
17	1	3.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	4	2	2			
18	1	4.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2			
19	1	5.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	4	10	2	2			
20	1	5.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	4	2	2			
21	1	4.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	4	10	2	2			
22	1	4.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2			
23	1	3.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	4	2	2			
24	1	4.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2			
25	1	3.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	4	10	2	2			
26	1	5.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	4	2	2			
27	1	5.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	4	2	2			
28	1	4.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	4	10	2	2			
29	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10			
30	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10			
31	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10			
32	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10			
33	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10			
35	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10			
35	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10			
36	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10			
37	3	8.00D0	8.00D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10			

Network01

Cube	x0	y0	xL	yL
29	1	2	3	4
30	3	5	6	7
31	8	9	10	11
32	12	11	13	14
33	15	16	17	18
34	19	18	20	21
35	22	23	24	25
36	24	26	27	28
37	6	14	22	16

Arquivo de entrada de dados para geração da geometria representada na figura 34.

structure01

Region	Geometry	Dimensions (um)		malha	Bound. Cond. IP3				Bound. Cond. Ca			
		x	y		x0	xL	y0	yL	x0	xL	x0	xL
1	1	5.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	3	10	2	2
2	1	5.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	3	10	2	2
3	1	8.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
4	1	5.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	3	2	2
5	1	8.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	3	2	2
6	1	10.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
7	1	30.0D0	1.00D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
8	1	20.0D0	1.00D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
9	1	8.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	3	2	2
10	1	5.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
11	1	3.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	3	10	2	2
12	1	3.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	3	2	2
13	1	5.0D0	1.00D0	1	10	3	2	2	10	3	2	2
14	1	8.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
15	1	5.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	3	10	2	2
16	1	5.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	3	2	2
17	1	10.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
18	1	10.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
19	1	5.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
20	1	5.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	3	10	2	2
21	1	5.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
22	1	5.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2
23	1	8.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	3	10	2	2
24	1	5.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
25	1	5.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	3	2	2
26	1	5.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	3	10	2	2
27	1	5.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
28	2	0.70D0	0.70D0	1	10	2	10	10	10	2	10	10
29	2	0.70D0	0.70D0	1	2	10	10	10	2	10	10	10
30	2	0.70D0	1.00D0	1	10	2	10	10	10	2	10	10
31	2	0.70D0	0.70D0	1	2	10	10	10	2	10	10	10
32	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	2	10	10	10	2
33	2	0.70D0	1.00D0	1	10	2	10	10	10	2	10	10
34	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	2	10	10	10	2
35	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	2	10	10	10	2	10
36	2	0.70D0	0.70D0	1	10	2	10	10	10	2	10	10
37	2	0.70D0	0.70D0	1	2	10	10	2	2	10	10	2
38	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	2	10	10	10	2
39	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	2	10	10	10	2	10
40	3	8.00D0	8.00D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10

Network01

Cube	x0	y0	xL	yL
28	1	0	3	2
29	0	5	4	6
30	7	0	8	27
31	0	27	9	10
32	11	10	12	0
33	8	0	13	14
34	15	14	16	0
35	19	17	0	18
36	21	0	19	20
37	0	22	21	0
38	23	18	24	0
39	24	25	0	26
40	3	6	7	17

Arquivo de entrada de dados para geração da geometria representada na figura 35.

structure01

Region	Geometry	Dimensions (um)		malha	Bound.		Cond.		IP3	Bound.		Cond.		Ca
		x	y		x0	xL	y0	yL		x0	xL	x0	xL	
1	1	5.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	3	10	2	2		
2	1	5.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	3	2	2		
3	1	5.0D0	0.70D0	1	3	10	2	2	3	10	2	2		
4	1	5.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
5	1	6.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
6	1	1.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
7	1	5.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
8	1	5.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
9	1	10.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
10	1	5.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
11	1	5.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
12	1	5.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
13	1	5.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
14	1	8.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
15	1	4.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
16	1	26.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
17	1	5.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
18	1	2.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
19	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
20	1	3.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
21	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
22	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
23	1	2.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
24	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
25	1	3.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
26	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
27	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
28	1	3.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
29	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
30	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
31	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
32	1	12.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
33	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
34	1	3.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
35	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
36	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
37	1	3.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
38	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
39	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
40	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
41	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
42	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
43	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
44	1	3.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
45	1	4.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
46	1	10.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
47	1	10.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
48	1	14.65D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
49	1	24.35D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
50	1	4.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
51	1	10.0D0	0.70D0	1	10	3	2	2	10	2	2	2		
52	1	11.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
53	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
54	1	6.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
55	1	26.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
56	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
57	1	10.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
58	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2		
59	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
60	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		
61	1	3.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
62	1	5.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2		
63	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2		

64	1	5.0D0	0.70D0	1	10	10	2	2	10	10	2	2
65	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2
66	1	3.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2
67	1	5.0D0	0.70D0	1	10	2	2	2	10	2	2	2
68	1	3.0D0	0.70D0	1	2	10	2	2	2	10	2	2
69	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
70	2	0.70D0	0.70D0	1	10	2	10	10	10	2	10	10
71	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
72	2	0.70D0	0.70D0	1	2	10	10	10	2	10	10	10
73	2	0.70D0	0.70D0	1	2	10	10	2	2	10	10	2
74	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
75	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
76	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
77	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	2	10	10	10	2
78	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
79	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
80	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
81	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	2	10	10	10	2
82	2	0.70D0	0.70D0	1	2	10	2	10	2	10	2	10
83	2	0.70D0	0.70D0	1	10	2	10	2	10	2	10	2
84	2	0.70D0	0.70D0	1	10	2	2	10	10	2	2	10
85	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
86	2	0.70D0	0.70D0	1	2	10	2	10	2	10	2	10
87	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
88	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
89	2	0.70D0	0.70D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
90	3	8.00D0	8.00D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
91	3	8.00D0	8.00D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
92	3	8.00D0	8.00D0	1	10	10	2	10	10	10	2	10
93	3	8.00D0	8.00D0	1	10	10	2	10	10	10	2	10
94	3	8.00D0	8.00D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
95	3	8.00D0	8.00D0	1	10	10	2	10	10	10	2	10
96	3	8.00D0	8.00D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10
97	3	8.00D0	8.00D0	1	10	10	10	10	10	10	10	10

Network01

Cube	x0	y0	xL	yL
69	1	2	4	3
70	8	7	0	9
71	10	11	12	13
72	0	15	16	17
73	0	17	18	0
74	19	20	21	22
75	24	25	26	27
76	28	29	30	31
77	16	45	32	0
78	33	34	35	36
79	37	38	39	40
80	41	42	43	44
81	14	48	46	0
82	0	0	49	48
83	47	52	0	0
84	55	0	0	50
85	53	54	55	56
86	0	0	57	5
87	58	59	60	61
88	62	63	64	65
89	64	66	67	68
90	4	5	6	7
91	12	9	14	15
92	18	0	23	20
93	23	0	28	25
94	32	44	37	34
95	46	0	47	45
96	49	50	51	52
97	57	61	62	54