



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Thais Appelt Peres Bartiê

**O papel do retículo endoplasmático na sinalização de cálcio nos astrócitos: uma  
abordagem matemática**

Florianópolis  
2021

Thais Appelt Peres Bartiê

**O papel do retículo endoplasmático na sinalização de cálcio nos astrócitos: uma  
abordagem matemática**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química da Universidade Federal de Santa  
Catarina para obtenção do título de Doutora em  
Engenharia Química.  
Orientador: Prof. Leonel Teixeira Pinto, Dr.

Florianópolis

2021

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

Bartiê, Thais Appelt Peres

O papel do retículo endoplasmático na sinalização de cálcio nos astrócitos : uma abordagem matemática / Thais Appelt Peres Bartiê ; orientador, Leonel Teixeira Pinto, 2021.

117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Estímulo glutamatérgico. 3. Dinâmica de canais iônicos. 4. Modelo matemático. 5. Sinalização de cálcio. I. Pinto, Leonel Teixeira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Thais Appelt Peres Bartiê

**O papel do retículo endoplasmático na sinalização de cálcio nos astrócitos: uma abordagem matemática**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

---

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado  
Membro interno – POSENQ/UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Carvalho Alcântara Gomes  
Membro externo – PPGCM/UFRJ

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Soares Silvado  
Membro externo – UFPR

---

Prof. Dr. Marcelo Henrique Romano Tragtenberg  
Membro externo – PPGF/UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Engenharia Química.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora de Oliveira  
Coordenadora do Programa

---

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto  
Orientador

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2021

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu marido por ser minha melhor metade e, por vezes, nesses últimos anos, ter se tornado a outra metade para que eu chegasse até aqui.

Agradeço aos meus pais, que têm abdicado de muitos projetos pessoais para apoiarem o meu projeto profissional. Agradeço também aos meus irmãos, que apoiam minha jornada.

Agradeço especialmente à minha amiga, Danifer, que me ensina todos os dias sobre resiliência e antifragilidade.

Agradeço ao Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto pelo empenho para que eu finalizasse esse projeto.

Agradeço também ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A complexidade dos processos envolvendo a sinapse tripartite ainda não permitiu uma conclusão definitiva sobre todas as funções que os astrócitos desempenham no processamento da informação cerebral. A sinalização de cálcio se mostra como o principal elemento capaz de elucidar essa questão, mas os resultados experimentais envolvendo esse fenômeno são discrepantes. Diante disso, o uso de modelos matemáticos tem sido uma alternativa para auxiliar na compreensão dos dados experimentais, identificando os mecanismos envolvidos e os limites dos métodos utilizados. Assim, o objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de um modelo matemático fenomenológico e biologicamente coerente para prever a dinâmica da sinalização do cálcio a partir de estímulos glutamatérgicos em astrócitos. Este modelo e sua implementação computacional são uma ferramenta para estudos futuros sobre as funções desta célula. A flexibilidade do modelo permite o estudo de geometrias complexas, bem como a fácil adaptação às diferentes situações experimentais com as quais o modelo pode ser comparado. Além disso, uma análise de sensibilidade paramétrica levou à conclusão de que vários conjuntos de parâmetros levam à mesma dinâmica de sinalização de cálcio. Esse resultado evidencia a vulnerabilidade dos parâmetros comumente usados na literatura para modelar a sinalização do cálcio em astrócitos. Por fim, avaliou-se o efeito do retículo sobre os ramos e concluiu-se que, quando localizados nas extremidades dos ramos, favorecem a dinâmica local do cálcio, bem como a propagação mais rápida da sinalização global. Essa contribuição na dinâmica local requer mais estudos, provavelmente envolvendo a liberação de gliotransmissores.

**Palavras-chave:** Estímulo glutamatérgico. Dinâmica de canais iônicos. Modelo matemático. Sinalização de cálcio.

## ABSTRACT

The complexity of the processes in the tripartite synapse has not yet allowed a conclusion on all the functions that astrocytes perform in brain information processing. Calcium signaling is the focus of the study to elucidate this issue, but the experimental results involving this phenomenon are divergent. Facing this, the use of mathematical models has been an alternative to help in the understanding of the experimental data, identifying the mechanisms involved and the limits of the methods used. Thus, the objective of the present work is the development of a phenomenological, biologically coherent mathematical model to predict the dynamics of calcium signaling from glutamatergic stimuli in astrocytes. This model and its computational implementation are a tool for further studies on the functions of this cell. The flexibility of the model allows the study of complex geometries, as well as the easy adaptation to different experimental situations with which the model can be compared. In addition, a parametric sensitivity analysis led to the conclusion that several set of parameters lead to the same dynamics of calcium signaling. This encourages the questioning of the parameters commonly used in the literature for modeling the signaling of calcium in astrocytes. Finally, the effect of the reticulum on the branches was evaluated and it was concluded that, when they are located at the ends of the branches, they favors local calcium dynamics as well as faster propagation of global signaling. This contribution in local dynamics requires further studies, probably involving the release of gliotransmitters.

**Keywords:** Glutamatergic stimulus. Ionic channels dynamics. Mathematical modeling. Calcium signaling.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação entre número de artigos disponíveis para pesquisa no Google Acadêmicos com a palavras "astrocytes" e com a palavra "neurons".....	15
Figura 2 - Mecanismos de sinalização do cálcio considerados no modelo matemático.....	32
Figura 3 - – Esquema da representação geométrica do astrócito. ....	37
Figura 4 - Concentração de glutamato ao longo do tempo. Função definida para $\sigma = 10ms$ e $\delta = 1000\mu M$ . ....	44
Figura 5 - Dinâmica do cálcio e do $IP_3$ . O gráfico mostra a dinâmica das concentrações médias de cálcio e $IP_3$ no citosol e a concentração de cálcio no retículo endoplasmático. ....	45
Figura 6 - Efeito dos três parâmetros livres nos valores de $\bar{y}_{cit,máx}^C$ e $t_C$ . ....	47
Figura 7 - Dinâmica das concentrações médias de $Ca^{2+}$ e $IP_3$ no citosol em função do coeficiente global da taxa de produção do $IP_3$ . ....	48
Figura 8 - Dinâmica das concentrações médias de $Ca^{2+}$ e $IP_3$ em função do coeficiente de degradação do $IP_3$ . ....	50
Figura 9 - Dinâmica das concentrações médias adimensionais de $Ca^{2+}$ no citosol e no RE em função do coeficiente de transferência de massa dos canais ligantes da membrana do RE. ....	51
Figura 10 - Comparação entre a dinâmica da concentração de cálcio no retículo endoplasmático, obtida com e sem a ativação de canais TRPC. ....	51
Figura 11 - Tempo de abertura do canal ativado por $IP_3$ em diferentes pontos do contorno da membrana do RE. ....	52
Figura 12–Efeito do comprimento do RE na massa de $IP_3$ que deixa o ramo do astrócito. ....	53
Figura 13 - Efeito do comprimento do RE na concentração adimensional de $Ca^{2+}$ no ramo do astrócito. ....	54
Figura 14 - Efeito do comprimento do RE na massa de $Ca^{2+}$ que deixa o ramo do astrócito. ....	55
Figura 15 -Efeito dos parâmetros no fluxo de cálcio através dos canais acoplados a receptores ionotrópicos. ....	56
Figura 16 - O Fluxo de cálcio através dos canais de cálcio acoplados a receptores ionotrópicos de $IP_3$ . ....	57
Figura 17 - O fluxo de cálcio através de um único canal acoplado a um receptor ionotrópico de $IP_3$ . ....	58
Figura 18 - Configurações geométricas implementadas computacionalmente e comparadas para analisar o efeito do retículo endoplasmático nos ramos do astrócitos. ....	59

Figura 19 - Saída instantânea do fluxo de $IP_3$ no final do ramo direito.....	60
Figura 20 - O fluxo de cálcio na membrana celular onde ocorre o estímulo. ....	60
Figura 21 - O fluxo de cálcio na membrana celular no ramo direito.....	61
Figura 22 - Cálcio acumulado na membrana celular no ramo direito. ....	62
Figura 23 - Fluxo através da conexão entre o lado esquerdo ramo e o corpo celular. ....	63
Figura 24 - Fluxo através da conexão entre o ramo direito e o corpo celular. ....	63
Figura 25 - Fluxo através da conexão entre o ramo esquerdo e o corpo celular em comparação a uma situação em que o retículo não libera cálcio. ....	64
Figura 26 - Fluxo através da conexão entre o ramo esquerdo e o corpo celular, em comparação com uma situação em que o retículo não libera cálcio. ....	64

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Parâmetros do modelo.....	41
--------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
Ca <sup>2+</sup>	Íons de cálcio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
i-GluR	Receptor ionotrópico de glutamato
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
LIF	Fator inibitório de leucemia
m-GluR	Receptor metabotrópico de glutamato
Na <sup>+</sup>	Íons de sódio
RE	Retículo endoplasmático
SOCE	Entrada de cálcio operada por estoque
STIM	Moléculas de interação estromal
TRPC	Canais receptores de potencial transitório

## LISTA DE SÍMBOLOS

$C_{cit}$	Concentração de cálcio no citosol
$C_{cit}^*$	Concentração de cálcio de repouso no citosol
$\bar{C}_{cit}$	Concentração média de cálcio no citosol
$C_{RE}$	Concentração de cálcio no retículo endoplasmático
$C_{RE}^*$	Concentração de cálcio de repouso no retículo endoplasmático
$\bar{I}_{cit}$	Concentração média de $IP_3$ no citosol
$C_{fs}$	Concentração de cálcio na fenda sináptica
$dA_{MC}$	Elemento de área da membrana celular
$dA_{MRE}$	Elemento de área da membrana do retículo endoplasmático
$D_C$	Difusividade do cálcio no citosol
$D_I$	Difusividade de $IP_3$ no citosol
$f_{MC}^p$	Fração de área da membrana celular que produz $IP_3$
$f_{MRE}^d$	Fração de área do retículo endoplasmático que ocorre a degradação de $IP_3$
$f_{MC}^{cl}$	Fração de área da membrana celular ocupada por canais ligantes
$f_{MRE}^{cl}$	Fração de área do retículo endoplasmático ocupada por canais ligantes
$f_{MC}^{cp}$	Fração de área da membrana celular ocupada por canais passivos
$f_{MRE}^{cp}$	Fração de área do retículo endoplasmático ocupada por canais passivos
$f_{MC}^{bb}$	Fração de área da membrana celular ocupada por bombas de cálcio
$f_{MRE}^{bb}$	Fração de área do retículo endoplasmático ocupada por bombas de cálcio
$G_{fs}$	Concentração de glutamato na fenda sináptica
$G_{fs}^*$	Concentração de glutamato de repouso na fenda sináptica
$h^d$	Coefficiente de degradação de $IP_3$
$h_{MC}^{cl}$	Coefficiente de transferência de massa dos canais ligantes da membrana celular
$h_{MRE}^{cl}$	Coefficiente de transferência de massa dos canais ligantes do retículo endoplasmático
$h_{MC}^{cp}$	Coefficiente de transferência de massa de canais passivos da membrana celular
$h_{MRE}^{cp}$	Coefficiente de transferência de massa de canais passivos do retículo endoplasmático
$I_{cit}$	Concentração de $IP_3$ no citosol
$I_{cit}^*$	Concentração de $IP_3$ de repouso no citosol
$K^p$	Taxa máxima de produção de $IP_3$
$k_{p,c}$	Constante de dissociação para estimulação de cálcio para produção de $IP_3$
$k_{p,g}$	Constante de dissociação para estimulação de glutamato para produção de $IP_3$
$K_{MC}^{bb}$	Taxa máxima de fluxo de bomba na membrana celular

$K_{MRE}^{bb}$	Taxa máxima de fluxo de bomba no retículo endoplasmático
$k_{bb}$	Constante de saturação de bomba
$ks_C$	Afinidade aparente para o sítio inibidor de cálcio
$Ks_C$	Afinidade aparente para o sítio de ativação de cálcio
$ks_I$	Afinidade aparente para o sítio de ativação de $IP_3$
$ks_G$	Afinidade aparente para o sítio de ativação de glutamato
$n$	Coefficiente de Hill para a produção de $IP_3$
$n_C$	Coefficiente Hill de cálcio
$n_I$	Coefficiente Hill de $IP_3$
$n_G$	Coefficiente Hill de glutamato
$P_G$	Probabilidade de abertura dos canais ativados pelo glutamato
$P_I$	Probabilidade de abertura dos canais ativados pelo $IP_3$
$p_{MC}^{a/f}$	Parâmetro relacionado à abertura do canal na membrana celular (0 – canal fechado; 1 – canal aberto)
$p_{MRE}^{a/f}$	Parâmetro relacionado à abertura do canal na membrana do retículo endoplasmático (0 – canal fechado; 1 – canal aberto)
$S_{MRE}$	Área superficial da membrana do retículo endoplasmático
$t$	Tempo
$t_r$	Tempo refratário dos canais iônicos
$t_a$	Tempo de abertura dos canais iônicos
$t_{test}^p$	Tempo computacional para testar a probabilidade
$u_{MC}^p$	Fluxo mássico de produção de $IP_3$ na membrana celular
$u_{MC}^p$	Fluxo mássico de produção de $IP_3$ na membrana celular
$v_{MC}^{bb}$	Fluxo mássico de cálcio resultado da ação das bombas de cálcio na membrana celular
$v_{MC}^{cl}$	Fluxo mássico de cálcio que atravessa os canais ligantes ativados pelo $IP_3$ na membrana celular
$v_{MC}^{cp}$	Fluxo mássico de cálcio que atravessa os canais passivos na membrana celular
$v_{MRE}^{bb}$	Fluxo mássico de cálcio resultado da ação das bombas de cálcio na membrana do retículo endoplasmático
$v_{MRE}^{cl}$	Fluxo mássico de cálcio que atravessa os canais ligantes ativados pelo $IP_3$ na membrana do retículo endoplasmático
$v_{MRE}^{cp}$	Fluxo mássico de cálcio que atravessa os canais passivos na membrana do retículo endoplasmático
$V_{RE}$	Volume do retículo endoplasmático
$\bar{y}_{cit}^C$	Concentração média adimensional de cálcio no citosol

$\bar{y}_{cit}^I$	Concentração média adimensional de IP <sub>3</sub> no citosol
$y_{RE}^C$	Concentração adimensional de cálcio no retículo endoplasmático
$\sigma$	Amplitude de oscilação do glutamato da fenda sináptica durante um estímulo
$\partial$	Derivada parcial
$\nabla$	Divergente (identidade do cálculo diferencial)
$\delta$	Amplitude de oscilação do glutamato durante um estímulo

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS .....	17
1.1.1	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>17</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
2.1	AS FUNÇÕES DOS NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS.....	18
2.1.1	<b>Neurônios.....</b>	<b>18</b>
2.1.2	<b>Astrócitos .....</b>	<b>19</b>
2.1.3	<b>A comunicação entre astrócitos e neurônios.....</b>	<b>24</b>
2.2	MODELOS MATEMÁTICOS E OS PRINCIPAIS PROBLEMAS ASSOCIADOS À INTERPRETAÇÃO E A DESCRIÇÃO MATEMÁTICA DA SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO	
2.2.1	<b>Modelos matemáticos de sinalização de cálcio em astrócitos .....</b>	<b>29</b>
<b>3.</b>	<b>O MODELO MATEMÁTICO .....</b>	<b>31</b>
3.1	Aspectos relacionados à implementação COMPUTACIONAL.....	36
3.2	Condições de contorno .....	37
3.3	Probabilidade de abertura .....	39
3.4	Valores dos parâmetros do modelo.....	39
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
4.1	SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO NA ESTRUTURA CELULAR SIMPLIFICADA ..	
4.2	ANÁLISE DE SENSIBILIDADE PARAMÉTRICA .....	46
4.2.1	<b>Produção de IP<sub>3</sub>.....</b>	<b>47</b>
4.2.2	<b>Degradação IP<sub>3</sub>.....</b>	<b>49</b>
4.2.3	<b>Liberação de Ca<sup>2+</sup> .....</b>	<b>49</b>
4.2.4	<b>Implicação da incorporação TRPC.....</b>	<b>50</b>
4.2.5	<b>Probabilidade de abertura .....</b>	<b>52</b>
4.2.6	<b>Influência da ER nas ramificações.....</b>	<b>52</b>

<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>APÊNDICE A – Programa computacional desenvolvido .....</b>	<b>75</b>

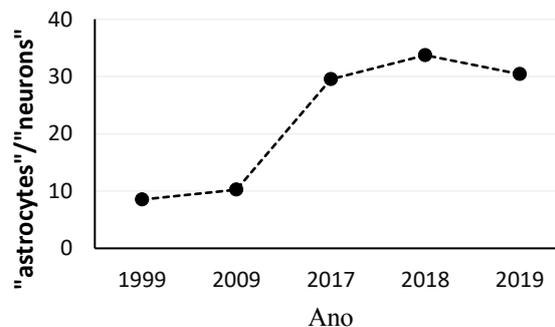
## 1. INTRODUÇÃO

Imagine-se sentado em uma sala escura, diante de um palco coberto por uma cortina. Você escuta uma contagem, e logo em seguida inicia-se uma linda sinfonia. Não é possível visualizar os instrumentos nem os músicos, mas há a certeza de que se está diante de um show – uma apresentação de uma atuação extraordinária, segundo o dicionário. É exatamente dessa forma que nosso grupo de pesquisa costuma pensar o cérebro. Esse órgão é especialista em extraordinárias atuações, mas grande parte do processamento necessário para que elas ocorram está oculto.

Assim como é possível tentar identificar os músicos e instrumentos por trás da cortina, é possível usar artifícios para buscar compreender os elementos que constituem o cérebro e as funções por eles desempenhadas. Esses artifícios têm sido desenvolvidos pela comunidade científica ao longo dos últimos anos e pode, de maneira superficial, ser dividido em duas abordagens: experimental e matemática.

As duas abordagens levaram a comunidade científica a categorizar os neurônios como protagonistas do show. Além disso, já se tem um conhecimento bastante rico no que diz respeito aos mecanismos e fenômenos que neles ocorrem, bem como de suas funções. Nos últimos anos, a abordagem experimental também permitiu vislumbrar o papel dos astrócitos, que por um momento foram reconhecidos como meros coadjuvantes, mas passaram a ocupar a posição de estrelas do show (HERTZ; ZIELKE, 2004). A importância da compreensão das funções dos astrócitos fica evidente quando se avalia a relação entre a quantidade de trabalhos produzidos nos últimos anos com a palavra “astrocytes” e com a palavra “neurons”, conforme ilustra a Fig. 1.

Figura 1 - Relação entre número de artigos disponíveis para pesquisa no Google Acadêmico com a palavra “astrocytes” e com a palavra “neurons”.



Fonte: Autora (2021).

Apesar do reconhecimento da importância dos astrócitos no show empreendido pelo cérebro, muitas de suas funções ainda têm aspectos não elucidados. Nesse sentido, a abordagem matemática tem assumido um papel fundamental. Manninen *et al.* (2018) fizeram uma revisão bibliográfica e localizaram 106 modelos matemáticos desenvolvidos com o intuito de auxiliar a compreensão das funções dos astrócitos no processamento da informação cerebral. Apesar da quantidade expressiva de modelos, muitos deles apresentam alguns problemas que dificultam sua ampla utilização para o estudo dos astrócitos. Dentre eles destaca-se a não reprodutibilidade, a falta de informações claras com relação à escolha dos parâmetros, a falta de comparação com resultados experimentais e o não detalhamento da situação real à qual o modelo está sendo comparado. Todos esses apontamentos não querem dizer que os modelos estão equivocados ou não são relevantes. Elas apenas indicam que é necessária uma reflexão sobre sua forma de construção para que de fato possam ser utilizados para seu objetivo principal.

Diante desse cenário, destaca-se agora a intenção do presente trabalho. O objetivo é desenvolver um modelo matemático para os astrócitos que supere vários dos problemas mencionados. Para isso, é necessário que o modelo seja fenomenológico e flexível, além de ter uma descrição detalhada para que outros pesquisadores possam melhorá-lo e, deste modo, que ele realmente contribua para a compreensão do papel dos astrócitos no processamento da informação cerebral.

Para isso, estruturou-se um programa computacional versátil, que possibilita a análise de geometrias tão complexas quanto se queira, conforme já apresentado na dissertação de mestrado dessa autora (BARTIÊ, 2015). Além disso, é possível alocar retículos endoplasmáticos em várias posições e testar sua influência na sinalização de cálcio. Também é possível estudar redes de astrócitos e, conseqüentemente, as características das ondas de cálcio. A forma como o programa computacional foi desenvolvido possibilita a fácil inclusão de mecanismos que se julgue necessário incorporar. O estudo está focado em estímulos glutamatérgicos, por exemplo, mas é simples o processo de inclusão de canais ativados por ATP (adenosina trifosfato).

Além disso, foi levantado um questionamento com relação aos parâmetros utilizados na literatura para os modelos envolvendo a sinalização de cálcio. Grande parte deles é obtida de comportamento de células como um todo, não para os processos individualmente. Nosso

modelo é diferente nesse sentido, pois incorpora os parâmetros associados a cada mecanismo individualmente.

Acredita-se que o presente modelo seja capaz de contribuir para o avanço dos estudos sobre as funções dos astrócitos no processamento da informação cerebral, pois é capaz de reproduzir as geometrias das células com os quais o modelo será comparado. Além disso, possibilita a incorporação de diversos mecanismos e análises envolvendo retículos com diferentes distribuições na célula. O modelo também auxilia na reflexão sobre possíveis experimentos a serem desenvolvidos e na definição dos limites dos experimentos realizados. Por fim, o modelo permite a obtenção de parâmetros importantes para a futura incorporação de astrócitos em uma rede computacional de astrócitos e neurônios. No grupo de pesquisa do autor, já foi desenvolvido o modelo de uma rede de neurônios excitatórios e inibitórios. O próximo passo é a incorporação dos astrócitos. Para isso são necessários diversos parâmetros que podem ser extraídos do programa computacional aqui desenvolvido.

Finalmente, acreditamos que este trabalho é incapaz de remover a cortina e mostrar o show do cérebro por completo, mas pode contribuir com a elucidação de alguns instrumentos, técnicas e práticas utilizadas pelos astrócitos em suas apresentações.

## 1.1 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.

### 1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um modelo matemático fenomenológico e biologicamente coerente para prever a dinâmica da sinalização do cálcio a partir de estímulos glutamatérgicos em astrócitos.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Apresentar um modelo matemático descrevendo sua implementação computacional;
- Verificar a sensibilidade paramétrica no modelo computacional;
- Descrever simulações para inferir o papel do retículo endoplasmático na sinalização de cálcio nos astrócitos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O cérebro, explica Pérez-Álvares *et al.* (2014), é um conjunto organizado de células que recebe, processa, elabora, transmite e armazena informações. É composto por dois tipos principais de células: neurônios e células gliais. Os neurônios são responsáveis pela função cerebral na elaboração e transmissão de informações. Os astrócitos são um tipo de célula glial em forma de estrela que desempenha funções de suporte nutricional e metabólico para os neurônios. Nos últimos anos, os astrócitos mostraram estar envolvidos no processamento e transmissão de informações durante a atividade neuronal (RIZZOLATTI, 2001). As características de cada uma dessas células, bem como suas interações, serão descritas nesse capítulo.

### 2.1 AS FUNÇÕES DOS NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS

#### 2.1.1 Neurônios

Os três componentes do sistema nervoso (motor, sensitivo e misto ou integral) estão interligados e formados por neurônios, e graças a eles é possível coordenar todas as funções do corpo humano (ROCHAT *et al.*, 2008).

O impulso nervoso acontece como consequência de uma mudança na permeabilidade da membrana plástica, onde as unidades morfológicas podem ser transmissoras de ondas de natureza elétrica. O potencial de membrana é o que permite sua propagação, devido às diferentes concentrações de íons em ambos os lados da membrana. Uma célula inativa mantém sua carga negativa; e isso muda dentro de faixas estreitas (RIZZOLATTI *et al.*, 2001).

Como o potencial de membrana de uma célula excitável despolariza além de certo limiar, um potencial de ação é gerado pela célula. Uma mudança acelerada na polaridade da membrana de negativa para positiva e de volta para negativa é um potencial de ação, que tem uma duração de milissegundos (ROCHAT *et al.*, 2008).

Os pesquisadores ingleses Alan Lloyd Hodgkin e Andrew Fielding Huxley foram os primeiros a registrar em detalhes um potencial de ação, em 1939, percebendo o desenvolvimento no axônio de uma lula. Eles mediram as correntes iônicas que ocorrem durante

esse processo. As fases que compõem o potencial de ação de acordo com os pesquisadores seriam (RIZZOLATTI *et al.*, 2001):

- Potencial de membrana ou em repouso: diferença entre o exterior e o interior de uma célula, geralmente é um potencial negativo que pode ser calculado conhecendo a concentração dos diferentes íons fora e dentro dela;
- Despolarização: parte do processo que provoca a liberação de um sinal elétrico que percorrerá o neurônio para permitir a transmissão de informações pelo sistema nervoso;
- Repolarização: durante este período, após um potencial de ação, o potencial da membrana torna-se mais negativo em comparação quando a célula está em um período de repouso.

O dogma da neurociência ditava, até o final da década de 1980, que apenas os neurotransmissores e as conexões que eram liberadas pelos neurônios eram capazes de determinar a função que um neurônio tinha. O fim desse dogma considerado errôneo veio graças às pesquisas sobre vertebrados apresentadas pelo colombiano Rodolfo Llinás, juntamente com seus colaboradores. Este novo ponto de vista sobre o neurônio ficou conhecido no artigo intitulado "As Propriedades Eletrofisiológicas Intrínsecas dos Neurônios Mamíferos: *Insights* sobre a Função do Sistema Nervoso Central", que é considerado um manifesto que mudou a neurociência no aspecto funcional dos neurônios, conhecida hoje como lei de Llinás (RIZZOLATTI *et al.*, 2001). Nesse estudo é descrito que as células que permitem a neurosecreção são neurônios, cuja especialidade é a secreção de substâncias que são descarregadas nos capilares sanguíneos em vez da fenda sináptica, transportando assim seus produtos através do sangue até os tecidos-avlos. Essa ação ocorre em espécies animais, como insetos, vertebrados, crustáceos, entre outros (ROCHAT *et al.*, 2008).

### 2.1.2 Astrócitos

Astrócitos são células que compartilham o sistema nervoso central com os neurônios e possuem mais capacidades do que a tradicional atribuição de manutenção do cérebro. Especificamente, eles têm um papel regulador na forma como os neurônios transmitem informações e como as armazenam. Pérez-Álvarez *et al.* (2014) definiram essas duas novas funções do tipo mais comum de célula do cérebro. Com isso, novas possibilidades se abrem para conhecer a origem de certas doenças neurodegenerativas, como Parkinson ou Alzheimer.

A pesquisa científica tradicional se concentrou nos neurônios como chave para a compreensão do funcionamento do cérebro, dada sua especialização em receber estímulos e conduzir o impulso nervoso. Até pouco tempo, os neurônios foram responsabilizados por doenças como Alzheimer, Epilepsia ou Parkinson. Recentemente, a perspectiva mudou significativamente: os astrócitos também podem estar envolvidos, por isso é necessário abrir novas linhas de pesquisa para conhecer essas possíveis interações. As estratégias terapêuticas, essencialmente baseadas em neurônios também variam à medida que novas estratégias podem ser desenvolvidas envolvendo os astrócitos (PÉREZ-ALVARES *et al.*, 2014).

Estudos mostram que a atividade neuronal que leva à formação da memória e da aprendizagem não só implica uma modificação na atividade neuronal, como se acreditava anteriormente, mas também altera o arranjo anatômico dos astrócitos que circunda as sinapses (conexões entre neurônios) no hipocampo e no córtex cerebral. Essa mudança estrutural é acompanhada por uma perda da capacidade dos astrócitos de modular a comunicação sináptica entre os neurônios (RIZZOLATTI *et al.*, 2001).

De acordo com Pérez-Álvares *et al.* (2014) a plasticidade sináptica subjacente à formação da memória é acompanhada por mudanças estruturais e funcionais que afetam não só os neurônios, mas também os astrócitos, que exercem uma função essencial para permitir a comunicação neuronal fluida. Isso significa que a ação dos astrócitos está muito presente não só no funcionamento normal do cérebro, mas também no patológico.

Ao induzir a plasticidade sináptica pela atividade neuronal de alta frequência, observou-se que os processos que os astrócitos estendem para entrar em contato com as sinapses neuronais são rearranjados. Dessa forma, a atividade neuronal derivada da experiência gera uma modificação anatômica e funcional no cérebro que envolve não apenas neurônios, como se acreditava, mas também astrócitos, revelando uma maior capacidade computacional do cérebro em processos de aprendizagem e memória. Pérez-Álvares *et al.* (2014) acredita que essas descobertas podem ajudar a entender melhor como o cérebro funciona em condições normais e patológicas.

Vale ressaltar que os astrócitos desempenham muitas funções, incluindo o suporte bioquímico das células endoteliais que formam a barreira hematoencefálica, fornecimento de nutrientes ao tecido nervoso, manutenção do equilíbrio iônico extracelular e um papel no processo de reparo e cura do cérebro e da medula espinhal após lesões traumáticas (ZHANG *et al.*, 2010).

Pesquisas desde meados da década de 1990 mostraram que os astrócitos propagam ondas intercelulares de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) por longas distâncias em resposta a algum estímulo. Além disso, como os neurônios, liberam transmissores (chamados de gliotransmissores) de acordo com a dinâmica intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Vários estudos sugerem que os astrócitos também sinalizam neurônios através da liberação de glutamato dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Essas descobertas tornaram os astrócitos uma importante área de pesquisa no campo da neurociência (YANG *et al.*, 2001).

Existem várias formas e tipos de astrócitos no sistema nervoso central, incluindo fibroso (na substância branca), protoplasmático (na substância cinzenta) e radial. Os astrócitos fibrosos estão geralmente localizados na substância branca, têm relativamente poucas organelas e exibem processos celulares longos e não ramificados. Esse tipo geralmente tem "pés vasculares" que conectam fisicamente as células ao exterior das paredes capilares quando estão perto delas. Os astrócitos protoplasmáticos são os mais prevalentes e são encontradas no tecido da substância cinzenta, apresentam maior quantidade de organelas e exibem processos terciários curtos e altamente ramificados. Os astrócitos radiais estão dispostos em planos perpendiculares aos eixos dos ventrículos. Um de seus processos faz fronteira com a pia-máter, enquanto o outro está profundamente enterrado na massa cinzenta. Os astrócitos radiais estão presentes principalmente durante o desenvolvimento, desempenhando um papel na migração de neurônios (TRABELSI, 2017).

Classicamente na ciência médica, os astrócitos eram considerados como preenchedores de lacunas. No entanto, hoje sabemos que as funções dos astrócitos vão além de ser a simples cola de neurônios. Os astrócitos desempenham funções ativas no cérebro, incluindo a secreção ou absorção de transmissores neuronais e a manutenção da barreira hematoencefálica. Continuando com essa ideia, foi proposto o conceito de "sinapse tripartite", referindo-se à estreita relação que ocorre nas sinapses entre um elemento pré-sináptico, um elemento pós-sináptico e um elemento glial (TRABELSI, 2017).

A seguir, revisaremos com mais detalhes as diferentes funções que os astrócitos realizam no cérebro, são elas:

- Funções estruturais: os astrócitos estão envolvidos na estruturação física do cérebro. Recebem esse nome porque têm o formato de uma "estrela". Eles são as células gliais mais abundantes no cérebro, intimamente associadas às sinapses neuronais. Eles

regulam a transmissão de impulsos elétricos dentro do cérebro (VILLAREAL *et al.*, 2014);

- Reservatório de glicogênio: os astrócitos contêm glicogênio e são capazes de glicogênese (síntese de glicogênio por meio de açúcares) e glicogenólise (obtenção de açúcares pela quebra de cadeias de glicogênio). Portanto, os astrócitos podem alimentar os neurônios com glicose durante os períodos de alto consumo de glicose e escassez de glicose. Pesquisas sugerem que pode haver uma conexão entre essa atividade e o exercício físico (TRABELSI, 2017);
- Suporte metabólico: fornecem aos neurônios nutrientes como o lactato;
- Barreira hematoencefálica, que é um complexo que envolve a maioria dos vasos sanguíneos do cérebro: atua como uma barreira entre a corrente sanguínea e o espaço extracelular do cérebro, permitindo que apenas certas substâncias, como água, oxigênio e pequenas substâncias solúveis em gordura, passem facilmente do sangue para o cérebro. Isso evita que toxinas, agentes patogênicos e outras substâncias potencialmente perigosas passem do sistema circulatório para o cérebro. Os astrócitos participam dessa barreira por meio dos chamados pés astrócitários, extensões dos astrócitos que revestem os vasos sanguíneos e que possuem fortes ligações entre eles para bloquear a passagem de qualquer substância indesejada (VILLAREAL *et al.*, 2014);
- Captura e liberação de transmissores: astrócitos e outras células gliais podem liberar uma variedade de transmissores no espaço extracelular. Esses transmissores são atualmente classificados como gliotransmissores, embora sejam na verdade as mesmas moléculas usadas pelos neurônios, como o glutamato, ATP, GABA (ácido gama-aminobutírico) e D-serina (TRABELSI, 2017);
- Regulação da concentração de íons no espaço extracelular: os astrócitos possuem canais de potássio em alta densidade. Quando os neurônios estão ativos, eles liberam potássio, aumentando a concentração extracelular local. Como os astrócitos são altamente permeáveis ao potássio, eles eliminam rapidamente o acúmulo excessivo no espaço extracelular. Se esta função for interferida, a concentração extracelular de potássio aumentará, levando à despolarização neuronal descontrolada que pode levar à atividade neuronal epiléptica (VILLAREAL *et al.*, 2014);

- Eliminação do excesso de glutamato: o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro dos vertebrados. Quando liberado em excesso ou por um longo tempo, o glutamato atua como uma poderosa neurotoxina que desencadeia a morte celular neuronal em muitas lesões cerebrais agudas e crônicas. Os astrócitos removem a maior parte do glutamato do espaço extracelular; acumulam 80% do glutamato liberado, enquanto os 20% restantes são absorvidos pelos neurônios (TRABELSI, 2017);
- Controle da sinaptogênese e manutenção sináptica: a astrogliia regula a formação, maturação, manutenção e estabilidade das sinapses, controlando assim a conectividade dos circuitos neuronais. Os astrócitos secretam vários fatores essenciais para a sinaptogênese e, sem astrócitos, a formação de sinapses seria gravemente prejudicada (YANG *et al.*, 2001);
- Vasomodulação - unidade neurovascular: as células astrogliais são os elementos centrais das unidades neurovasculares que integram os circuitos neurais com o fluxo sanguíneo local e suporte metabólico. A lâmina basal dos vasos sanguíneos é quase completamente coberta por pés endógenos de astrócitos. Assim, o astrócito está em uma posição estratégica, com um braço no vaso sanguíneo e o outro na membrana neuronal, sinapse ou axônio. Portanto, pode ser visto como a ponte neurovascular. O aumento da atividade dos neurônios dispara sinais de  $Ca^{2+}$  nos astrócitos e este poderia ser o sinal de integração para a unidade neurovascular (TRABELSI, 2017);
- Promoção da atividade mielinizante de oligodendrócitos: a atividade elétrica nos neurônios faz com que eles liberem ATP, que serve como um estímulo importante para a formação de mielina. No entanto, o ATP não atua diretamente sobre os oligodendrócitos. Em vez disso, faz com que os astrócitos secretem o fator inibitório de leucemia (LIF), uma proteína reguladora que promove a atividade mielinizante dos oligodendrócitos. Isso sugere que os astrócitos têm um papel de coordenação executiva no cérebro (VILLAREAL *et al.*, 2014);
- Reparação do sistema nervoso: após a lesão das células nervosas no sistema nervoso central, os astrócitos preenchem o espaço para formar uma cicatriz na glia e podem contribuir para o reparo neuronal. No entanto, o papel dos astrócitos na regeneração do sistema nervoso central (SNC) após a lesão não é bem compreendido. A cicatriz glial tem sido tradicionalmente descrita como uma barreira impermeável à

regeneração, implicando em um papel negativo na regeneração do axônio. Porém, recentemente, foi descoberto por meio de estudos de ablação genética que os astrócitos são necessários para que a regeneração ocorra. Os autores descobriram que a cicatriz dos astrócitos é essencial para que os axônios estimulados - axônios que foram persuadidos a crescer por meio da suplementação neurotrófica - se espalhem pela medula espinhal lesada. Astrócitos que foram empurrados para um fenótipo reativo (denominado astrogliose, definida pela regulação positiva da expressão de GFAP- proteína ácida fibrilar glial, uma definição ainda em debate) podem ser tóxicos para os neurônios, liberando sinais que podem matar os neurônios (TRABELSI, 2017);

- Sinapse tripartite: Na massa cinzenta, os astrócitos estão intimamente associados às membranas neuronais e, especificamente, às regiões sinápticas, com as membranas astrogliais envolvendo completa ou parcialmente os terminais pré-sinápticos e as estruturas pós-sinápticas. A íntima posição morfológica de astrócitos e estruturas sinápticas permitem que os primeiros sejam expostos a neurotransmissores liberados dos terminais sinápticos. Funcionalmente, os processos das células astrogliais são dotados de receptores de neurotransmissores e, o mais importante, os padrões de receptores expressos pelas membranas astrogliais correspondem exatamente aos neurotransmissores liberados nas sinapses que cobrem (VILLAREAL *et al.*, 2014).

### 2.1.3 A comunicação entre astrócitos e neurônios

Há evidências experimentais de que neurônios e astrócitos se comunicam entre si, o que sugere que os astrócitos estão envolvidos no processamento de informações cerebrais. Os pesquisadores propuseram várias abordagens experimentais para entender o papel dos astrócitos na comunicação cerebral (HALASSA *et al.*, 2007a; PEREA *et al.*, 2009; PIRTTIMAKI *et al.*, 2017). Essas abordagens foram projetadas principalmente para analisar a sinalização de cálcio, uma vez que é a principal atividade dos astrócitos (BERNARDINELLI *et al.*, 2014; BINDOCCI *et al.*, 2017; HOWARTH, 2014; NAVARRETE *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014). Os resultados obtidos evidenciaram algumas informações sobre a função de astrócitos, mas são bastante discrepantes. As discrepâncias dos resultados experimentais

impedem uma visão global sobre as contribuições dos astrócitos na comunicação cerebral (BAZARGANI; ATTWELL, 2016; LALLOUETTE *et al.*, 2018; VOLTERRA *et al.*, 2014). Essas discrepâncias ocorrem devido às dificuldades de detecção e interpretação das sinalizações de cálcio. A elaboração de sofisticados aparatos experimentais e uma análise crítica dos resultados podem melhorar a compreensão do papel de astrócitos (LOSI *et al.*, 2017; POSKANZER; MOLOFSKY, 2018; RUSAKOV, 2015).

## 2.2 MODELOS MATEMÁTICOS E OS PRINCIPAIS PROBLEMAS ASSOCIADOS À INTERPRETAÇÃO E A DESCRIÇÃO MATEMÁTICA DA SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO

Um modelo matemático utiliza fórmulas para representar a relação entre diferentes variáveis, parâmetros e restrições. Um modelo matemático é uma representação simplificada, por meio de equações, funções ou fórmulas matemáticas, de um fenômeno ou da relação entre duas ou mais variáveis (CANTLON, 2012).

Modelos matemáticos são usados para analisar a relação entre duas ou mais variáveis. Eles podem ser usados para entender fenômenos naturais, sociais, físicos, etc. Dependendo do objetivo pretendido e do desenho do mesmo modelo podem ser utilizados para prever o valor das variáveis no futuro, fazer hipóteses, avaliar os efeitos de uma determinada política ou atividade, entre outros objetivos (CARDOSO, 2018).

Os modelos matemáticos podem variar em sua complexidade, mas todos eles têm um conjunto de características básicas (THEVENOT *et al.*, 2012):

- Variáveis: são os conceitos ou objetos que se busca compreender ou analisar.
- Parâmetros: são valores conhecidos ou controláveis do modelo;
- Restrições: são certos limites que indicam que os resultados da análise são razoáveis.
- Relações entre as variáveis: O modelo estabelece certa relação entre as variáveis com base em teorias econômicas, físicas, químicas, etc.;
- Representações simplificadas: Uma das características essenciais de um modelo matemático é a representação das relações entre as variáveis estudadas por meio de elementos da matemática como: funções, equações, fórmulas, etc.;

Quando um modelo matemático é desenhado, pretende-se que este tenha um conjunto de propriedades que ajudem a garantir a sua robustez e eficácia. Entre essas propriedades estão (CARDOSO, 2018):

- Simplicidade: um dos principais objetivos de um modelo matemático é simplificar a realidade para melhor compreendê-la;
- Objetividade: Que não haja vieses ou preconceitos teóricos ou preconceitos de seus projetistas;
- Sensibilidade: Que é capaz de refletir os efeitos de pequenas variações;
- Estabilidade: Que o modelo matemático não seja alterado de forma significativa quando há pequenas mudanças nas variáveis e
- Universalidade: que é aplicável a vários contextos e não apenas a um caso particular.

Obviamente, existem muitos mais, mas os acima são os mais intuitivos. Em termos gerais, o processo de elaboração de um modelo matemático é o seguinte (THEVENOT *et al.*, 2012):

- Encontrar um fenômeno ou problema;
- Formular um modelo com elementos matemáticos que representam o problema escolhido, identificando as variáveis relevantes (dependentes e independentes);
- Estabelecer hipóteses e um método de teste para sua veracidade;
- Aplicar conhecimentos matemáticos para resolver o modelo e fazer previsões, se necessário;
- Fazer comparações dos dados obtidos com dados reais.
- Se os resultados não atenderem às expectativas, ajuste o modelo matemático.

Existem vários tipos de modelos matemáticos. Aqui estão alguns dos tipos de modelos mais relevantes (CARDOSO, 2018):

- Heurística: com base em possíveis explicações sobre as causas dos fenômenos observados.
- Empírico: use informações de experimentação real.

De acordo com o tipo de representação

- Qualitativos ou conceituais: referem-se a uma análise da qualidade ou tendência de um fenômeno sem calcular um valor exato;
- Quantitativo ou numérico: Os resultados obtidos possuem um valor específico que possui um determinado significado (pode ser exato ou relativo).

De acordo com a aleatoriedade (THEVENOT *et al.*, 2012):

- Determinística: não tem incerteza, os valores são conhecidos;
- Estocástico: O valor das variáveis não é conhecido exatamente o tempo todo.

Existe incerteza e, portanto, uma distribuição de probabilidade dos resultados.

De acordo com sua aplicação ou objetivo

- Simulação ou descritiva: simula ou descreve um fenômeno. Os resultados estão focados em prever o que acontecerá em uma determinada situação;
- Otimização: eles são usados para encontrar uma solução ótima para um problema;
- De controle: Manter o controle de uma organização ou sistema e determinar as variáveis que devem ser ajustadas para obter os resultados desejados.

Modelos matemáticos podem contribuir para a interpretação dos dados experimentais, uma vez que ajudam a identificar os mecanismos envolvidos em um fenômeno e os limites dos métodos experimentais empregados. Além disso, modelos matemáticos validados permitem a elaboração de novas hipóteses sobre um fenômeno e a previsão do comportamento dinâmico de um sistema em diferentes situações (MIN *et al.*, 2012; MYUNG; PITT, 2002; SUCZYNSKI *et al.*, 2006).

Tanto a descrição matemática quanto a interpretação dos resultados experimentais da sinalização de cálcio não são triviais. Eles enfrentam problemas como a complexidade geométrica dos astrócitos, bem como o grande número de mecanismos envolvidos na geração e propagação de sinalização de cálcio. Modelos matemáticos também enfrentam outro desafio: como descrever matematicamente os processos celulares, como a dinâmica dos vários tipos de

canais e sua probabilidade de abertura. Os principais problemas associados à interpretação e a descrição matemática da sinalização de cálcio será descrito detalhadamente agora.

Os astrócitos protoplasmáticos são os considerados neste trabalho. Eles também são chamados de "estrelas" devido ao seu alto nível de ramificação (MATYASH; KETTENMANN, 2010). Os braços são importantes, porque eles permitem que os astrócitos entrem em contato com os neurônios e outros astrócitos. Além disso, os braços permitem que os astrócitos envolvam sinapses distantes, estabelecendo um meio de comunicação entre elas (HALASSA *et al.*, 2007b). A falta de reflexão sobre esta complexidade estrutural pode resultar em interpretações antagônicas dos fenômenos envolvendo os astrócitos (BAZARGANI; ATTWELL, 2016; VOLTERRA *et al.*, 2014). A fim de minimizar esse antagonismo, é importante levar em consideração onde a sinalização está sendo detectada, uma vez que os processos celulares ocorrem em diferentes amplitudes e períodos dependendo da região onde eles iniciam (SHTRAHMAN *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2014). Outra questão importante é a maneira como as conexões astrocitárias estão espacialmente distribuídas. A distribuição espacial pode afetar diretamente a dinâmica da sinalização de cálcio (PEREZ-ALVAREZ *et al.*, 2014).

A sinalização do cálcio é desencadeada pela combinação de vários mecanismos (MCCARTHY; SALM, 1991). O retículo endoplasmático (RE) é a principal organela que contribui para sua ocorrência através da liberação de cálcio por canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por  $\text{IP}_3$  (BERRIDGE *et al.*, 2003; BOOTMAN *et al.*, 2002). Além dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por  $\text{IP}_3$ , o retículo endoplasmático tem sensibilidade aos receptores de rianodina. Ambos os receptores de  $\text{IP}_3$  e rianodina são modulados pelo mecanismo denominado liberação de cálcio induzida pelo cálcio como consequência do aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (SIMPSON *et al.*, 1998; SKUPIN *et al.*, 2008). Outros processos biológicos participam de sinalização de cálcio nos astrócitos, como a abertura de canais desencadeada pela ativação de receptores ionotrópicos de glutamato (KOH *et al.*, 1995) e ATP (NEARY *et al.*, 1988); abertura de canais de cálcio dependentes de diferença de potencial (MACVICAR, 1984); ativação da bomba  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (GOLOVINA *et al.*, 2003) e ATPase (VERKHRATSKY *et al.*, 2012). Além disso, os canais passivos estão presentes nas membranas do RE (CLAPHAM, 1995). Existem também os canais ativados pela falta de  $\text{Ca}^{2+}$  no RE ligados aos receptores transientes de potenciais (TRPC) (VERKHRATSKY; PARPURA, 2014). Com base nos vários mecanismos descritos acima, é possível concluir que a sinalização de cálcio é um complexo fenômeno. Assim, o

desenvolvimento de um modelo matemático que a descreve requer a seleção dos mecanismos mais relevantes. Isso não é uma fácil tarefa, mas uma boa seleção é fundamental para que o modelo matemático permita inferências plausíveis.

### **2.2.1 Modelos matemáticos de sinalização de cálcio em astrócitos**

Vários modelos matemáticos de sinalização de cálcio em astrócitos foram propostos nos últimos anos, contudo, bem como os resultados experimentais, eles ainda não levaram a conclusões definitivas sobre o papel dos astrócitos no processamento de informação cerebral. A maioria desses modelos é derivada de um dos três modelos clássicos que descreve a sinalização de cálcio, são eles: Keizer e De Young (1992), Li e Rinzel (1994) e Höfer *et al.* (2002). Além de usar um desses modelos como base, os modelos recentes utilizam seus parâmetros. O problema é que o modelo de Keizer e De Young (1992), por exemplo, apontam que o conjunto de parâmetros por eles empregados não foi o único que satisfaz as condições estabelecidas. Além disso, a análise de sensibilidade paramétrica raramente foi realizada nos artigos que propuseram modelagem matemática da sinalização de cálcio em astrócitos (MANNINEN *et al.*, 2018). A falta de análise com relação aos parâmetros pode ser responsável pela falta de possibilidade de comparação entre os modelos, conforme apontado por MANNINEN *et al.* (2017). Outra questão relevante é que os três modelos básicos não fazem comparações diretas com os resultados experimentais. Artigos mais recentes raramente o fazem. É possível que isto esteja relacionado às próprias lacunas que ainda existem nos resultados experimentais (POSKANZER; MOLOFSKY, 2018; DURKEE; ARAQUE, 2019; OHEIM *et al.*, 2017; SHIGETOMI *et al.*, 2016; RUSAKOV, 2015). Também é importante destacar que Manninen *et al.* (2018) e Manninen *et al.* (2017) pontuam à dificuldade em reproduzir os modelos da literatura, seja por erros na escrita do próprio modelo ou por informações não apresentadas. Dadas as discrepâncias e inconsistências dos resultados experimentais e dos modelos matemáticos, uma profunda reflexão e um engajamento na criação de novas abordagens são necessários. Essas abordagens devem levar em conta as peculiaridades dos astrócitos e os vários desafios apresentados aqui. Com base neste contexto, o objetivo deste trabalho é propor um modelo matemático biologicamente coerente para a previsão da dinâmica da sinalização de cálcio desencadeada por estímulos glutamatérgicos em astrócitos. Este modelo levará em consideração as características e processos mais relevantes relativos aos astrócitos, a fim de ser usado como uma ferramenta para novos estudos sobre o papel destas

células. Uma análise de sensibilidade paramétrica é realizada e o código-fonte do programa computacional está disponível no ModelDB (MCDOUGAL *et al.*, 2017), permitindo a sua reprodutibilidade. A disponibilidade do programa e a forma como foi construído permite que pesquisadores em todo o mundo possam contribuir de várias maneiras, experimentalmente e matematicamente. Como o enriquecimento do modelo, será possível dar uma contribuição efetiva em termos do papel dos astrócitos no processamento da informação cerebral.

### 3. O MODELO MATEMÁTICO

A sinalização do cálcio depende dos mecanismos que ocorrem principalmente em três regiões: fenda sináptica, citosol e retículo endoplasmático. Na primeira região, apenas a dinâmica temporal do glutamato que atinge a proximidade de astrócitos é modelada. No citosol, a dinâmica de cálcio e do  $IP_3$  são modeladas. A região é considerada heterogênea e o modelo inclui equações diferenciais parciais difusivas. O retículo endoplasmático atua como um depósito de cálcio. Devido às suas pequenas dimensões e altas concentrações de cálcio, é possível desconsiderar os perfis de concentração de cálcio e utilizar uma abordagem homogênea com equações diferenciais ordinárias. A vantagem é a redução do esforço computacional. De toda forma, as duas abordagens, homogênea e heterogênea, foram testadas e comparadas.

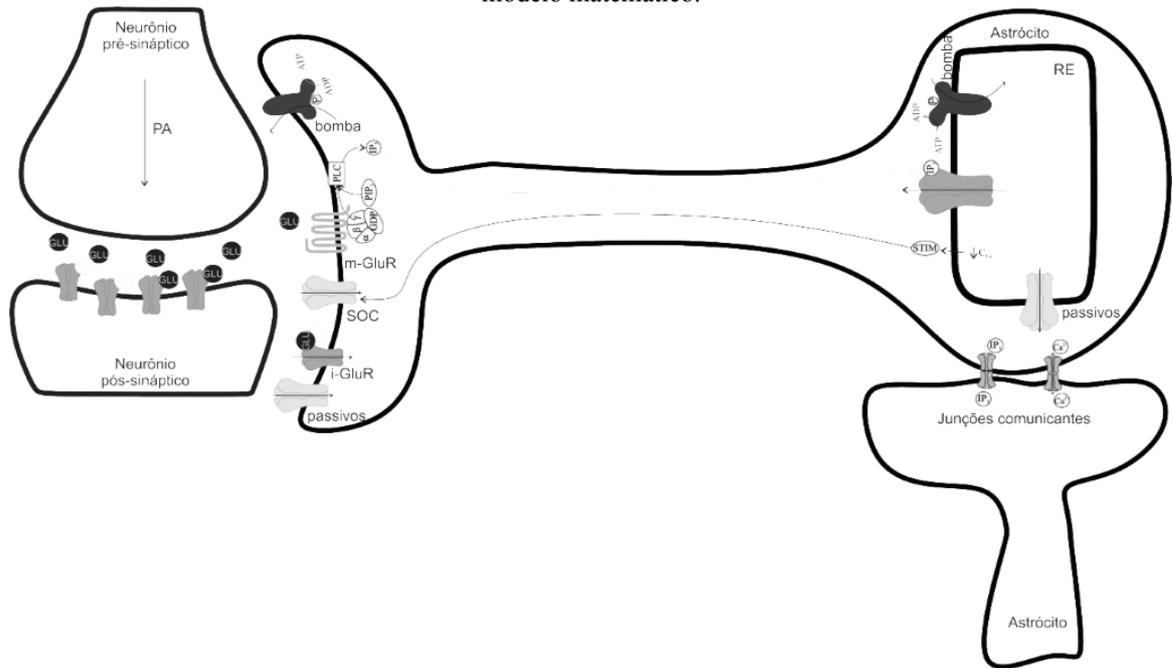
A Fig. 2 mostra um esquema das regiões levadas em conta no modelo matemático, destacando os mecanismos considerados em cada um deles. Como o objetivo deste trabalho é estudar a sinalização de cálcio desencadeada por estímulo glutamatérgico, os principais mecanismos considerados foram: a ativação de receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato, i-GluR e m-GluR, respectivamente (VERKHRATSKY *et al.*, 2012); a atividade de ATPases e canais passivos de  $Ca^{2+}$  na membrana celular e na membrana do RE (CLAPHAM, 1995); a abertura de canais ativadas por  $IP_3$  na membrana do RE (VERKHRATSKY *et al.*, 2012); o funcionamento dos TRPC, um dos contribuintes do mecanismo denominado entrada de cálcio operada pelo estoque (SOCE) (VERKHRATSKY; PARPURA, 2014). Após a escolha dos mecanismos relevantes, foi realizado o balanço de massa nas regiões onde equações diferenciais ordinárias ou parciais são usadas (citosol e RE).

O citosol é um meio coloidal que contém organelas e outras estruturas que tornam difícil o livre movimento de íons e moléculas (LUBY-PHELPS, 1999). Nesse meio, a difusão é o principal mecanismo de transporte de massa (HÖFER *et al.*, 2002). Conseqüentemente, a dinâmica das concentrações de cálcio e de  $IP_3$  no citosol,  $C_{cit}$  e  $I_{cit}$ , respectivamente, podem ser descritos pela Eq. 1, onde  $D_W$  é o coeficiente de difusão do composto  $W$  no citosol:

$$\frac{\partial W_{cit}}{\partial t} = D_W \cdot \nabla^2 W_{cit}, W = C, I \quad (1)$$

A mesma equação pode ser usada para descrever a dinâmica de cálcio no RE quando esta organela é considerada heterogênea.

Figura 2 - Mecanismos de sinalização do cálcio considerados no modelo matemático. O diagrama ilustra alguns mecanismos envolvidos na sinalização do cálcio. Na membrana celular, existem receptores metabotrópicos de glutamato (m-GluR), que são ativados quando os neurônios liberam glutamato na fenda durante a transmissão sináptica. Sua ativação desencadeia a produção de  $IP_3$ , que se move na célula por difusão. Ao atingir as membranas do retículo endoplasmático, o  $IP_3$  ativa os receptores que abrem os canais de cálcio. A diminuição da concentração de cálcio no retículo endoplasmático promove a ativação do STIM, que abre os canais de cálcio operados por estoque (SOC) localizados na membrana celular. Na membrana celular e na membrana do retículo endoplasmático, os canais passivos e a bomba operam para manter ou restaurar o estado de repouso. Na membrana celular, o glutamato liberado pelos neurônios também ativa os receptores ionotrópicos ali localizados (i-GluR), abrindo canais de cálcio. Todos os mecanismos mencionados acima foram levados em consideração no modelo matemático.



Fonte: Autora (2021)

Como mencionado anteriormente, o retículo endoplasmático pode ser considerado homogêneo por ser uma organela com pequena espessura e por estar distribuído uniformemente em todas as direções do corpo celular. Neste caso, os fluxos de cálcio que ocorrem em sua membrana devem ser computados diretamente no balanço de massa. Assim, assumindo que a variação da concentração de cálcio no RE depende dos fluxos produzidos pelas bombas de cálcio ( $v_{MRE}^{bb}$ ), canais passivos de cálcio ( $v_{MRE}^{cp}$ ) e canais de cálcio ativados por  $IP_3$  ( $v_{MRE}^{cl}$ ) (ULLAH *et al.*, 2006), a Eq. 2 descreve o perfil da concentração de cálcio no interior do RE. É necessário fazer uma integral sobre a superfície da membrana RE ( $S_{MRE}$ ), a fim de fazer compatível a abordagem homogênea de RE com a abordagem heterogênea do citosol.

$$V_{RE} \frac{\partial C_{RE}}{\partial t} = \iint_{S_{MRE}} v_{MRE}^{bb} + v_{MRE}^{cp} + v_{MRE}^{cl} \quad (2)$$

Os efeitos do tamponamento de cálcio foram levados em consideração quando foi escolhida a difusão efetiva para os coeficientes de difusão (HÖFER *et al.*, 2002). Mesmo em alguns modelos heterogêneos já propostos, como o de Höfer *et al.* (2002) e Wu *et al.* (2014), estes fluxos foram incorporados no balanço de massa. Neste modelo, os locais onde os fluxos ocorrem foram levados em consideração, o que implica em seu uso como condições de contorno. Portanto, as expressões matemáticas propostas na literatura foram modificadas para incluir a fração de área das membranas onde há fluxo.

A produção do IP<sub>3</sub> não depende apenas do acoplamento do glutamato ao receptor metabotrópico, mas também depende da concentração de cálcio intracelular, uma vez que este composto mantém a proteína efetora ativada (PAWELCZYK; MATECKI, 1997). Ullah *et al.* (2006) sugerem um cálculo para a produção IP<sub>3</sub> somando os efeitos desses dois compostos. Isso parece inapropriado, dado que o cálcio amplifica a ativação da proteína G, mas não a inicia (THORE *et al.*, 2005). Com base nisto, o presente modelo multiplicou as duas contribuições em vez de somá-las, conforme mostrado na Eq. 3. Em relação ao termo correspondente à contribuição de cálcio, foi utilizada a proposta de Höfer *et al.* (2002). A concentração de glutamato foi subtraída da concentração de glutamato em repouso, porque foi assumido que a produção IP<sub>3</sub> não é relevante no repouso. Assim, a Eq. 3, que foi usado como uma condição de contorno representa a produção de IP<sub>3</sub> em um elemento infinitesimal de área,  $dA$ .

$$u_{MC}^p = f_{MC}^p \cdot dA_{MC} K^p \frac{(G_{fs} - G_{fs}^*)^n}{(G_{fs} - G_{fs}^*)^n + k_{p,G}^n} \cdot \frac{C_{cit}^2}{C_{cit}^2 + k_{p,C}^2} \quad (3)$$

A degradação IP<sub>3</sub> foi descrita por uma cinética de primeira ordem, conforme proposto por Ullah *et al.* (2006). A eliminação de IP<sub>3</sub> ocorre até que seu valor de concentração retorne para o valor de repouso. A Eq. 4 descreve o fluxo de degradação, que foi usada como condição de contorno.

$$u_{MRE}^d = f_{MRE}^d \cdot dA_{MRE} \cdot h^d \cdot (I_{cit} - I_{cit}^*) \quad (4)$$

O fluxo de cálcio através de canais passivos, tanto na membrana celular quanto na membrana do RE (DI GARBO *et al.*, 2007), foi considerado proporcional à fração de área destes canais, ao coeficiente de transferência de massa, e ao gradiente de concentração entre ambos os lados da membrana. Esta relação substitui o conceito de corrente constante de entrada de cálcio na célula, que é usada em vários artigos (AMIRI *et al.*, 2011; HÖFER *et al.*, 2002; ULLAH *et al.*, 2006). A Eq. 5 mostra o fluxo de cálcio através dos canais passivos na membrana do retículo endoplasmático.

$$v_{MRE}^{cp} = f_{MRE}^{cp} \cdot dA_{MRE} \cdot h_{MRE}^{cp} \cdot (C_{RE} - C_{cit}) \quad (5)$$

Este trabalho incorpora os canais receptores transientes de potencial (TRPC), que são ativados a partir de uma redução da concentração de cálcio no retículo endoplasmático. É possível considerar que esses canais apresentam a mesma dinâmica dos canais passivos após sua ativação e abertura. Assim, pode ser considerado que o que ocorre efetivamente é um aumento na fração de canais passivos na membrana celular, que é dependente da concentração de  $Ca^{2+}$  no RE. Matematicamente, essa ideia é expressa na Eq. 6.

$$f_{MC}^{TRPC} = \begin{cases} \frac{1}{100} \cdot \frac{C_{RE}^* - C_{RE}}{C_{RE}^*}, & \text{para } C_{RE}^* - C_{RE} > 0, \\ 0, & \text{para } C_{RE}^* - C_{RE} \leq 0. \end{cases} \quad (6)$$

O fator de redução (100) empregado na Eq. 6 é para que a fração desses canais esteja na mesma ordem de grandeza dos outros canais. A adaptação da Eq. 5 para a membrana citoplasmática, levando em consideração os canais TRP é dada pela Eq. 7.

$$v_{MC}^{cp} = (f_{MC}^{cp} + f_{MC}^{TRPC}) \cdot dA_{MC} \cdot h_{MC}^{cp} \cdot (C_{fs} - C_{cit}) \quad (7)$$

A equação para descrever o fluxo de cálcio produzido pelas bombas na membrana do RE foi desenvolvida a partir de dados experimentais. Esta equação considera que a operação da bomba depende da concentração de cálcio, até um limite de saturação, dado pelo constante  $k_{bb}$  (ULLAH *et al.*, 2006). A influência de cálcio é de segunda ordem, uma vez que a bomba transporta dois íons de cálcio simultaneamente. De acordo com Verkhratsky *et al.* (2012), essas

bombas também estão localizadas na membrana celular. Assim, sua atuação também foi levada em consideração no modelo atual. A Eq. 8 descreve o fluxo de cálcio devido à ação da bomba.

$$v_m^{bb} = f_m^{bb} \cdot dA_m \cdot K_m^{bb} \cdot \frac{C_{cit}^2}{C_{cit}^2 + k_{bb}^2}, m = MC, MRE \quad (8)$$

A Eq. 9, com base na de Ullah *et al.*(2006), representa o fluxo de cálcio através de canais ativados por ligante presentes nas membranas do REe celular.

$$v_m^{cl} = p_m^{a/f} \cdot f_m^{lc} \cdot dA_m \cdot h_m^{lc} \cdot (C_r - C_{cit}) \begin{cases} m = MC, r = fs \\ m = MRE, r = RE \end{cases} \quad (9)$$

A descrição matemática da abertura e fechamento de canais iônicos, dentre todos os anteriormente descritos fenômenos, é o mais desafiador, uma vez que os canais não são ativados simultaneamente (FALCKE, 2003) e cada um tem suas particularidades (EISENBERG, 1999). Existem propostas interessantes em vários artigos, mas permanecem problemas como o número de parâmetros e a ausência de critérios claros para as escolhas de seus valores (KEIZER; DE YOUNG, 1992; MEANS *et al.*, 2006). Embora tenham sido usados em estudos posteriores (HÖFER *et al.*, 2002; TAHERI *et al.*, 2017; ULLAH *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2014), esses valores foram obtidos para diferentes tipos de células, portanto, sua generalização para o estudo de astrócitos é questionável. A discussão sobre abertura e fechamento de canais está relacionada à dinâmica do parâmetro  $p_m^{a/f}$  na Eq. 9, que indica se o canal está permitindo, em um momento específico, a passagem de cálcio ( $p_m^{a/f} = 1$ ) ou não ( $p_m^{a/f} = 0$ ). Resultados obtidos por Tu *et al.* (2005a) foram usados para a descrição da dinâmica deste parâmetro. Esses pesquisadores realizaram um estudo detalhado dos canais ativados por IP<sub>3</sub> e propuseram equações que descrevem a probabilidade de abertura do canal de acordo às concentrações citosólicas de Ca<sup>2+</sup> ou IP<sub>3</sub>. Os autores calcularam a probabilidade de abertura mantendo constante ora a concentração de IP<sub>3</sub>, ora de Ca<sup>2+</sup>. Assim, eles obtiveram duas curvas experimentais, que foram estudadas de modo a se obter funções que as representasse. No caso deste modelo, ambas as concentrações variam simultaneamente. Então, para simplificar, as duas funções de probabilidade foram multiplicadas, resultando na Eq. 10, que representa a abertura probabilidade de canais ativados por IP<sub>3</sub>.

$$P_I = 4 \cdot \frac{I_{cit}^{n_i}}{I_{cit}^{n_i} + kS_I^{n_i}} \cdot \frac{kS_C^{n_c} \cdot C_{cit}^{n_c}}{(kS_C^{n_c} + C_{cit}^{n_c})(KS_C^{n_c} + C_{cit}^{n_c})} \quad (10)$$

Para os canais de cálcio ativados por glutamato (i-GLURs) uma equação semelhante foi usada. Neste caso, como não há informação sobre a participação do  $Ca^{2+}$  em seu processo de ativação ou inativação, uma equação mais simples foi utilizada, dependente exclusivamente de glutamato. A Eq. 11 é semelhante ao primeiro termo de  $P_I$ , mas a concentração de glutamato agora é levada em consideração.

$$P_G = \frac{G_{fs}^{n_G}}{G_{fs}^{n_G} + kS_G^{n_G}} \quad (11)$$

### 3.1 ASPECTOS RELACIONADOS À IMPLEMENTAÇÃO COMPUTACIONAL

A geometria para representar os astrócitos deve basicamente conter vários braços e um corpo aos quais os braços podem ser acoplados. Formas, como prismas e esferas, podem ser usados para representar a geometria do corpo celular, facilitando o uso de equações macroscópicas para descrever o movimento molecular. Prismas ou cilindros podem representar os braços. A implementação computacional do modelo matemático leva em consideração que a maioria dos dados disponíveis são obtidos em experimentos com culturas de astrócitos semeados em monocamadas. O uso de um modelo bidimensional (HÖFER *et al.*, 2002) é razoável nestas condições, o que torna possível considerar o corpo celular e seus ramos como prismas retangulares contendo a mesma profundidade. O sistema de coordenadas cartesiano é apropriado para a geometria escolhida. Assim, considerando este sistema de coordenadas e a variação bidimensional, a Eq. 1 pode ser reescrita como a Eq. 12.

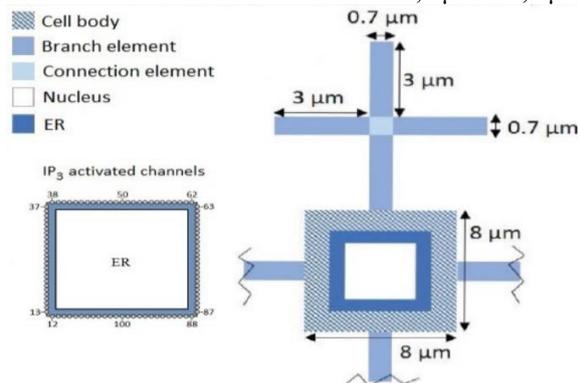
$$\frac{\partial W_{cit}}{\partial t} = D_W \cdot \frac{\partial^2 W_{cit}}{\partial x^2} + D_W \cdot \frac{\partial^2 W_{cit}}{\partial y^2}, W = C, I \quad (12)$$

A localização e a geometria do RE influenciam a sinalização de cálcio (BERRIDGE *et al.*, 2003). Nos astrócitos, o retículo está localizado nas proximidades do núcleo ou disperso no citosol (PIVNEVA *et al.*, 2008). Resultados experimentais mostram que, nos astrócitos, o

volume ocupado pelo RE aumenta a partir do final dos braços em direção ao corpo celular (PATRUSHEV *et al.*, 2013). Além disso, Oschmann *et al.* (2017) demonstrou que as extremidades dos braços são influenciadas principalmente pela entrada de cálcio do meio extracelular, e não pela liberação de cálcio armazenado no RE. Com base nessas informações, o modelo leva em consideração apenas o retículo endoplasmático que está localizado no corpo celular, em torno do núcleo. No entanto, um programa computacional foi desenvolvido a fim de verificar a influência do retículo endoplasmático existente nos braços dos astrócitos. Para simplicidade, considerou-se que o núcleo da célula é um prisma retangular centrado no corpo celular e rodeado pela ER.

A Fig. 3 mostra a representação da geometria computacionalmente implementada. É possível verificar as dimensões utilizadas e a distribuição dos braços.

Figura 3 – Esquema da representação geométrica do astrócito. O diagrama mostra que existem quatro ramos anexados ao corpo celular. O corpo celular possui o núcleo celular e o retículo endoplasmático ao seu redor. As dimensões do corpo celular são  $8\ \mu\text{M} \times 8\ \mu\text{M} \times 1\ \mu\text{M}$ . O tamanho de cada elemento do ramo é de  $3\ \mu\text{M} \times 0,7\ \mu\text{M} \times 1\ \mu\text{M}$ . O tamanho de cada elemento de conexão é  $0,7\ \mu\text{M} \times 0,7\ \mu\text{M} \times 1\ \mu\text{M}$ .



Fonte: Autora (2021)

É importante destacar que o programa computacional desenvolvido é versátil o suficiente para fazer uma célula ramificada, com ramos de diferentes tamanhos e em diferentes posições. Esta versatilidade é melhor descrita em um arquivo anexado ao software computacional depositado em ModelDB.

Devido à variação espacial no citosol, os fluxos ilustrados na Fig. 3 não afetam os volumes de controle. Portanto, eles não foram calculados no balanço de massa, mas sim como condições de contorno. Estas as condições serão especificadas agora.

### 3.2 CONDIÇÕES DE CONTORNO

As condições de contorno descrevem o efeito dos fluxos de cálcio e de  $IP_3$  nos volumes de controle que pertencem às membranas. Conforme mostrado na Fig. 3, essas membranas delimitam os braços, o corpo celular e o RE. As faces laterais dos ramos são consideradas isoladas. Em suas extremidades, por outro lado, há fluxo de cálcio através dos canais ativado pelo glutamato, e através dos canais passivos e da bomba. Além disso, há um fluxo de produção do  $IP_3$ . A condição de contorno nesses casos é baseada na ideia de que a massa que atravessa a membrana se move por difusão dentro da célula. Matematicamente, esta condição é representada pela Eq. 13 ( $IP_3$ ) e Eq. 14 ( $Ca^{2+}$ ).

$$v_{CM}^p = -dA_{MC} \cdot D_I \cdot \frac{\partial I_{cit}}{\partial u} \quad (13)$$

$$v_{MC}^{cl} + v_{MC}^{cp} + v_{MC}^{bb} = -dA_{MC} \cdot D_C \cdot \frac{\partial C_{cit}}{\partial u} \quad (14)$$

Na membrana que envolve o corpo celular, o fluxo existente é de cálcio através de canais passivos e a bomba. Considerando novamente que o movimento dentro da célula ocorre por difusão, a condição de contorno neste local é dada pela Eq. 15.

$$v_{MC}^{cp} + v_{MC}^{bb} = -dA_{MC} \cdot D_C \cdot \frac{\partial C_{cit}}{\partial u} \quad (15)$$

Finalmente, na membrana que envolve o retículo endoplasmático existem o fluxo de cálcio através dos canais ativado pelo  $IP_3$  e através dos canais passivos e a bomba. Além disso, há o fluxo de degradação do  $IP_3$ . As condições de contorno neste local, dada pela Eq. 16 ( $IP_3$ ) e Eq. 17 ( $Ca^{2+}$ ), leva em conta que o movimento dentro da célula é difusivo.

$$v_{ERM}^d = -dA_{ERM} \cdot D_I \cdot \frac{\partial I_{cyt}}{\partial \mu} \quad (16)$$

$$v_{ERM}^d = -dA_{ERM} \cdot D_I \cdot \frac{\partial I_{cyt}}{\partial \mu} \quad (17)$$

### 3.3 PROBABILIDADE DE ABERTURA

A probabilidade de abertura do canal requer uma explicação adicional sobre como foi implementado computacionalmente. Isso é necessário porque a definição do valor de probabilidade não é suficiente para determinar se o canal será aberto ou não. Outro critério deve ser estabelecido para determinar a ocorrência do evento. Foi estabelecido que o canal seria aberto apenas se um número, aleatoriamente escolhido a partir de uma distribuição equiprovável no conjunto  $[0; 1]$ , fosse menor do que a probabilidade calculada para cada passo de tempo pelas Eq. 10 ou Eq. 11. O canal, uma vez aberto, permanece nesta condição por um período de tempo. Depois disso, é fechado por outro período, correspondente ao período refratário,  $t_r$ .

### 3.4 VALORES DOS PARÂMETROS DO MODELO

Foi assumido que as concentrações de repouso de cálcio e  $IP_3$  no citosol e cálcio no RE correspondem, respectivamente, para  $0,1 \mu M$ ,  $0,16 \mu M$  e  $10,3 \mu M$  (ULLAH *et al.*, 2006). Além disso, a concentração de cálcio no meio extracelular corresponde a  $2 \text{ mM}$  (BEAR *et al.*, 2007). A difusividade do cálcio é de  $25 \mu m^2 s^{-1}$  e a do  $IP_3$  de  $280 \mu m^2 s^{-1}$  (HÖFER *et al.*, 2002).

A fração volumétrica ocupada pelo retículo foi estimado com base em dados fornecidos por Alberts *et al.* (2017). Os autores declararam que o citosol ocupa 54% do volume total da célula. Assim, todas as organelas ocupam 46% do corpo celular. Uma vez que a fração celular ocupada por ER é cerca de 17%, a fração de organelas que corresponde a ER é de 37%.

O cálculo da fração de área ocupada pelos receptores metabotrópicos foi baseado na estimativa da densidade de receptores apresentada por Nadkarni e Jung (2005):  $300 \mu m^{-2}$ . De acordo com essas informações e uma vez que este tipo de receptor tem um poro de aproximadamente  $5 \text{ nm}$  de diâmetro (TRAYNELIS *et al.*, 2010), o parâmetro  $f_{MC}^p$  foi estimado (0,006). O mesmo valor foi usado para  $f_{MC}^{cl}$ ,  $f_{MRE}^{cl}$  e  $f_{MRE}^d$ , por simplicidade. O valor de  $k_{p,c}$  ( $0,3 \mu M$ ) foi extraído de Höfer *et al.* (2002) e  $n$  (0,3) e  $k_{p,g}$  ( $0,78 \mu M$ ) eram de Ullah *et al.* (2006).

A constante associada aos canais passivos do retículo,  $f_{MRE}^{cp} \cdot h_{MRE}^{cp}$ , foi estimada igualando o fluxo dos canais usados por Ullah *et al.* (2006) para o fluxo de repouso usado neste trabalho. O valor obtido foi  $0,12 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ . O mesmo valor foi usado para os canais na membrana plasmática, ou seja,  $f_{MC}^{cp} \cdot h_{MC}^{cp} = 0,12 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ . Este fluxo é dez vezes menor para o corpo celular, caso contrário, a saída seria massiva e o período de restituição do retículo seria muito longo, o que não é biologicamente viável.

$$v_m^{bb} = f_m^{bb} \cdot dA_m \cdot K_m^{bb} \cdot \frac{C_{cit}^2}{C_{cit}^2 + k_{bb}^2}, m = MC, MRE \quad (18)$$

A constante de saturação da bomba,  $k_{bb} = 0,1 \mu\text{M}$ , era também usado por Ullah *et al.* (2006). As constantes  $f_{MRE}^{bb} \cdot K_{MRE}^{bb}$ , e  $f_{MC}^{bb} \cdot K_{MC}^{bb}$  foram calculadas igualando o fluxo de canais passivos e o fluxo de bombas em repouso. Da mesma forma, para canais passivos, este fluxo é dez mil vezes menor na membrana do corpo celular.

As constantes de probabilidade de abertura para canais ativados por  $\text{IP}_3$  foram extraídos de Tu *et al.* (2005a) e Tu *et al.* (2005b), considerando que os astrócitos apresentam, principalmente, receptores  $\text{IP}_3$  tipo 2 (Holtzclaw *et al.*, 2002). Assim,  $ks_I = 0,1 \mu\text{M}$ ,  $n_I = 2,2$ ,  $ks_C = 0,16 \mu\text{M}$ ,  $n_C = 2,05$  e  $Ks_C = 0,16 \mu\text{M}$ . Para canais ativados por glutamato, inicialmente, foi adotado  $n_G$  igual a  $n_I$ . O valor de  $ks_G = 1000 \mu\text{M}$  foi determinado com base no conhecimento do intervalo em que a concentração de glutamato varia na fenda sináptica. A concentração de o glutamato em repouso na fenda é 3 M. Dado isso, em média, 3.000 moléculas de glutamato são liberadas na fenda durante a transmissão sináptica e a fenda tem um volume de  $2:0:106\text{nm}^3$  (ALLAM *et al.*, 2012), a média a concentração deste composto atinge 3003 M. Considerando a liberação de glutamato através da vesícula em uma sinapse, essa concentração nas áreas em torno do astrócito tem uma amplitude de  $1000 \mu\text{M}$  (ALLAM *et al.*, 2012). Traçando a curva com 1000, 2000, 3000  $\mu\text{M}$  para o valor de  $ks_G$ , o mais coerente o comportamento estava em 1000  $\mu\text{M}$ . O período refratário (10,8 ms) e o tempo de manutenção de abertura (7,6 ms) de cada canal foram extraídos de Tu *et al.* (2005b).

As constantes associadas à produção  $\text{IP}_3$  e taxas de decaimento,  $K^p = 6,0 \cdot 10^{-12} \mu\text{mol} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  e  $h^d = 6,0 \cdot 10^3 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ , foram ajustados de forma que a sinalização de cálcio ocorra em cerca de 1,0 s, conforme indicado em Araque *et al.* (2014). Os coeficientes  $h_{MRE}^{cl}$  ( $150 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) e  $h_{MC}^{cl}$  ( $0,3 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) foram ajustados assumindo que o

retículo tenha uma contribuição relevante para o aumento da concentração de cálcio intracelular e, considerando que no estudo comparativo com a sinalização de cálcio apresentado por Araque *et al.* (2014), essa concentração dobra. É digno de nota que, após o cálculo da relação entre  $v_{MC}^{cl}$  e  $v_{MRE}^{cl}$  obtidos por Ullah *et al.* (2006),  $h_{MC}^{cl}$  correspondeu a  $0,002 \cdot h_{MC}^{cl}$ .

Agora, depois que os parâmetros globais foram estabelecidos e listados na Tabela 1, os resultados obtidos com o modelo e sua potencialidade será exposto.

Tabela 1 - Parâmetros do modelo

Símbolo	Descrição	Intervalo	Valor	Unidade
$C_{cit}^*$	Concentração de cálcio de repouso no citosol		0,1	$\mu M$
$C_{RE}^*$	Concentração de cálcio de repouso no retículo endoplasmático		10,3	$\mu M$
$C_{fs}$	Concentração de cálcio na fenda sináptica		2,0	$mM$
$I_{cit}^*$	Concentração de $IP_3$ de repouso no citosol		0,16	$\mu M$
$G_{fs}^*$	Concentração de glutamato de repouso na fenda sináptica		3,0	$\mu M$
$D_C$	Difusividade do cálcio no citosol		25	$\mu m^2 s^{-1}$
$D_I$	Difusividade de $IP_3$ no citosol		280	$\mu m^2 s^{-1}$
$f_{MC}^p$	Fração de área da membrana celular que produz $IP_3$		0,006	-
$K^p$	Taxa máxima de produção de $IP_3$	1 a $20 \cdot 10^{-12}$	$6,0 \cdot 10^{-12}$	$\mu mol \mu m^{-2} s^{-1}$
$k_{p,C}$	Constante de dissociação para estimulação de cálcio para produção de $IP_3$		0,3	$\mu M$
$k_{p,G}$	Constante de dissociação para estimulação de glutamato para produção de $IP_3$		0,78	$\mu M$
$n$	Coefficiente de Hill para a produção de $IP_3$		0,3	-
$f_{MRE}^d$	Fração de área do retículo endoplasmático que ocorre a degradação de $IP_3$		0,006	-
$h^d$	Coefficiente de degradação de $IP_3$	1 para $20 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^3$	$\mu m s^{-1}$
$f_{MC}^{cl}$	Fração de área da membrana celular ocupada por canais ligantes		0,006	-
$f_{MRE}^{cl}$	Fração de área do retículo endoplasmático ocupada por canais ligantes		0,006	-
$h_{MC}^{cl}$	Coefficiente de transferência de massa dos canais ligantes da membrana celular		0,3	$\mu m s^{-1}$
$h_{MRE}^{cl}$	Coefficiente de transferência de massa dos canais ligantes do retículo endoplasmático	10 para 200	150	$\mu m s^{-1}$

$f_{MC}^{cp}$	Fração de área da membrana celular ocupada por canais passivos	0,001	-
$f_{MRE}^{cp}$	Fração de área do retículo endoplasmático ocupada por canais passivos	0,001	-
$h_{MC}^{cp}$	Coefficiente de transferência de massa de canais passivos da membrana celular	120	$\mu ms^{-1}$
$h_{MRE}^{cp}$	Coefficiente de transferência de massa de canais passivos do retículo endoplasmático	120	$\mu ms^{-1}$
$f_{MC}^{bb}$	Fração de área da membrana celular ocupada por bombas de cálcio	0,001	-
$f_{MRE}^{bb}$	Fração de área do retículo endoplasmático ocupada por bombas de cálcio	0,001	-
$K_{MC}^{bb}$	Taxa máxima de fluxo de bomba na membrana celular	0,3	$\mu mol \mu m^{-2} s^{-1}$
$K_{MRE}^{bb}$	Taxa máxima de fluxo de bomba no retículo endoplasmático	0,3	$\mu mol \mu m^{-2} s^{-1}$
$k_{bb}$	Constante de saturação de bomba	0,1	$\mu M$
$ks_C$	Afinidade aparente para o sítio inibidor de cálcio	0,16	$\mu M$
$Ks_C$	Afinidade aparente para o sítio de ativação de cálcio	0,16	$\mu M$
$ks_I$	Afinidade aparente para o sítio de ativação de $IP_3$	0,1	$\mu M$
$ks_G$	Afinidade aparente para o sítio de ativação de glutamato	1000	$\mu M$
$n_C$	Coefficiente Hill de cálcio	2,05	-
$n_I$	Coefficiente Hill de $IP_3$	2,2	-
$n_G$	Coefficiente Hill de glutamato	2,2	-
$t_r$	Tempo refratário dos canais iônicos	10,8	$ms$
$t_a$	Tempo de abertura dos canais iônicos	7,6	$ms$
$t_{test}^p$	Tempo computacional para testar a probabilidade	10,0	$ms$
$\sigma$	Amplitude de oscilação do glutamato da fenda sináptica durante um estímulo	10,0	$ms$
$\delta$	Amplitude de oscilação do glutamato durante um estímulo	1000	$\mu M$

Fonte: Autora (2021)

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o desenvolvimento do programa computacional, foram realizadas diversas simulações para que fosse possível inferências a respeito do papel do retículo endoplasmático na sinalização de cálcio nos astrócitos. As principais variáveis avaliadas foram as concentrações de cálcio no citosol e no retículo endoplasmático, bem como a de  $IP_3$  no citosol.

As concentrações no citosol são função do tempo e do espaço, todavia, os resultados experimentais geralmente explicitam apenas sua dependência temporal. Por isso, foram calculadas as concentrações médias ao longo do tempo para a geração dos gráficos e posterior análise. Além disso, optou-se por trabalhar com variáveis adimensionais, então dividiu-se a concentração média pela concentração inicial e foram estabelecidas três novas variáveis:  $\bar{y}_{cit}^C$ ,  $y_{RE}^C$  e  $\bar{y}_{cit}^I$ . Todas elas são dependentes apenas do tempo, e não mais do espaço. As equações (19), (20) e (21) explicitam seus cálculos.

$$\bar{y}_{cit}^C(t) = \frac{\bar{C}_{cit}(t)}{C_{cit}^*} \quad (19)$$

$$y_{RE}^C(t) = \frac{C_{RE}(t)}{C_{RE}^*} \quad (20)$$

$$\bar{y}_{cit}^I(t) = \frac{\bar{I}_{cit}(t)}{I_{cit}^*} \quad (21)$$

Para que a sinalização de cálcio seja desencadeada, é necessário que haja um estímulo. Optou-se nesse momento por utilizar o glutamatérgico com o propósito de que futuramente haja a integração entre os trabalhos do grupo de pesquisa. Unindo o modelo de Quinaud (2016), que descreve a chegada do potencial de ação ao terminal pré-sináptico, ao de Goyes (2018), que discute a liberação e dinâmica do glutamato na fenda sináptica, e ao do presente trabalho, poderá se descrever a sinapse tripartite mediante efeitos glutamatérgicos. Com o modelo completamente desenvolvido, efeitos oriundos de outros neurotransmissores, tais como o ATP e o GABA, poderão também ser estudados.

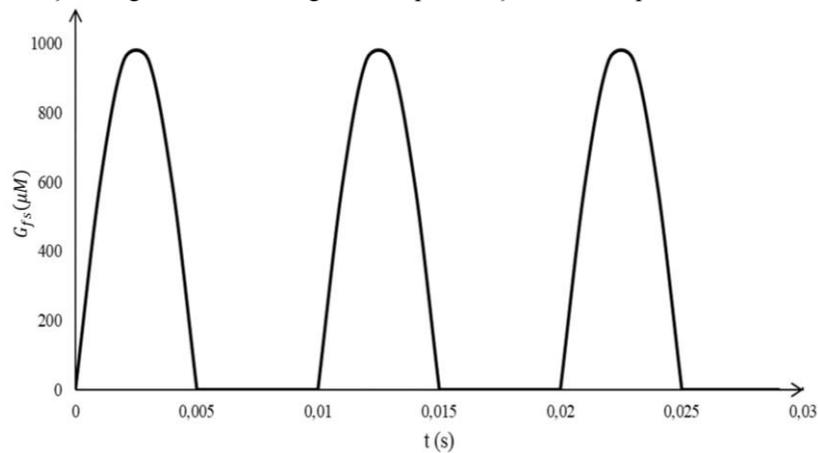
Matematicamente, o estímulo glutamatérgico caracteriza-se como uma função que descreve a variação na concentração de glutamato ao longo do tempo na fenda sináptica. Sabe-se que, após a liberação da vesícula na fenda, a concentração desse neurotransmissor aumenta nas proximidades das terminações dos astrócitos e em seguida decresce novamente

(CLEMENTS, 1996). Para representar esse processo, definiu-se a utilização de uma função senoidal, excluindo os intervalos em que ela é negativa. Esses intervalos foram associados ao período refratário apresentado pelos neurônios, em que não há liberação de neurotransmissores (HJELMSTAD *et al.*, 1997), e o valor assumido pela concentração de glutamato seria o do repouso.

$$G_{fs} = \begin{cases} G_{fs}^* + \delta \cdot \text{sen}\left(\frac{2\pi}{\sigma} \cdot t\right), & t \in \left[n \cdot \sigma, \frac{(2n+1) \cdot \sigma}{2}\right], n \in N \\ G_{fs}^*, & t \in \left[\frac{(2n+1) \cdot \sigma}{2}, (n+1) \cdot \sigma\right], n \in N \end{cases} \quad (22)$$

Graficamente, o estímulo de glutamato está representado na Figura 04.

Figura 4 - Concentração de glutamato ao longo do tempo. Função definida para  $\sigma = 10\text{ms}$  e  $\delta = 1000\mu\text{M}$ .



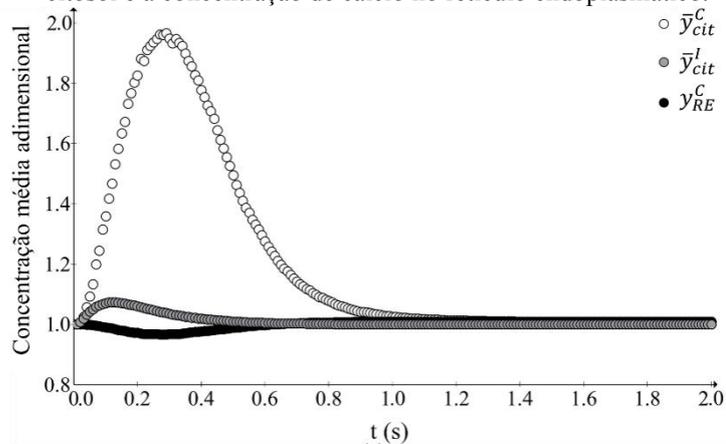
Fonte: Autora (2021)

Ressalta-se aqui a escala temporal dos fenômenos e processos avaliados. Quando se trata da sinalização de cálcio dos astrócitos, grande parte dos trabalhos leva em conta estímulos de vários neurônios em um grande intervalo de tempo (eventos expandidos). Todavia, sabe-se que os astrócitos reagem a estímulos individuais de um único neurônio (eventos focais) (BERNARDINELLI *et al.*, 2011; DI CASTRO *et al.*, 2011). Como esses eventos focais estão diretamente relacionados aos eventos envolvendo os retículos nas ramificações dos astrócitos (DI CASTRO *et al.*, 2011), optou-se por trabalhar inicialmente com eles.

#### 4.1 SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO NA ESTRUTURA CELULAR SIMPLIFICADA

Os perfis de concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{IP}_3$  no citosol, bem como o de  $\text{Ca}^{2+}$  no RE, mostram comportamento qualitativo coerente (Fig. 05). A concentração de  $\text{IP}_3$  aumenta devido à sua produção desencadeada pela ativação de receptores metabotrópicos na membrana celular. Quando atinge a membrana do retículo endoplasmático, o  $\text{IP}_3$  começa a ser degradado e sua concentração diminui até retornar ao valor de repouso. A concentração de cálcio no citosol aumenta principalmente porque o  $\text{IP}_3$  que atinge o retículo endoplasmático abre os canais de cálcio ativados por  $\text{IP}_3$ , permitindo sua liberação no citosol. A concentração de cálcio no retículo endoplasmático diminui porque o cálcio é liberado no citosol. Tanto a concentração de cálcio no citosol quanto a do retículo endoplasmático retornam ao valor de repouso devido à atividade das bombas de cálcio e dos canais passivos.

Figura 5 - Dinâmica do cálcio e do  $\text{IP}_3$ . O gráfico mostra a dinâmica das concentrações médias de cálcio e  $\text{IP}_3$  no citosol e a concentração de cálcio no retículo endoplasmático.



Fonte: Autora (2021)

Os resultados obtidos podem ser comparados aos publicados em vários trabalhos experimentais como Venance *et al.* (1997) e Ullah *et al.* (2006). No entanto, as condições experimentais utilizadas, como culturas de astrócitos e estímulos de longo prazo, em oposição à situação simulada neste trabalho, a partir de um astrócito isolado, estimulado apenas em uma de suas extremidades, só possibilitam comparações qualitativas.

A diversidade de dados na literatura, obtidos de diferentes células, regiões e métodos experimentais, torna impossível determinar valores precisos para os parâmetros do modelo.

Além disso, a maioria deles está relacionada a simplificações de soma de processos individuais. Um exemplo é a ação do conjunto de canais de cálcio, que depende não apenas da dinâmica própria de cada canal, mas também de sua densidade e, na maioria das vezes, de sua disponibilidade na membrana celular. Nesse contexto, é importante avaliar a influência relativa de cada um dos parâmetros do modelo, por meio de uma análise de sensibilidade paramétrica.

#### 4.2 ANÁLISE DE SENSIBILIDADE PARAMÉTRICA

Após a análise do trabalho de Araque *et al.* (2014), é possível inferir que a concentração média citosólica de cálcio duplica em resposta a um estímulo único. Além disso, é possível notar que o tempo de sinalização é de cerca de 1,0 s para este caso. Assim, a escolha dos valores para os parâmetros livres do modelo visou que a concentração média citosólica de cálcio em repouso dobrasse e o tempo de sinalização fosse de 1,0 s, aproximadamente.

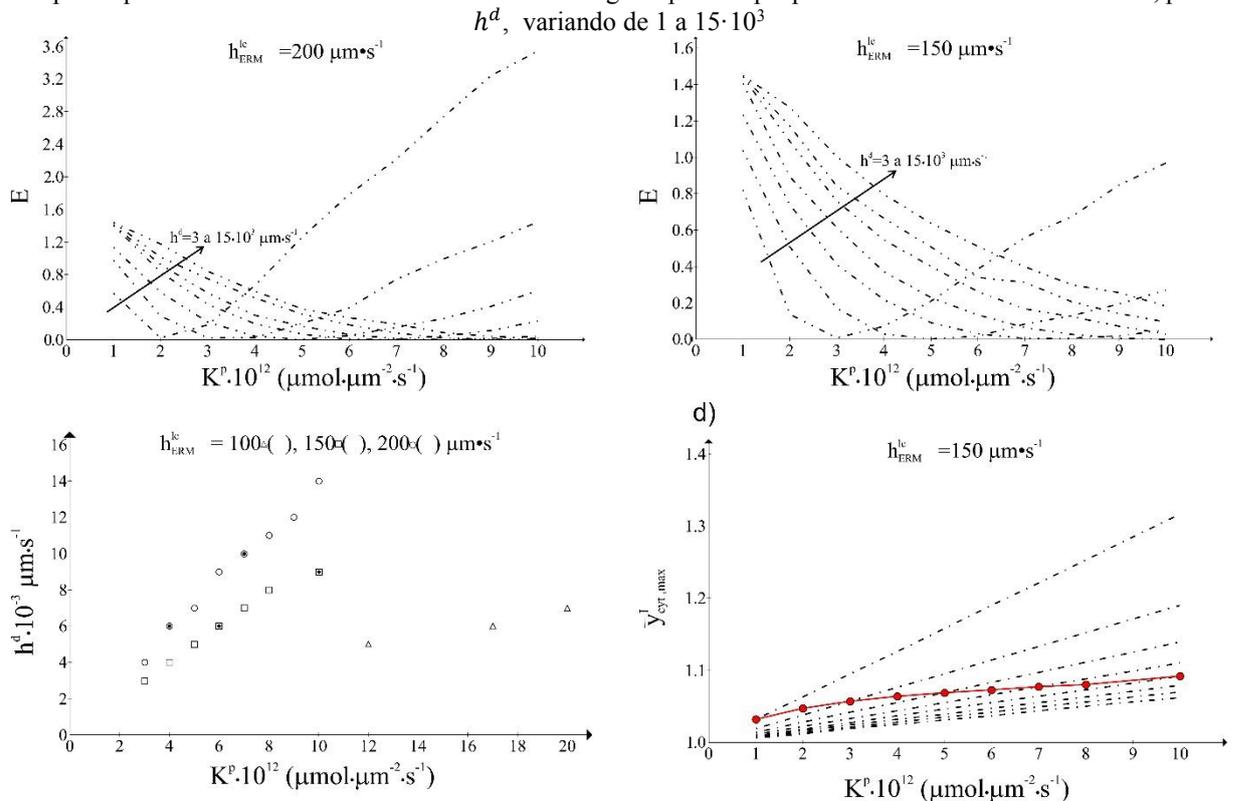
Os parâmetros livres do modelo são as constantes associadas à produção e degradação de  $IP_3$ ,  $K^p$  e  $h^d$ , respectivamente, e o coeficiente de transferência de massa através dos canais ativados por  $IP_3$  na membrana do RE,  $h_{MRE}^{cl}$ . Inicialmente, é apresentada uma análise de parâmetros considerando os valores desejados para o tempo de sinalização e a concentração média citosólica do cálcio. O desvio estimado,  $E$ , foi calculado pelo método dos mínimos quadrados:  $E = (\bar{y}_{cit,máx}^c - 2)^2 + (t_c - 1)^2$ . Na equação,  $\bar{y}_{cit,máx}^c$  é o valor máximo atingido pela concentração média adimensional de  $Ca^{2+}$  citosólico, e  $t_c$  é o tempo para o retorno dessa concentração ao valor de repouso.

A Fig. 06 mostra os resultados obtidos para  $10^{12} \cdot K^p \in [1; 10]$ ,  $10^{-3} \cdot h^d \in [1; 15]$  e  $h_{MRE}^{cl} = 100, 150$  e  $200 \mu m \cdot s^{-1}$ . As Fig. 6a e Fig. 6b mostram os valores de  $E$  para dois valores de  $h_{MRE}^{cl}$ , evidenciando sua dependência aos parâmetros livres do modelo. Na Fig. 6c são indicados os conjuntos de parâmetros que resultam nos menores valores de  $E$  obtidos. Evidenciou-se, dentre os conjuntos avaliados, os mínimos desses valores com um ponto interno. A Fig. 6d mostra os valores máximos obtidos para a concentração média citosólica de  $Ca^{2+}$  para  $h_{MRE}^{cl} = 150 \mu m \cdot s^{-1}$ . A linha contínua liga os pontos com valores mais baixos de  $E$ .

É importante destacar que, para os conjuntos que contêm os valores mais baixos de  $E$ , a concentração máxima média citosólica de  $IP_3$  é restrita a uma faixa estreita. Essa característica é interessante quando avaliada em conjunto com o comportamento linear da relação entre os parâmetros que permitem menos erros.

Considerando os resultados apresentados na Figura 06, os valores escolhidos para os parâmetros livres foram:  $K^p = 6,0 \cdot 10^{-12} \mu\text{mol} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $h^d = 6,0 \cdot 10^3 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  e  $h_{MRE}^{cl} = 150 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Figura 6 - Efeito dos três parâmetros livres nos valores de  $\bar{y}_{cit,max}^c$  e  $t_C$ . a)  $E$  para  $h_{MRE}^{cl} = 200 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . b)  $E$  para  $h_{MRE}^{cl} = 150 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Pode-se notar que diversos conjuntos de parâmetros permitem obter valores de erro próximos de zero. Esses conjuntos são mostrados na parte c). Os quatro pontos destacados correspondem aos menores valores de erro obtidos. O conjunto escolhido foi  $h_{MRE}^{cl} = 150 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $h^d = 6,0 \cdot 10^3 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  e  $K^p = 6,0 \cdot 10^{-12} \mu\text{mol} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . d) Valores máximos da concentração média de IP<sub>3</sub> no citosol para  $h_{MRE}^{cl} = 150 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Cada linha pontilhada une os pontos para o mesmo valor de  $h^d$ , considerando apenas os valores ímpares que variam de 1 a  $15 \cdot 10^3$ . A linha vermelha liga os pontos que possuem os menores valores de  $E$ , para  $h^d$ , variando de 1 a  $15 \cdot 10^3$ .



Fonte: Autora (2021)

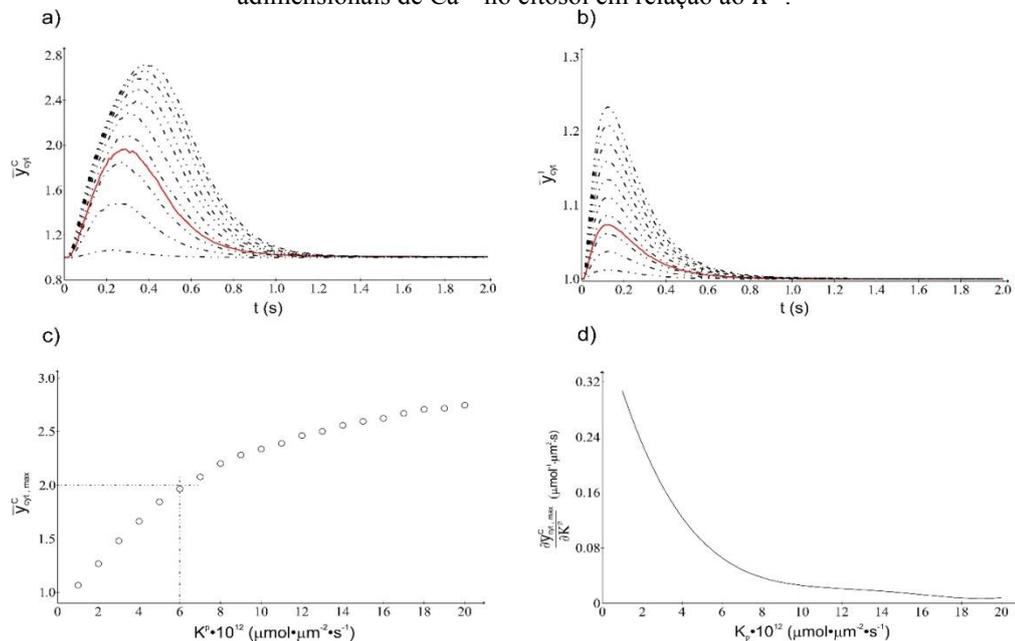
Agora, após a análise do conjunto de parâmetros, será exposto como cada um deles afeta o comportamento do sistema.

#### 4.2.1 Produção de IP<sub>3</sub>

O coeficiente global da taxa de produção de IP<sub>3</sub> afeta diretamente os valores máximos de cálcio e as concentrações médias de IP<sub>3</sub> no citosol, Fig. 7a e Fig. 7b, mostram perfis temporais dessas concentrações. Pode-se observar que o padrão das curvas e o tempo de restituição não se alteram. A Fig. 7c mostra que, à medida que o valor de  $K^p$  aumenta o valor

da concentração máxima de cálcio citosólico aumenta até atingir um limite, a partir do qual qualquer aumento no parâmetro analisado não causa alterações relevantes no pico de concentração de cálcio.

Figura 7 - Dinâmica das concentrações médias de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{IP}_3$  no citosol em função do coeficiente global da taxa de produção do  $\text{IP}_3$ . A) Dinâmica das concentrações médias adimensionais de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol após o estímulo glutamatérgico. As linhas pontilhadas mostram a dinâmica de  $\bar{y}_{cit}^c$  para diversos valores de  $K^p$  (1 a  $19 \cdot 10^{-12}$ ), considerando apenas os valores ímpares). A linha contínua mostra a dinâmica do cálcio para  $K^p = 6,0 \cdot 10^{-12} \mu\text{mol} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . B) Dinâmica da concentração média adimensional de  $\text{IP}_3$  no citosol. As linhas pontilhadas mostram a dinâmica do  $\text{IP}_3$  para valores ímpares de  $K^p$  de 1 a  $19 \cdot 10^{-12}$ . A linha contínua mostra a dinâmica  $\text{IP}_3$  para  $K^p = 6,0 \cdot 10^{-12} \mu\text{mol} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . C) Valores máximos de concentração dimensional de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol para valores de  $K^p$  de 1 a  $20 \cdot 10^{-12}$ . Para  $K^p = 6,0 \cdot 10^{-12} \mu\text{mol} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ , a concentração máxima atinge o dobro do repouso concentração. D) Derivada da curva dos valores máximos das concentrações adimensionais de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol em relação ao  $K^p$ .



Fonte: Autora (2021)

O comportamento observado na Fig. 7c é esperado, uma vez que o aumento da produção do  $\text{IP}_3$  resulta em uma concentração maior deste composto no citosol (Fig. 7b), o que permite a ativação de um maior número de canais no RE, liberando mais cálcio. Este aumento é limitado pela quantidade de canais presentes na membrana do RE, o que reduz a influência deste composto no pico de concentração de cálcio, após um valor específico. A Fig. 7d mostra o gráfico da derivada da curva de cálcio máxima (Fig. 7c) em relação ao  $K^p$ . A partir desta última curva, é possível concluir que o modelo é mais sensível ao parâmetro  $K^p$  no intervalo de  $1,0$  a  $10,0 \cdot 10^{-12} \mu\text{mol} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ . A sensibilidade é significativamente inferior acima deste valor. O valor escolhido,  $K^p = 6,0 \cdot 10^{-12} \mu\text{mol} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ , está exatamente no centro da região

com mais sensibilidade do modelo para este parâmetro. É importante destacar que a produção  $IP_3$  requer energia (O'HAYRE *et al.*, 2013), o que requer a escolha de valores que resultem em uma produção inferior para os mesmos picos desejados de cálcio citosólico.

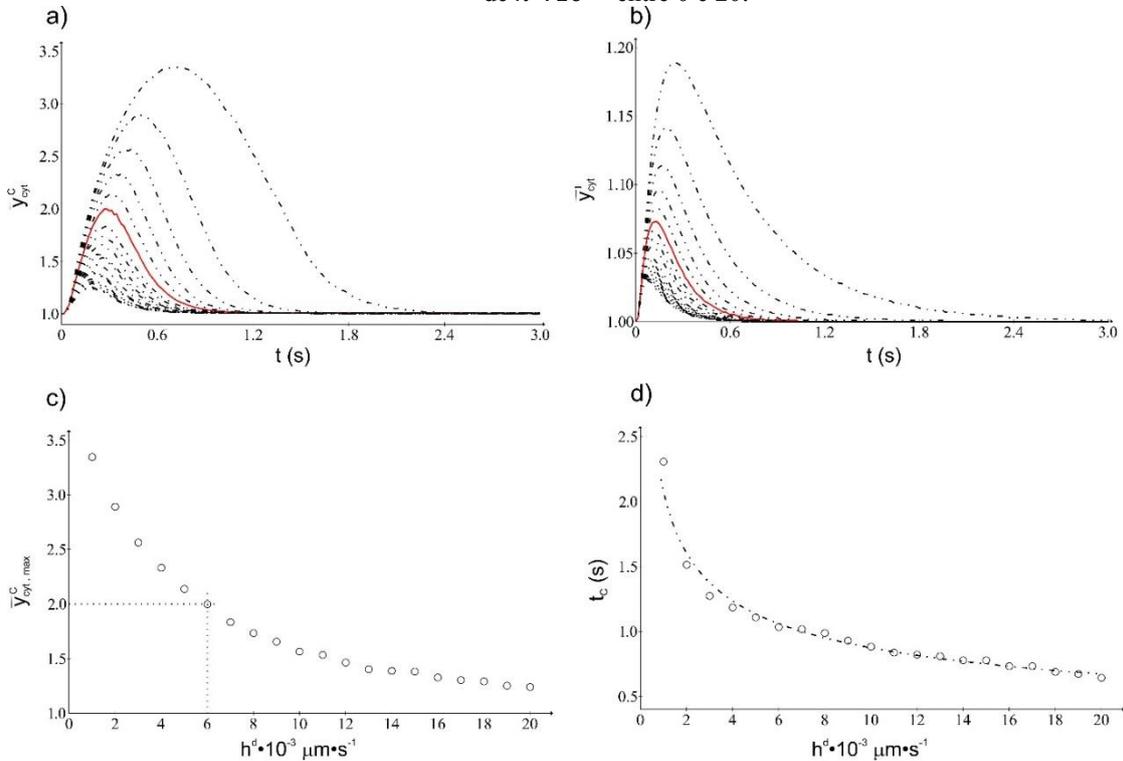
#### 4.2.2 Degradação $IP_3$

A degradação do  $IP_3$ , tal como sua produção, afeta o pico da concentração citosólica de cálcio, como mostrado na Fig. 7a e a Fig. 7c. Quanto maior é o parâmetro associado à degradação, menor é o valor alcançado pela concentração de cálcio. A Fig. 7d mostra o tempo de restituição para a concentração média citosólica de  $Ca^{2+}$ . Observa-se que o tempo de restituição varia significativamente para valores baixos de  $h^d$ , atingindo uma região com pequenas variações para valores mais altos. O início desta região pode ser definido em  $h^d = 6000 \mu m \cdot s^{-1}$ . Conforme mostrado na Fig. 7c, neste ponto, a concentração média máxima atinge duas vezes do valor do repouso. Portanto, este é o valor escolhido, uma vez que reduz o tempo de restituição e maximiza a concentração máxima de  $Ca^{2+}$  citosólico.

#### 4.2.3 Liberação de $Ca^{2+}$

A liberação de cálcio no retículo endoplasmático depende do coeficiente de transferência de massa através canais dependentes de ligante,  $h_{MRE}^{cl}$ . A Fig. 8a mostra a influência na evolução da concentração média citosólica de  $Ca^{2+}$ . A Fig. 8c mostra os valores máximos desta variável para vários valores de  $h_{MRE}^{cl}$ , evidenciando que a liberação de cálcio é diretamente proporcional a este parâmetro. O crescimento constante observado na Fig. 8c é justificado porque, com um coeficiente de transferência de massa mais alto, haverá mais saída de cálcio do RE para o citosol. Uma vez que esse processo seria limitado pela concentração de RE, que é significativamente alta, não são observadas saturações no intervalo analisado. Por outro lado, a concentração média de  $IP_3$  citosólico não é afetada por este parâmetro (Fig. 8b). A Fig. 8d mostra a pouca influência desse parâmetro em relação à concentração mínima de  $Ca^{2+}$  no RE. É importante dizer que a concentração de cálcio no RE diminui cerca de 4,0%, enquanto a de cálcio citosólico aumenta 100%. O valor escolhido para o parâmetro,  $150 \mu m \cdot s^{-1}$ , é, novamente, associado à máxima concentração citosólica de cálcio desejada (0,2  $\mu M$ ).

Figura 8 - Dinâmica das concentrações médias de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{IP}_3$  em função do coeficiente de degradação do  $\text{IP}_3$ . Dinâmica das concentrações médias adimensionais de a  $\text{Ca}^{2+}$  e b  $\text{IP}_3$  no citosol para valores ímpares de  $h^d \cdot 10^{-3}$  entre 0 e 20. c Máximo valores e d tempo de restituição para concentração média de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica para valores de  $h^d \cdot 10^{-3}$  entre 0 e 20.

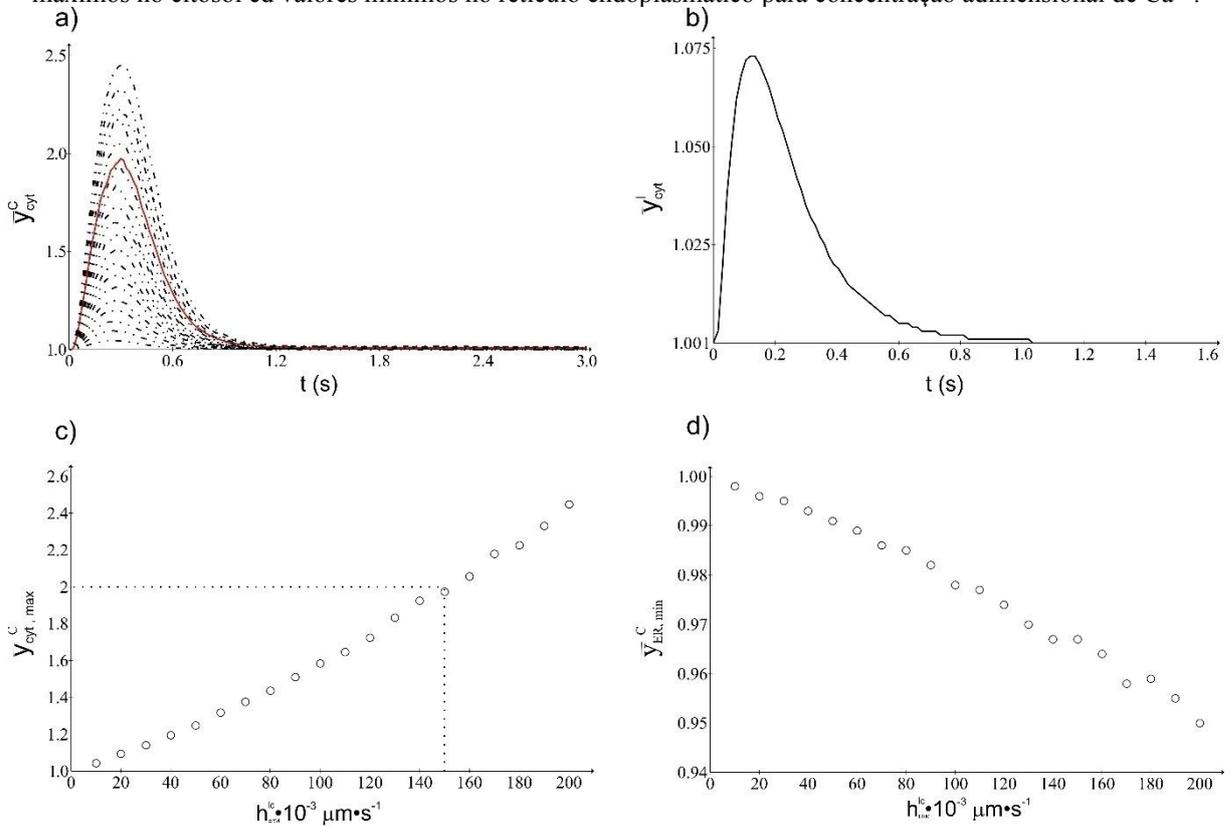


Fonte: Autora (2021)

#### 4.2.4 Implicação da incorporação TRPC

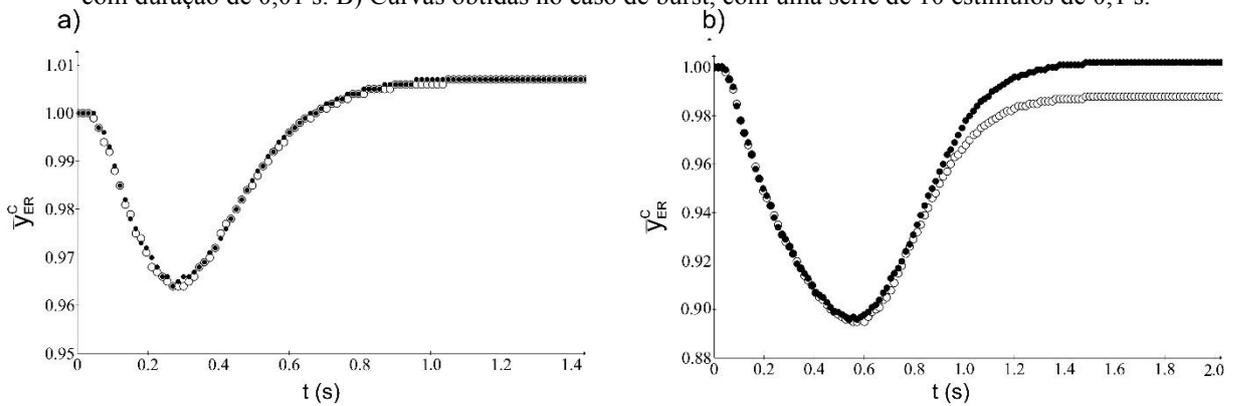
A incorporação do TRPC, sem alterar a dinâmica celular, auxilia na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no ER para retornar ao valor de repouso em um intervalo de tempo razoável (MALLI *et al.*, 2007; Verkhatsky e Parpura, 2014). No entanto, como mostrado na Fig. 9, o efeito não é significativo no caso de um único estímulo glutamatérgico com duração de 0,01 s. Por outro lado, no caso de um trem, com uma série de 10 estímulos em sequência, a incorporação dos TRPC permite que a concentração basal de cálcio retorne ao valor de repouso no retículo. Isso significa que, para um astrócito imerso em um meio celular, com várias conexões e submetido a vários estímulos, esta incorporação é importante.

Figura 9 - Dinâmica das concentrações médias adimensionais de  $Ca^{2+}$  no citosol e no RE em função do coeficiente de transferência de massa dos canais ligantes da membrana do RE. a Dinâmica da concentração média de  $Ca^{2+}$  no citosol para  $h_{MRE}^{cl} \cdot 10^{-3} \in [10,200]$ . A linha contínua corresponde a  $h_{MRE}^{cl} = 150 \mu m \cdot s^{-1}$ . b Dinâmica da concentração média de  $IP_3$  no citosol. Esta dinâmica não depende dos valores de  $h_{MRE}^{cl}$ . c Valores máximos no citosol ed valores mínimos no retículo endoplasmático para concentração adimensional de  $Ca^{2+}$ .



Fonte: Autora (2021)

Figura 10 - Comparação entre a dinâmica da concentração de cálcio no retículo endoplasmático, obtida com e sem a ativação de canais TRPC. Na figura, os círculos brancos representam a dinâmica sem a ativação dos canais TRPC e dos círculos pretos com ativação deste mecanismo. A) Curvas obtidas no caso de um estímulo único, com duração de 0,01 s. B) Curvas obtidas no caso de burst, com uma série de 10 estímulos de 0,1 s.

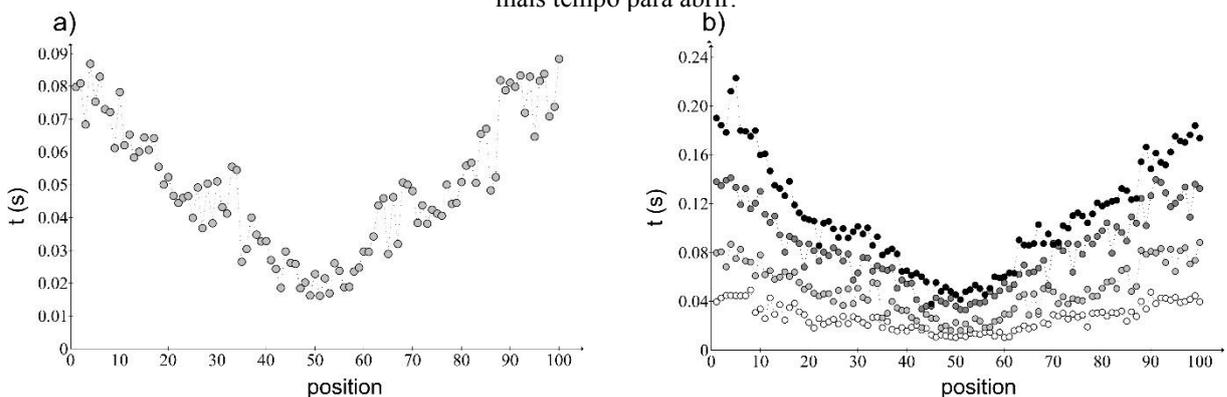


Fonte: Autora (2021)

#### 4.2.5 Probabilidade de abertura

O uso da probabilidade  $P_I$  (Eq. 10) para a abertura dos canais ativados por  $IP_3$  nas membranas do retículo endoplasmático requer que o espaço seja segmentado e numerado. Existem cem posições de canais igualmente espaçadas distribuídas ao longo da membrana do retículo. A Fig. 11 mostra que a numeração começa na face oposta e circunda a membrana no sentido horário. Observa-se que, quando há um estímulo em uma sinapse conectado a um braço de astrócito, o lado do retículo voltado para esse braço tem os canais com as posições 38 a 62, 50 sendo a posição central. No lado oposto, o canal na posição central e mais distante do estímulo tem o número 100. Os canais não abrem em sequência, mas obedecem ao teste de probabilidade. Isto é possível ver na Fig. 11a, que mostra os momentos de abertura para todos os canais. Uma análise da influência dos parâmetros presentes na Eq. 8,  $n_l$ ,  $n_c$ ,  $ks_c$  e  $Ks_c$ , mostra que  $P_I$  é principalmente afetada pelo primeiro. Na Fig. 11 b é possível ver esse efeito. Os valores usados para o expoente  $n_l$  foram 1,0, 2,2, 5,0 e 10,0. O parâmetro reduz a probabilidade e aumenta o tempo de abertura.

Figura 11 - Tempo de abertura do canal ativado por  $IP_3$  em diferentes pontos do contorno da membrana do RE. A) momento de abertura para todos os canais do R. B) Tempo de abertura para os mesmos canais, para diversos valores de  $n_l$ . Os valores desse parâmetro, dos pontos mais claros aos mais escuros, são, respectivamente, 1,0, 2,2, 5,0 e 10,0. Conforme o valor do parâmetro aumenta, a probabilidade de abertura diminui e os canais levam mais tempo para abrir.



Fonte: Autora (2021)

#### 4.2.6 Influência da ER nas ramificações

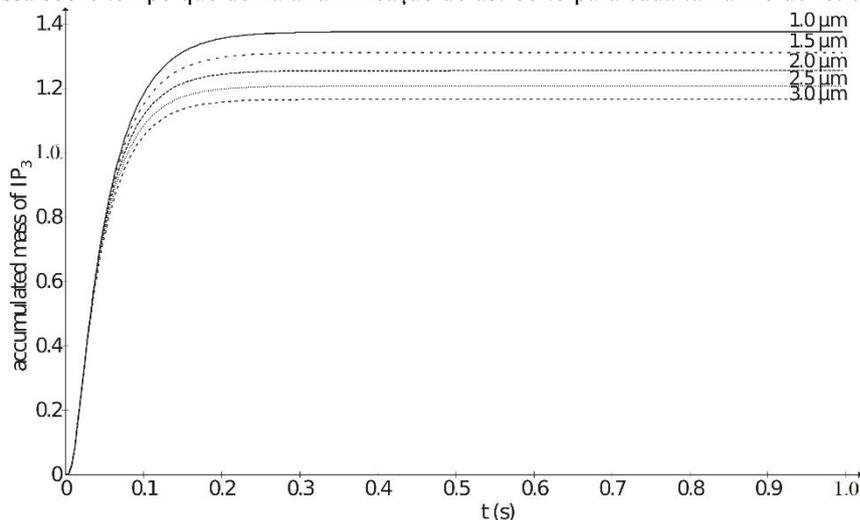
Inicialmente, foi simulada a dinâmica do cálcio em apenas um ramo para verificar como o retículo influenciaria sua dinâmica. Este ramo tinha 6  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1  $\mu\text{m}$  de

largura. O retículo foi posicionado a uma distância de  $0,4 \mu\text{m}$  da membrana do astrócito ao redor da sinapse e tinha um comprimento de  $1 \mu\text{m}$ . Outros comprimentos diferentes foram testados:  $1,5 \mu\text{m}$ ,  $2,0 \mu\text{m}$ ,  $2,5 \mu\text{m}$ ,  $3,0 \mu\text{m}$ .

A diferença entre considerar a modelagem do retículo endoplasmático como homogênea ou heterogênea também foi analisada. Não foram observadas diferenças significativas (resultados não mostrados). Essa informação valida a simulação anterior, que usa um retículo homogêneo.

Primeiramente, avaliou-se o efeito do retículo endoplasmático presente no ramo do astrócito na dinâmica do  $\text{IP}_3$ , uma vez que essa organela é a principal responsável pela propagação de sinalização de cálcio. Observou-se que o retículo diminui a massa de  $\text{IP}_3$  que sai da ramificação, como pode ser visto na Fig. 12. Todos os tamanhos de RE causam esse mesmo efeito, mas quanto maior o tamanho do retículo endoplasmático, menor é a quantidade de  $\text{IP}_3$  que sai da ramificação. Isso se deve ao fenômeno da degradação de  $\text{IP}_3$ , que ocorre nos contornos do endoplasmático retículo. Quanto maior o retículo endoplasmático, maior a degradação. Conseqüentemente, a massa do  $\text{IP}_3$  disponível para ir em frente na célula e liberar cálcio de outros estoques é menor.

Figura 12–Efeito do comprimento do RE na massa de  $\text{IP}_3$  que deixa o ramo do astrócito. As curvas mostram a soma da massa sobre tempo que deixa a ramificação do astrócito para cada tamanho de retículo avaliado.



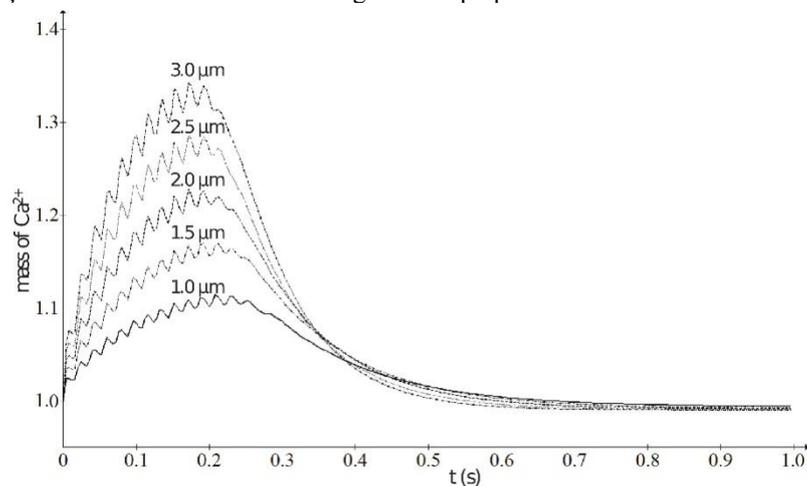
Fonte: Autora (2021)

Como pode ser visto na Fig. 12, a alocação do retículo endoplasmáticos no ramo do astrócito pode não ser bom para a sinalização global de  $\text{Ca}^{2+}$ , porque o retículo diminui a quantidade de  $\text{IP}_3$  disponível para abertura de canais de cálcio no retículo endoplasmático do

corpo celular. Assim, é necessário avaliar o motivo pelo qual a célula teria retículo endoplasmático no final do ramo dos astrócitos.

Estudos indicam que o cálcio tem sinais locais, que não se espalham para a célula inteira (DI CASTRO *et al.*, 2011; KANEMARU *et al.*, 2014). Esses sinais são curtos e velozes. O retículo endoplasmático pode contribuir para eles. A Fig. 13 mostra a dinâmica da concentração adimensional de cálcio no ramo. A partir desta figura, é possível concluir que o retículo endoplasmático promove a sinalização local do cálcio, aumentando os níveis deste composto em um intervalo de tempo pequeno.

Figura 13 - Efeito do comprimento do RE na concentração adimensional de  $\text{Ca}^{2+}$  no ramo do astrócito. As curvas mostram a concentração adimensional de  $\text{Ca}^{2+}$  ao longo do tempo para cada tamanho de retículo avaliado.



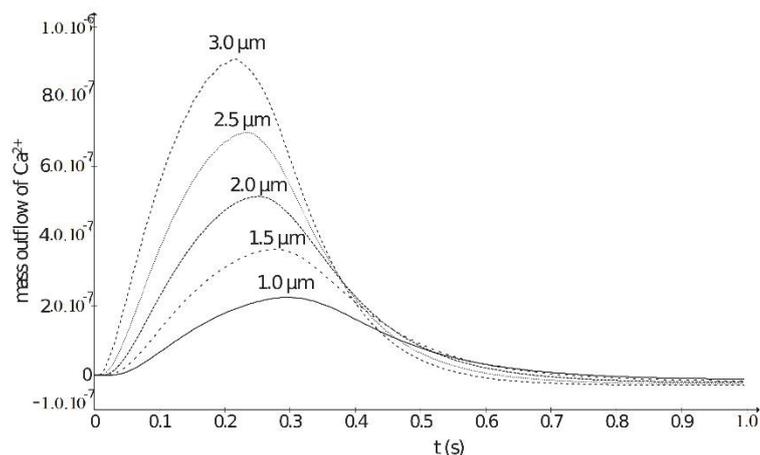
Fonte: Autora (2021)

A dinâmica do cálcio observada na Fig. 13 pode ser utilizada para comparação com os resultados experimentais de Di Castro *et al.* (2011) com relação aos eventos locais de cálcio. No estudo de ramos de astrócitos, os pesquisadores concluíram que sinalização local se estende a distâncias de 3 a 8  $\mu\text{m}$ , tem um tempo de subida de 0,14 s e uma duração de 0,7 s. No presente trabalho, o ramo tem 6  $\mu\text{m}$ , o tempo de subida do cálcio foi de 0,2 s e a duração foi de 0,8 s. Esses resultados podem validar o conjunto de parâmetros definidos na simulação anterior.

Além de contribuir para a sinalização de cálcio local, o retículo endoplasmático pode contribuir para o avanço da onda de cálcio, uma vez que o cálcio liberado segue em frente quando chega ao fim do ramo do astrócito. Como pode ser visto na Fig. 14 e Fig. 15, a quantidade de cálcio que sai da ramificação é pequena e mais lenta que o  $\text{IP}_3$ , então este cálcio possivelmente não contribui significativamente para o avanço da onda de cálcio.

A produção do  $IP_3$  depende da concentração de cálcio em torno dos receptores metabotrópicos. Assim, outro efeito do retículo endoplasmático no final das ramificações do astrócito pode ser aumentar a produção de  $IP_3$ . Nos casos discutidos acima, esse efeito é imperceptível, uma vez que o tempo que ocorre a produção de  $IP_3$  é menor do que o tempo que o  $IP_3$  leva para atingir o retículo endoplasmático, liberar o cálcio e o cálcio chegar à membrana para fortalecer a produção de  $IP_3$ . Assim, foi necessário avaliar um burst, que corresponde a sucessivas transmissões sinápticas. Três estímulos foram realizados a fim de analisar se o cálcio liberado no primeiro estímulo é capaz de influenciar a produção de  $IP_3$  no segundo e terceiro estímulo. Foi descoberto que esse efeito é insignificante. A produção do  $IP_3$  aumenta em cerca de 0,001%.

Figura 14 - Efeito do comprimento do RE na massa de  $Ca^{2+}$  que deixa o ramo do astrócito. As curvas mostram a massa de  $Ca^{2+}$  que deixa o ramo astrocitário ao longo do tempo para cada tamanho do retículo avaliado.



Fonte: Autora (2021)

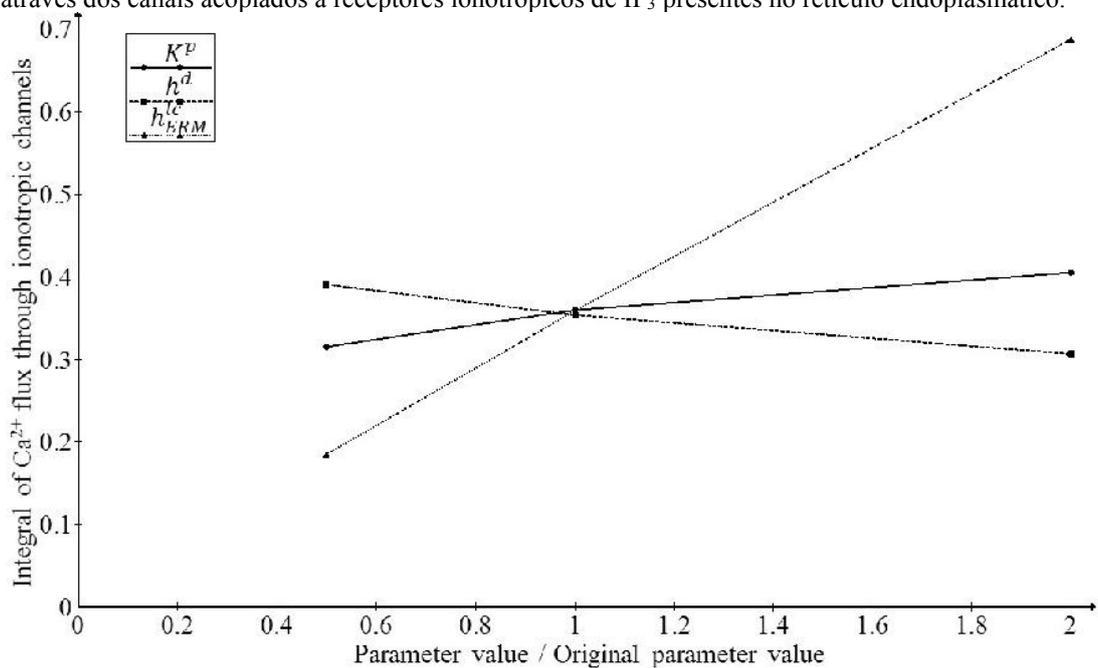
Além do tamanho do retículo, algo que pode influenciar a produção de  $IP_3$  é o posicionamento do retículo endoplasmático. Para avaliar a influência do posicionamento do retículo na produção de  $IP_3$ , o menor retículo testado ( $1,0 \mu\text{m}$ ) foi alocado a  $0,4 \mu\text{m}$ ,  $0,8 \mu\text{m}$  e  $1,4 \mu\text{m}$  de distância da membrana celular onde o  $IP_3$  é produzido. De novo, o efeito na produção de  $IP_3$  foi inferior a 0,001%.

Com essa análise, é possível verificar que o retículo endoplasmático alocado no ramo do astrócito contribui principalmente para a sinalização local do cálcio. Em relação à sinalização global, seu efeito é negativo, uma vez que reduz a quantidade de  $IP_3$  disponível para a abertura de canais no retículo endoplasmático do corpo celular. Também foi possível notar

que o aumento da concentração local de cálcio não influencia a produção de  $IP_3$  significativamente.

A fim de analisar a influência dos parâmetros nesta nova simulação, os mesmos parâmetros da simulação anterior simulação foram avaliados: coeficiente de produção ( $K^p$ ), coeficiente de degradação ( $h^d$ ) e coeficiente de liberação de cálcio ( $h_{MRE}^{cl}$ ). Os resultados podem ser vistos em Fig. 15.

Figura 15 -Efeito dos parâmetros no fluxo de cálcio através dos canais acoplados a receptores ionotrópicos. Influência dos parâmetros relacionados à produção de  $IP_3$ , degradação de  $IP_3$  e liberação de cálcio no fluxo de cálcio através dos canais acoplados a receptores ionotrópicos de  $IP_3$  presentes no retículo endoplasmático.

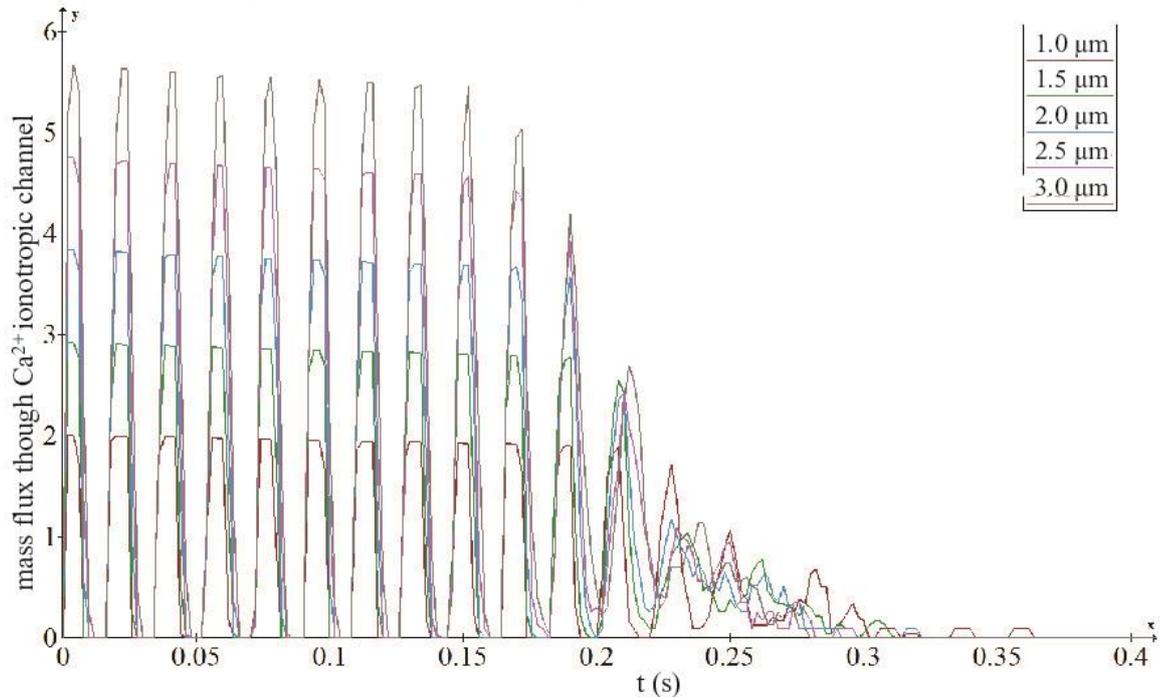


Fonte: Autora (2021)

Conforme discutido anteriormente, os parâmetros relacionados ao  $IP_3$  têm efeitos opostos: quanto maior o coeficiente de produção, maior será a quantidade de cálcio liberada pela RE. Quanto maior o coeficiente de degradação, menos cálcio é liberado do retículo. A Fig. 15 mostra que a influência desses parâmetros não é significativa ao avaliar o fluxo através dos canais acoplados aos receptores ionotrópicos de  $IP_3$ . A respeito do parâmetro de liberação de cálcio, a sensibilidade do modelo é muito mais alta. Isso ocorre porque está diretamente relacionado ao fluxo de saída do cálcio. Se o parâmetro dobra, a saída do fluxo de cálcio duplica. Se o parâmetro for dividido pela metade, o fluxo é reduzido pela metade também.

Outro aspecto interessante a enfatizar é o processo de abertura do canal. No retículo endoplasmático do corpo celular, o  $IP_3$  chega devagar, então os canais vão abrindo sequencialmente. Na ramificação, por outro lado, dado o alto coeficiente de difusão do  $IP_3$  e o pequeno espaço disponível para movimentação, os canais abrem quase simultaneamente. Este fenômeno é evidenciado na Fig. 16. Em todos os tamanhos de RE, todos os canais são abertos simultaneamente quando a concentração de  $IP_3$  é alta. Quando a concentração de  $IP_3$  diminui, em torno de 0,2 s, então é possível observar mais claramente o efeito da probabilidade de abertura nos canais.

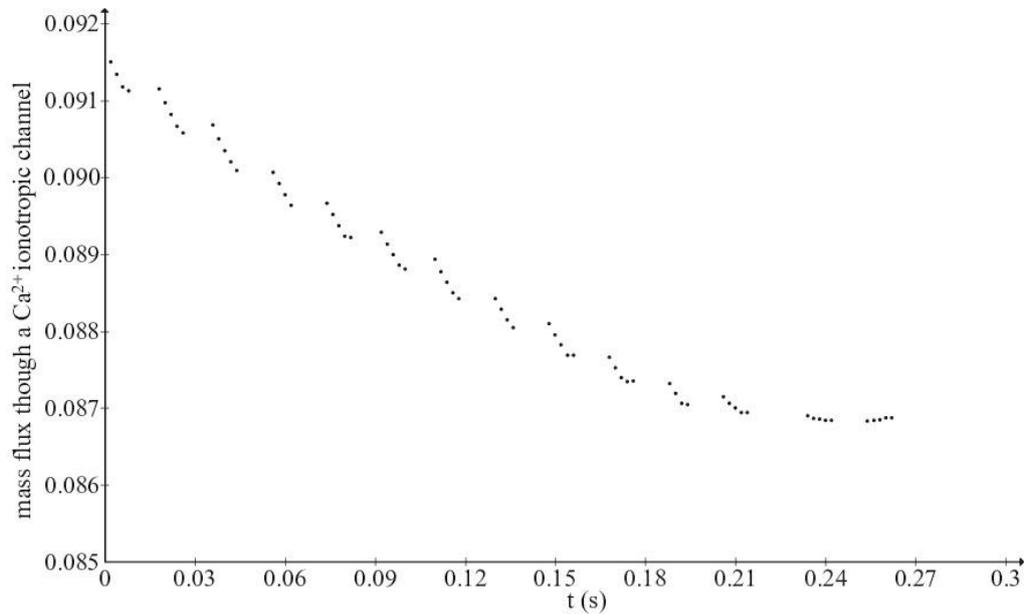
Figura 16 - O Fluxo de cálcio através dos canais de cálcio acoplados a receptores ionotrópicos de  $IP_3$ . Os canais acoplados aos receptores ionotrópicos de  $IP_3$  são abertos simultaneamente no retículo endoplasmático. Quanto maior o retículo, maior o número de canais e, conseqüentemente, maior o fluxo de cálcio. Com o passar do tempo, o número de canais que abre é menor e o efeito da probabilidade de abertura torna-se evidente.



Fonte: Autora (2021)

Também é possível observar na Fig. 16 que, embora todos os canais abram simultaneamente, há uma pequena diminuição no fluxo com o tempo. Isso pode ser melhor compreendido pela observação do fluxo ao longo do tempo através de um único canal. Conforme os gradientes diminuem (aumenta concentração de cálcio na célula e diminui concentração de cálcio no retículo), o fluxo também diminui (Fig. 17).

Figura 17 - O fluxo de cálcio através de um único canal acoplado a um receptor ionotrópico de  $IP_3$ . O fluxo de cálcio através de um canal diminui ao longo do tempo devido à diminuição dos gradientes. Os intervalos em branco representam o canal fechado.



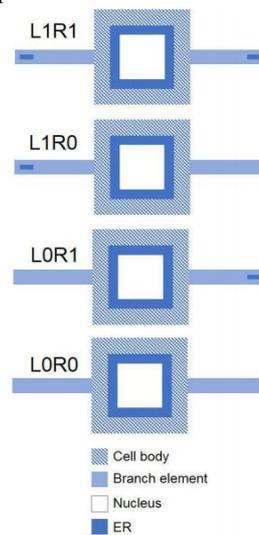
Fonte: Autora (2021)

A simulação computacional de um único ramo permitiu a análise dos efeitos do retículo endoplasmático na sinalização local de cálcio. A análise de seus efeitos na sinalização global de cálcio requer uma geometria mais complexa. Portanto, a geometria mostrada na Fig. 18, contendo um corpo celular e dois ramos ligados a ele, foi simulado. Os dois os ramos contêm retículo endoplasmático. Esta configuração foi denominada L1R1 para facilitar a apresentação dos resultados. Para uma melhor análise dos resultados, outras configurações foram testadas em que o retículo estava presente apenas em um dos ramos (L1R0 e L0R1). Finalmente, para fins de comparação, também avaliamos a situação em que os ramos não contêm retículo (L0R0).

Primeiramente, avaliou-se o efeito da ação do retículo endoplasmático dos ramos na produção de  $IP_3$ . Foi observado que as configurações L1R1 e L1R0 tem uma produção de  $IP_3$  0,000086% maior que a produção de L0R1 e L0R0. Isso mostra que o retículo localizado próximo ao estímulo aumenta a produção de  $IP_3$ . Embora o aumento não seja significativo, ele ocorre. Este aumento na produção do  $IP_3$  ocorre porque o cálcio que é liberado do retículo pelo  $IP_3$  viaja para a membrana celular e aí pode potencializar a produção do  $IP_3$  (PAWELCZYK; MATECKI, 1997). Isso pode ser evidenciado quando se observa que no primeiro estímulo não há distinção e entre o fluxo produzido nas quatro configurações. Nos estímulos subsequentes, é possível notar esta distinção (resultados não mostrados). O que faz o aumento na produção

$IP_3$  tão pequena é a dinâmica temporal de cálcio, que é lenta. Assim, é possível afirmar que o retículo nas extremidades do ramo não contribui para aumentar significativamente a produção de  $IP_3$ .

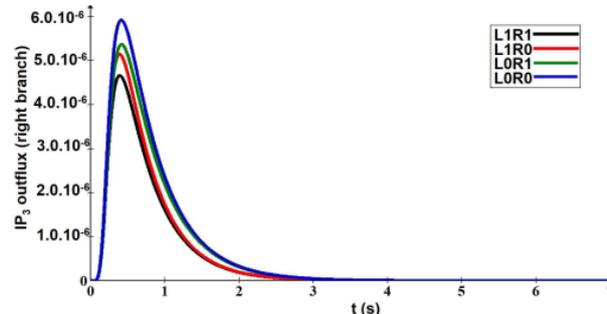
Figura 18 - Configurações geométricas implementadas computacionalmente e comparadas para analisar o efeito do retículo endoplasmático nos ramos do astrócitos. Inicialmente, o retículo foi colocado nos dois ramos do astrócito. Posteriormente, uma simulação foi realizada com o retículo apenas no ramo direito e uma outra simulação com retículo apenas no ramo esquerdo. Finalmente, os dois retículos endoplasmáticos foram removidos e uma nova simulação foi realizada. Os resultados gerados por essas quatro as configurações foram analisados e comparados. O comprimento do do retículo endoplasmático é de  $1 \mu\text{m}$ .



Fonte: Autora (2021)

Com relação à saída  $IP_3$ , isto é, para o  $IP_3$  que avançaria na célula ou até mesmo na rede dos astrócitos, é possível concluir que a configuração mais favorável seria aquela em que não há retículo endoplasmático nos ramos (Fig.19). Isso ocorre porque o retículo promove a degradação deste composto. A degradação do  $IP_3$  irá ser proporcional à quantidade de retículo endoplasmático na célula.

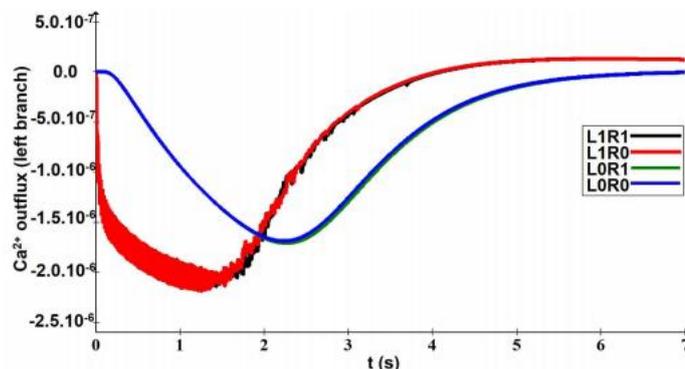
Figura 19 - Saída instantânea do fluxo de  $IP_3$  no final do ramo direito. O gráfico mostra a saída de  $IP_3$  no ramo oposto ao ramo onde o estímulo é aplicado. O fluxo é menor para a situação onde há retículos nos dois ramos, intermediário para as situações com retículo em apenas um dos ramos e maior para o caso em que os ramos não apresentam retículo.



Fonte: Autora (2021)

Em relação ao cálcio, é interessante notar o fluxo de cálcio na membrana celular em que o estímulo ocorre, mostrado na Fig. 20. Nesta região, há um fluxo de saída ao longo tempo, porque o aumento da concentração intracelular de cálcio promove a ação da bomba em uma tentativa de restaurar o estado de repouso. É observado que, nos casos em que o retículo está no ramo esquerdo, a saída ocorre mais rápida e com grande oscilação. Esta oscilação é o resultado da dinâmica probabilística de abertura de canal no retículo. Uma vez que o retículo está perto de onde o fluxo está sendo medido, este efeito probabilístico é mais claramente percebido. Em casos em que não há retículo nas proximidades da membrana onde ocorre o estímulo, o cálcio que chega vem do corpo celular. Como precisa viajar através do corpo celular e do ramo para sair a célula, o efeito probabilístico não é mais evidente.

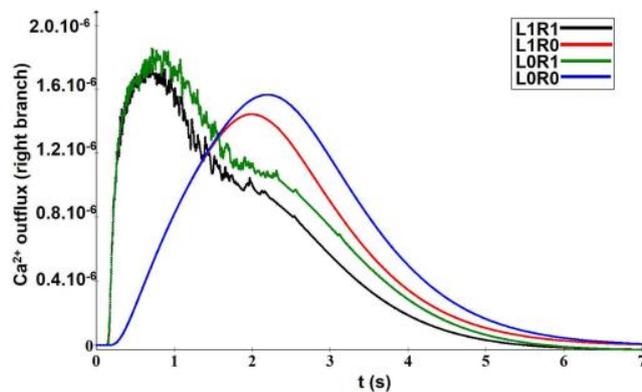
Figura 20 - O fluxo de cálcio na membrana celular onde ocorre o estímulo. O fluxo de cálcio na membrana celular do ramo onde ocorre o estímulo é um fluxo de saída, então é negativo. Quando há um retículo neste ramo, o fluxo é maior e mais oscilatório. Esta oscilação é devida à natureza probabilística da abertura de canais. Quando não há retículo, a difusão dissipa este efeito probabilístico, não mais sendo percebido.



Fonte: Autora (2021)

O fluxo de saída de cálcio no final do ramo em que o estímulo não ocorre pode ser observado em Fig. 21. Essa figura mostra dois tipos de comportamento. O primeiro comportamento corresponde às configurações que contêm o retículo endoplasmático no ramo direito. O segundo comportamento corresponde às configurações que não tem retículo neste ramo. O retículo perto da saída faz com que o fluxo de saída comece mais cedo. Isso ocorre porque o  $IP_3$  atinge esse retículo rapidamente, liberando o cálcio que está dentro dele. Quando não há retículo, o cálcio saindo do final do ramo vem do retículo do corpo celular. Uma vez que o cálcio é dez vezes mais lento que o  $IP_3$ , leva mais tempo para sair nesta configuração.

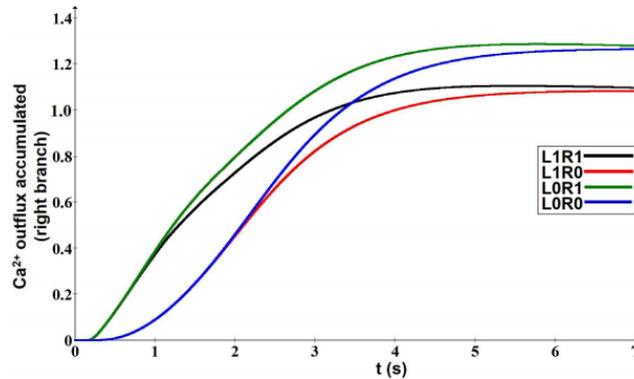
Figura 21 - O fluxo de cálcio na membrana celular no ramo direito. O gráfico mostra o cálcio na membrana celular no ramo direito. As duas dinâmicas mais rápidas correspondem à configuração com retículo neste ramo e as duas mais lentas correspondem às configurações em que não há retículo neste ramo.



Fonte: desenvolvida pelo autor (2021).

Ao calcular o fluxo acumulado ao longo do tempo, a sequência do valor do fluxo de saída de cálcio é  $L0R1 > L0R0 > L1R1 > L1R0$ . Embora o fluxo de cálcio ocorra mais rapidamente quando há um retículo próximo à saída, a quantidade total de cálcio que sai da célula é maior quando não há retículo no outro ramo (Fig. 22). Isto ocorre porque o retículo no ramo esquerdo, além de liberar cálcio, promove a degradação do  $IP_3$ . Desta forma, o  $IP_3$  disponível para atingir o retículo do ramo direito é menor, liberando menos cálcio. A partir desses resultados, conclui-se que a configuração que permite o avanço de uma quantidade maior de cálcio é a que não há retículo no primeiro ramo. A incorporação deste retículo reduz em cerca de 17% a quantidade de cálcio que avançaria tanto na rede de astrócito ou na própria célula. Agora, com respeito ao retículo próximo à saída, aumenta apenas 1% a quantidade de cálcio que sai.

Figura 22 - Cálcio acumulado na membrana celular no ramo direito. O gráfico mostra o fluxo de cálcio acumulado na saída do ramo direito. Existem duas dinâmicas que são mais rápidas (L1R1 e L0R1) e duas que são mais lentas (L1R0 e L0R0). No entanto, eles se separam e uma das dinâmicas mais lentas (L0R0) se torna a segunda configuração que fornece mais cálcio para avançar na célula ou na rede de astrócitos.

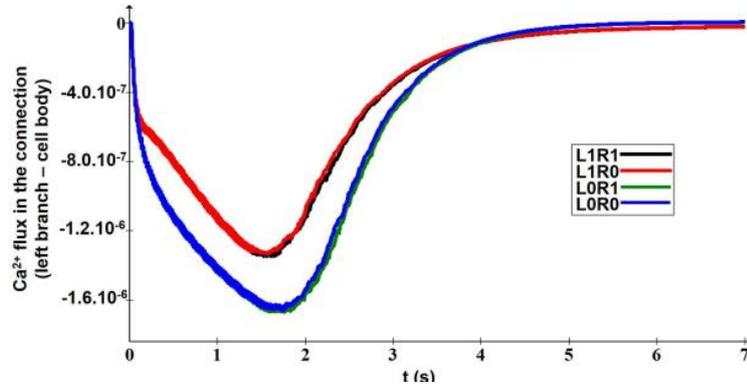


Fonte: Autora (2021)

Existem duas maneiras de analisar o efeito do retículo endoplasmático nos ramos: um com respeito à quantidade de cálcio e IP<sub>3</sub> que estão disponíveis para avançar na rede ou na própria célula, e outro no que diz respeito à dinâmica do avanço desses compostos. O retículo nos ramos diminui a quantidade de IP<sub>3</sub> que avança na célula, conseqüentemente, há uma menor liberação de cálcio no retículo que estão mais à frente no caminho que será percorrido por ele. Por outro lado, o retículo torna a dinâmica do cálcio mais rápida, porque o IP<sub>3</sub>, que se move muito rápido, chega antes nas extremidades da célula, liberando cálcio localmente.

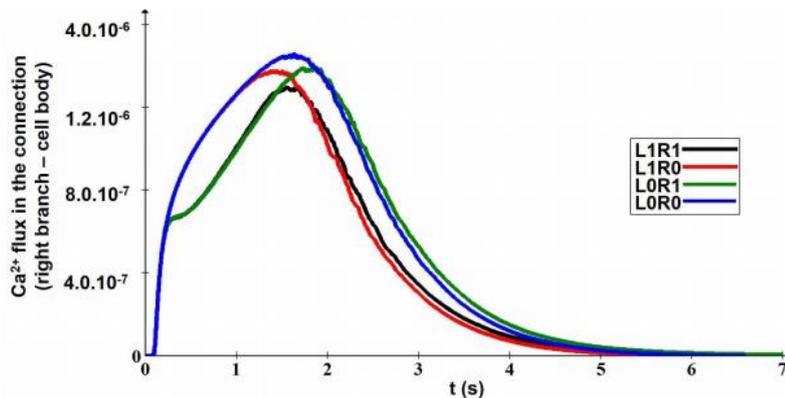
Uma hipótese sobre a localização e função de organelas como o RE nos ramos dos astrócitos envolve a formação de barreiras de difusão (OHEIM *et al.*, 2017). É possível avaliar o efeito da barreira de cálcio ao analisar o fluxo na conexão entre os ramos e o corpo celular. A Fig. 23 mostra o fluxo através da conexão entre o ramo esquerdo e o corpo celular. Para entender o gráfico, é importante considerar que os fluxos positivos indicam a direção da esquerda para a direita e os fluxos negativos indicam a direção da direita para a esquerda. Como esse fluxo é negativo, o cálcio que inicialmente passa por ele é o cálcio que vem do retículo do corpo celular. Isto é porque o IP<sub>3</sub> chega rápido e o retículo está mais perto da conexão do que o retículo do ramo. Comparando a situação L1R0 e L0R0, é possível visualizar a barreira de cálcio, uma vez que o fluxo de cálcio em direção ao ramo diminui consideravelmente. Isto seria de se esperar porque, dada a existência da barreira de cálcio, o fluxo através da conexão entre o corpo celular e o ramo direito eram maiores na situação L1R0 quando comparada com o fluxo na configuração L0R0. No entanto, o fluxo em L0R0 é maior (Fig. 24). Isso ocorre porque, quando há retículo no ramo esquerdo, menos IP<sub>3</sub> é disponibilizado para o corpo celular.

Figura 23 - Fluxo através da conexão entre o lado esquerdo ramo e o corpo celular. O gráfico mostra o fluxo de cálcio na conexão entre o ramo esquerdo e o corpo celular. O fluxo negativo indica que ocorre a partir do corpo celular em direção ao ramo. Existem duas configurações onde o fluxo é maior (LOR1 e LOR0) e dois onde é menor (L1R1 e L1R0). Isso ocorre por duas possíveis razões: ou o cálcio liberado pelo retículo gera uma barreira de cálcio ou menos  $IP_3$  atinge o corpo celular no segundo caso dada a degradação promovida pelo retículo no ramo.



Fonte: Autora (2021)

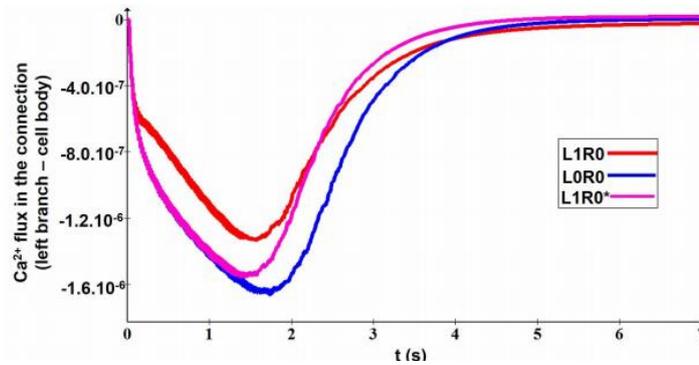
Figura 24 - Fluxo através da conexão entre o ramo direito e o corpo celular. O gráfico mostra o fluxo de cálcio na conexão entre o ramo direito e o corpo celular. O fluxo positivo indica que ocorre a partir do corpo celular em direção ao ramo.



Fonte: Autora (2021)

Para ver se é de fato a barreira de cálcio que provoca a diminuição do fluxo na conexão entre o ramo esquerdo e o corpo celular, foi feita a simulação do L1R0, mas desta vez o retículo apenas degrada o  $IP_3$  e não libera cálcio. Esta simulação é chamada de L1R0 \*. Como pode ser visto na Fig. 25, a diferença entre as curvas azul (LOR0) e rosa (L1R0 \*) mostra que a degradação de  $IP_3$  na verdade diminui. Por outro lado, a diferença entre o rosa (L1R0 \*) e o vermelho (L1R0) mostra o efeito da barreira de cálcio neste fluxo.

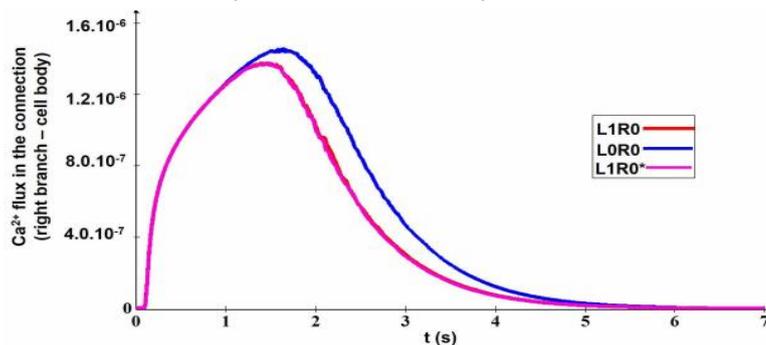
Figura 25 - Fluxo através da conexão entre o ramo esquerdo e o corpo celular em comparação a uma situação em que o retículo não libera cálcio. Para separar os fenômenos, foi feita a simulação L1R0\*. Nela, o retículo, apesar de degradar o  $IP_3$ , não libera cálcio. Dessa forma, é possível conhecer o efeito da barreira de cálcio promovida pelo retículo (diferença entre as linhas rosa e azul). A diferença entre as linhas rosa e vermelha revela o efeito apenas da degradação do  $IP_3$ .



Fonte: Autora (2021)

Para avaliar se a barreira de cálcio promove o avanço da onda de cálcio, pode-se observar a Fig. 26, que compara os fluxos de cálcio na conexão entre o ramo direito e o corpo celular. É possível observar que não há distinção entre as configurações L1R0 e L1R0\*. Isso mostra que os efeitos da barreira do cálcio são dissipados ao longo do caminho do cálcio. Dessa forma, a barreira contribui para a dinâmica local, mas não global.

Figura 26 - Fluxo através da conexão entre o ramo esquerdo e o corpo celular, em comparação com uma situação em que o retículo não libera cálcio. O gráfico mostra que, embora exista a barreira do cálcio, seus efeitos são dissipados ao longo do caminho do cálcio. Portanto, não há distinção entre as linhas rosa e vermelha. O único efeito observado no fluxo de cálcio entre o ramo direito e o corpo celular é a degradação do  $IP_3$  promovida pelo retículo apresentado no ramo esquerdo.



Fonte: Autora (2021)

Com base nesses resultados, é possível perceber que diversos processos influenciam a sinalização do cálcio, porém, há uma distinção entre efeitos locais e globais (DI CASTRO *et al.*, 2011), bem como entre efeitos dinâmicos e quantitativos. O retículo nos ramos participa

principalmente dos efeitos locais e contribui principalmente para a modificação da dinâmica desses processos. Esses retículos, quando dispostos nas proximidades de onde ocorrem os estímulos, contribuem para a sinalização local do cálcio. Isso pode ser interessante para a célula acelerar a liberação de vesículas, que dependem do aumento intracelular concentração de cálcio (ARAQUE *et al.*, 2014).

O retículo alocado nos ramos altera a dinâmica do cálcio, pois permite que a concentração de cálcio aumente mais rapidamente nas extremidades dos ramos localizados longe de onde ocorreu o estímulo. Isso porque o  $IP_3$  se move muito rapidamente, atingindo os retículos localizados nos ramos distantes muito antes que a onda de cálcio produzida pelo retículo localizado no corpo celular os alcance. Quantitativamente, a presença dos retículos nos ramos é pior, pois a degradação do  $IP_3$  por eles causada leva a uma menor liberação de cálcio.

Nossos resultados indicam que, embora os retículos degradem o  $IP_3$  e, consequentemente, diminuam a quantidade de cálcio total que é liberado ao longo da onda de cálcio, eles contribuem para acelerar a dinâmica da onda de cálcio. Existe uma relação entre os processos que resultam em uma compensação: retículo degrada o  $IP_3$ , o que leva à liberação de menos cálcio nos processos mais distantes, mas esse retículo leva, por outro lado, a uma aceleração do processo.

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresenta três contribuições para a comunidade científica: o modelo matemático e sua implementação computacional, a análise de sensibilidade paramétrica e a análise dos efeitos do retículo em ramos de astrócitos.

Em relação à primeira contribuição, o modelo foi construído e implementado computacionalmente, para garantir flexibilidade para análise da sinalização de cálcio em astrócitos. A geometria do astrócito pode ser bastante extensa e ramificada, dependendo apenas do recurso computacional disponível. Além disso, os mecanismos podem ser ativados ou desativados facilmente, permitindo uma análise de seus efeitos sobre o fenômeno estudado. O modelo matemático também leva em consideração parâmetros que podem ser determinados experimentalmente, como: densidade de canal e coeficientes de transferência de massa. Todos esses aspectos são importantes ao comparar os resultados do modelo com um determinado resultado experimental. Isso ocorre porque há uma grande diversidade de resultados experimentais, uma vez que a sinalização do cálcio depende da localização e do tempo dos fluxos de cálcio (VOLTERRA *et al.*, 2014). Esse tipo de informação é facilmente inserido no modelo, permitindo uma comparação mais precisa.

É importante ressaltar que modelos matemáticos devem ser disponibilizados para que a comunidade científica os aprimore. Manninen *et al.* (2017) relataram que vários modelos não são reproduzíveis e não fornecem todas as informações necessárias. Para evitar isso, os autores do presente trabalho disponibilizaram o programa para que todos os que trabalham na área possam utilizá-lo, modificá-lo e gerar os mais diversos resultados, contribuindo assim para a discussão sobre o papel dos astrócitos no cérebro processando informação.

No que diz respeito à análise de sensibilidade paramétrica, mais do que uma reflexão sobre a influência de parâmetros e mecanismos na sinalização do cálcio, permitiu duas conclusões muito pertinentes. A primeira é que existem vários conjuntos de parâmetros que levam à mesma dinâmica do cálcio nos astrócitos. Esse comportamento é bastante comum em sistemas biológicos, uma vez que o sistema como um todo deve responder de forma semelhante nos diversos tipos de situações a que está sujeito (PRINZ *et al.*, 2004). A segunda é que os parâmetros dos modelos matemáticos não podem ser considerados absolutos e requerem revisão constante, principalmente quando não provêm de resultados experimentais. Vários parâmetros utilizados no presente trabalho e em uma sequência de trabalhos disponíveis na literatura foram

inicialmente ajustados por Keizer e De Young (1992). Vários deles foram obtidos a partir da otimização do comportamento da célula como um todo, ou seja, dependendo do tipo de experimento realizado. Além disso, os próprios autores ressaltaram que escolheram apenas um dos conjuntos possíveis para a situação avaliada. O amplo uso desses parâmetros levou a comunidade científica a acreditar que não há necessidade de revisar esses valores. De acordo com Manninen *et al.* (2018), os modelos de sinalização de cálcio em astrócitos são muito semelhantes e utilizam basicamente os mesmos parâmetros. Esses valores não são discutidos e são usados indiscriminadamente. O que propomos é que, dado o desenvolvimento experimental de que dispomos, sejam feitos experimentos específicos para cada mecanismo. Esses novos parâmetros podem ser facilmente agregados ao modelo, permitindo resultados mais precisos.

Por fim, o presente trabalho contribuiu para a análise dos efeitos do retículo nos ramos dos astrócitos. A localização e a função do retículo endoplasmático em astrócitos ainda geram divergência de opinião na comunidade científica (GOLOVINA E BLAUSTEIN, 2000; GOLOVINA, 2005; HOLTZCLAW *et al.*, 2002; OHEIM *et al.*, 2017). Nossos resultados indicam que, quando alocado nos ramos, o retículo tem efeitos positivos e negativos, dependendo de sua posição na célula. Quando colocados próximos ao estímulo, contribuem para a sinalização local do cálcio, mas afetam negativamente a sinalização global devido à degradação do IP3 que promovem. É importante enfatizar que o dano à sinalização global de cálcio causado pelo retículo para evitar o avanço da sinalização. Por outro lado, quando alocados longe do local do estímulo, permitem que a sinalização do cálcio chegue aos pontos mais distantes mais rapidamente. Assim, dada a velocidade com que ocorrem os processos cerebrais, é possível que o astrócito aloque retículo em todos os ramos de forma a acelerar o avanço da sinalização do cálcio. A consequência da sinalização local favorecida pelo retículo nas extremidades dos ramos onde há estímulo ainda precisa ser melhor explorada em trabalhos futuros. A principal hipótese envolve a gliotransmissão (ARAQUE *et al.*, 2014).

É importante enfatizar que os modelos para a sinalização do cálcio nos astrócitos ainda requerem muita sofisticação para que possam contribuir no entendimento das funções desta célula no processamento da informação cerebral. O trabalho colaborativo nos permite o alcance objetivos maiores em menos tempo. Portanto, ao disponibilizar nosso software para a comunidade, esperamos que cientistas experimentais e teóricos contribuam para o desenvolvimento do modelo e estimem os parâmetros de forma mais adequada para que tenhamos uma ferramenta versátil e útil.

## REFERÊNCIAS

- ALLAM, S. L.; GHADERI, V. S.; BOUTEILLER, J-M. C.; LEGENDRE, A.; AMBERT, N.; GREGET, R.; BISCHOFF, S.; BAUDRY, M.; BERGER, T. W. A computational model to investigate astrocytic glutamate uptake influence on synaptic transmission and neuronal spiking. **Frontiers in computational neuroscience**, v. 6, p. 70, out. 2012.
- ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2010.
- AMIRI, M.; BAHRAMI, F.; JANAHMADI, M. Functional modeling of astrocytes in epilepsy: a feedback system perspective. **Neural Computing and Applications**, v. 20, n. 8, p. 1131-1139, 2011.
- ARAQUE, A.; CARMIGNOTO, G.; HAYDON, P. G.; OLIÉT, S. H. R.; ROBITAILLE, R.; VOLTERRA, A. Gliotransmitters travel in time and space. **Neuron**, v. 81, p. 728-739, fev. 2014.
- BAZARGANI, N.; ATTWELL, D. Astrocyte calcium signaling: the third wave. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 182 – 189, fev. 2016.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Neuroscience (Vol. 2). Lippincott Williams & Wilkins. In: BECHARA, A., DAMÁSIO, H., TRANEL, D., & DAMÁSIO, AR (1997). Deciding advantageously before knowing the advantageous strategy. **Science**, v. 275, n. 5304, p. 1293-1295, 2007.
- BERNARDINELLI, Y.; MULLER, D.; NIKONENKO, I. Astrocyte-synapse structural plasticity. **Neural plasticity**, v. 2014, p. 1 - 13, jan. 2014.
- BERNARDINELLI, Y.; SALMON, C.; JONES, E. V.; FARMER, W. T.; STELLWAGEN, D.; MURAI, K. K. Astrocytes display complex and localized calcium responses to single-neuron stimulation in the hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 24, p. 8905-8919, jun 2015.
- BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 4, n. 7, p. 517-529, jul. 2003.
- BINDOCCI, E.; SAVTCHOUK, I.; LIAUDET, N.; BECKER, D.; CARRIERO, G.; VOLTERRA, A. Three-dimensional Ca<sup>2+</sup> imaging advances understanding of astrocyte biology. **Science**, v. 356, p. 1-11, maio 2017.
- BOOTMAN, M. D.; BERRIDGE, M. J.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. **Current Biology**, v. 12, n. 16, p. R563-R565, ago. 2002.
- CANTLON JF. Math, monkeys, and the developing brain. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 109, n. 1, p. 10725-10732, jun. 2012.

CARDOSO, T. S. G.; MUSZKAT, M. Aspectos neurocientíficos da aprendizagem matemática: explorando as estruturas cognitivas inatas do cérebro. **Revista psicopedagogia**, v. 35, n. 106, p. 73-81, abr. 2018.

CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 259-268, jan. 1995.

CLEMENTS, J. D. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. **Trends in neurosciences**, v. 19, n. 5, p. 163-171, maio 1996.

DI CASTRO, M. A.; CHUQUET, J.; LIAUDET, N.; BHAUKAURALLY, K.; SANTELLO, M.; BOUVIER, D.; TIRET, P.; VOLTERRA, A. Local  $Ca^{2+}$  detection and modulation of synaptic release by astrocytes. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 1276 – 1284, out. 2011.

DURKEE, C. A.; ARAQUE, A. Diversity and specificity of astrocyte–neuron communication. **Neuroscience**, v. 396, p. 73-78, jan. 2019.

EISENBERG, B. From structure to function in open ionic channels. **The Journal of Membrane Biology**, v. 171, p. 1-24, set. 1999.

FALCKE, M. On the role of stochastic channel behavior in intracellular  $Ca^{2+}$  dynamics. **Biophysical journal**, v. 84, n. 1, p. 42-56, jan. 2003.

GOLOVINA, V. A.; SONG, H.; JAMES, P. F.; LINGREL, J. B.; BLAUSTEIN, M. P.  $Na^+$  pump  $\alpha 2$ -subunit expression modulates  $Ca^{2+}$  signaling. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 284, n. 2, p. C475-C486, fev. 2003.

GOYES, B. M. P. **Modelagem matemática da dinâmica do íon sódio e do neurotransmissor glutamato em uma sinapse tripartite durante um potencial de ação**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

HALASSA, M. M.; FELLIN, T.; HAYDON, P. G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n. 2, p. 54-63, fev. 2007a.

HALASSA, M. M.; FELLIN, T.; TAKANO, H.; DONG, J-H.; HAYDON, P. G. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 24, p. 6473-6477, 2007b.

HERTZ, L.; ZIELKE, H. R. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. **Trends in neurosciences**, v. 27, n. 12, p. 735-743, 2004.

HJELMSTAD, G. O.; NICOLL, R. A.; MALENKA, R. C. Synaptic refractory period provides a measure of probability of release in the hippocampus. **Neuron**, v. 19, n. 6, p. 1309-1318, dez. 1997.

HÖFER, T.; VENANCE, L.; GIAUME, C. Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 12, p. 4850-4859, jun. 2002.

HOLTZCLAW, L. A.; PANDHIT, S.; BARE, D. J.; MIGNERY, G. A.; RUSSEL, J. T. Astrocytes in adult rat brain express type 2 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors. **Glia**, v. 39, n. 1, p. 69-84, maio 2002.

HOWARTH, C. The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. **Frontiers in neuroscience**, v. 8, n. 103, p. 1 – 9, maio 2014.

KANEMARU, K.; SEKIYA, H.; XU, M.; SATOH, K.; KITAJIMA, M.; YOSHIDA, K.; OKUBO, Y.; SASAKI, T.; MORITOH, S.; HASUWA, H.; MIMURA, M.; HORIKAWA, K.; MATSUI, K.; NAGAI, T.; LINO, M.; TANAKA, K. F. In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive  $\text{Ca}^{2+}$  indicator. **Cell reports**, v. 8, n. 1, p. 311-318, jul. 2014.

KEIZER, J.; DE YOUNG, G. W. Two roles of  $\text{Ca}^{2+}$  in agonist stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. **Biophysical journal**, v. 61, n. 3, p. 649-660, mar. 1992.

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

LALLOUETTE, J.; DE PITTÀ, M.; BERRY, H. Astrocyte networks and intercellular calcium propagation. *In*: DE PITTÀ, M.; BERRY, H. **Computational Glioscience**. Cham: Springer, 2019. p. 177-210.

LI, Y-X.; RINZEL, J. Equations for  $\text{InsP}_3$  receptor-mediated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations derived from a detailed kinetic model: a Hodgkin-Huxley like formalism. **Journal of theoretical Biology**, v. 166, n. 4, p. 461-473, fev. 1994.

LOSI, G.; MARIOTTI, L.; SESSOLO, M.; CARMIGNOTO, G. New tools to study astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signal dynamics in brain networks in vivo. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, p. 134, maio 2017.

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

MALLI, R.; FRIEDEN, M.; HUNKOVA, M.; TRENKER, M.; GRAIER, W. F.  $\text{Ca}^{2+}$  refilling of the endoplasmic reticulum is largely preserved albeit reduced  $\text{Ca}^{2+}$  entry in endothelial cells. **Cell calcium**, v. 41, n. 1, p. 63-76, jan. 2007.

MANNINEN, T.; HAVELA, R.; LINNE, M-L. Computational models for calcium-mediated astrocyte functions. **Frontiers in computational neuroscience**, v.12, n. 14, p. 1-27, abr. 2018.

MANNINEN, T.; HAVELA, R.; LINNE, M-L. Reproducibility and comparability of computational models for astrocyte calcium excitability. **Frontiers in neuroinformatics**, v. 11, p. 11, fev. 2017.

MATYASH, V.; KETTENMANN, H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. **Brain research reviews**, v. 63, n. 1-2, p. 2-10, maio 2010.

MCCARTHY, K. D.; SALM, A. K. Pharmacologically-distinct subsets of astroglia can be identified by their calcium response to neuroligands. **Neuroscience**, v. 41, n. 2-3, p. 325-333, 1991.

MCDUGAL, R. A.; MORSE, T. M.; CARNEVALE, T.; MARENCO, L.; WANG, R.; MIGLIORE, M.; MILLER, P. L.; SHEPHERD, G. M.; HINES, M. L. Twenty years of ModelDB and beyond: building essential modeling tools for the future of neuroscience. **Journal of computational neuroscience**, v. 42, n. 1, p. 1-10, fev. 2017.

MEANS, S.; SMITH, A. J.; SHEPHERD, J.; SHADID, J.; FOWLER, J.; WOJCIKIEWICZ, R. J. H.; MAZEL, T.; SMITH, G. D.; WILSON, B. S. Reaction diffusion modeling of calcium dynamics with realistic ER geometry. **Biophysical journal**, v. 91, n. 2, p. 537-557, jul. 2006.

MIN, R.; SANTELLO, M.; NEVIAN, T. The computational power of astrocyte mediated synaptic plasticity. **Frontiers in computational neuroscience**, v. 6, p. 93, nov. 2012.

MYUNG, I. J.; PITT, M. A. Model comparison in psychology. *In*: WIXTED, J. T. (ed.). **Stevens' handbook of experimental psychology**, New Jersey: Wiley, 2002. p. 85 – 118.

NADKARNI, S.; JUNG, P. Synaptic inhibition and pathologic hyperexcitability through enhanced neuron-astrocyte interaction: a modeling study. **Journal of integrative neuroscience**, v. 4, n. 02, p. 207-226, 2005.

NAVARRETE, M.; PEREA, G.; MAGLIO, L.; PASTOR, J.; SOLA, G. S.; ARAQUE, A. Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue. **Cerebral cortex**, v. 23, n. 5, p. 1240 - 1246, maio 2013.

NEARY, J. T.; VAN BREEMAN, C.; FORSTER, E.; NORENBURG, L. O. B.; NORENBURG, M. D. ATP stimulates calcium influx in primary astrocyte cultures. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 157, n. 3, p. 1410-1416, dez. 1988.

O'HAYRE, M.; VÁZQUEZ-PRADO, J.; KUFAREVA, I.; STAWISKI, E. W.; HANDEL, T. M.; SESHAGIRI, S.; GUTKIND, J. S. The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 6, p. 412-424, maio 2013.

OHEIM, M.; SCHMIDT, E.; HIRRLINGER, J. Local energy on demand: Are 'spontaneous' astrocytic Ca<sup>2+</sup>-microdomains the regulatory unit for astrocyte-neuron metabolic cooperation?. **Brain Research Bulletin**, v. 136, p. 54-64, jan. 2018.

OSCHMANN, F.; MERGENTHALER, K.; JUNGNICHEL, E.; OBERMAYER, K. Spatial separation of two different pathways accounting for the generation of calcium signals in astrocytes. **PLoS computational biology**, v. 13, n. 2, p. 1 - 25, fev. 2017.

PATRUSHEV, I.; GAVRILOV, N.; TURLAPOV, V.; SEMYANOV, A. Subcellular location of astrocytic calcium stores favors extrasynaptic neuron–astrocyte communication. **Cell calcium**, v. 54, n. 5, p. 343-349, nov. 2013.

PAWELCZYK, T.; MATECKI, A. Structural requirements of phospholipase C  $\delta 1$  for regulation by spermine, sphingosine and sphingomyelin. **European journal of biochemistry**, v. 248, n. 2, p. 459-465, set. 1997.

PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends in neuroscience**, v. 32, n. 8, p. 421-431, ago. 2009.

PEREZ-ALVAREZ, A.; NAVARRETE, M.; COVELO, A.; MARTIN, E. D.; ARAQUE, A. Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 38, p. 12738-12744, set. 2014.

PIRTTIMAKI, T. M.; SIMS, R. E.; SAUNDERS, G.; ANTONIO, S. A.; CODADU, N. K.; PARRI, H. R. Astrocyte-mediated neuronal synchronization properties revealed by false gliotransmitter release. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 41, p. 9859 – 9870, out. 2017.

PIVNEVA, T.; HAAS, B.; REYES-HARO, D.; LAUBE, G.; VEH, R. W.; NOLTE, C.; SKIBO, G.; KETTENMANN, H. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in astrocytes: different spatial arrangement of endoplasmic reticulum explains functional diversity in vitro and in situ. **Cell calcium**, v. 43, n. 6, p. 591-601, jun. 2008.

POSKANZER, K. E.; MOLOFSKY, A. V. Dynamism of an astrocyte in vivo: perspectives on identity and function. **Annual review of physiology**, v. 80, p. 143-157, fev. 2018.

QUINAUD, J. T. **Modelo matemático eletrodifusivo da propagação de um potencial de ação no axônio de uma célula neuronal**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

RIZZOLATTI, G.; FOGASSI, L.; GALLESE, V. Neurophysiological mechanisms underlying the understanding and imitation of action. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 9, p. 661-669, set. 2001.

ROCHAT, P.; PASSOS-FERREIRA, C. From Imitation to reciprocation and mutual recognition. In: PINEDA, J. (ed.) **Mirror neurons systems: the role of mirroring processes in social cognition**. New York: Humana Press, 2008. p. 191-212.

RUSAKOV, D. A. Disentangling calcium-driven astrocyte physiology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 226-233, mar. 2015.

SASAKI, T.; ISHIKAWA, T.; ABE, R.; NAKAYAMA, R.; ASADA, A.; MATSUKI, N.; IKEGAYA, Y. Astrocyte calcium signalling orchestrates neuronal synchronization in organotypic hippocampal slices. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 13, p. 2771 – 2783, jul. 2014.

SHIGETOMI, E.; PATEL, S.; KHAKH, B. S. Probing the complexities of astrocyte calcium signaling. **Trends in cell biology**, v. 26, n. 4, p. 300-312, abr. 2016.

SIMPSON, P. B.; HOLTZCLAW, L. A.; LANGLEY, D. B.; RUSSELL, J. T. Characterization of ryanodine receptors in oligodendrocytes, type 2 astrocytes, and O-2A progenitors. **Journal of neuroscience research**, v. 52, n. 4, p. 468-482, dez. 1998.

SHTRAHMAN, E. MARUYAMA, D.; OLARIU, E.; FINK, C. G.; ZOCHOWSKI, M. Understanding spatial and temporal patterning of astrocyte calcium transients via interactions between network transport and extracellular diffusion. **Physical biology**, v. 14, n. 1, p. 1-12, jan. 2017.

SKUPIN, A.; KETTENMANN, H.; WINKLER, U.; WARTENBERG, M.; SAUER, H.; TOVEY, S. C.; TAYLOR, C. W.; FALCKE, M. How does intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillate: by chance or by the clock?. **Biophysical journal**, v. 94, n. 6, p. 2404-2411, mar. 2008.

SUFFCZYNSKI, P.; WENDLING, F.; BELLANGER, J-J.; DA SILVA, F. H. L. Some insights into computational models of (patho) physiological brain activity. **Proceedings of the IEEE**, v. 94, n. 4, p. 784-804, abr. 2006.

TAHERI, M.; HANDY, G.; BORISYUK, A.; WHITE, J. A. Diversity of evoked astrocyte Ca<sup>2+</sup> dynamics quantified through experimental measurements and mathematical modeling. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 11, p. 79, out. 2017.

THEVENOT, C.; CASTEL, C.; DANJON, J.; FANGET, M.; FAYOL, M. The use of the operand-recognition paradigm for the study of mental addition in older adults. **Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences**, v. 68, n. 1, p. 64-67, jan. 2013.

TRABELSI, Y., AMRI, M., BECQ, H., MOLINARI, F. AND ANIKSZTEJN, L. The conversion of glutamate by glutamine synthase in neocortical astrocytes from juvenile rat is important to limit glutamate spillover and peri/extrasynaptic activation of NMDA receptors. **Glia**, v. 65, p. 401-415, fev. 2017.

TRAYNELIS, S.F.; WOLLMUTH, L. P.; MCBAIN, C. J.; MENNITI, F. S.; VANCE, K. M.; OGDEN, K. K.; HANSEN, K. B.; YUAN, H.; MYERS, S. J.; DINGLEDINE, R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 3, p. 405-496, set. 2010.

THORE, S.; DYACHOK, O.; GYLFE, O.; TENGHOLM, A. Feedback activation of phospholipase C via intracellular mobilization and store-operated influx of Ca<sup>2+</sup> in insulin-secreting  $\beta$ -cells. **Journal of cell science**, v. 118, n. 19, p. 4463-4471, jul. 2005.

TU, H.; WANG, Z.; BEZPROZVANNY, I. Modulation of mammalian inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor isoforms by calcium: a role of calcium sensor region. **Biophysical journal**, v. 88, n. 2, p. 1056-1069, fev. 2005a.

TU, H.; WANG, Z.; NOSYREVA, E.; SMEDT, H. de; BEZPROZVANNY, I. Functional characterization of mammalian inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor isoforms. **Biophysical journal**, v. 88, n. 2, p. 1046-1055, fev. 2005.

ULLAH, G.; JUNG, P.; CORNELL-BELL, A. H. Anti-phase calcium oscillations in astrocytes via inositol (1, 4, 5)-trisphosphate regeneration. **Cell Calcium**, v. 39, n. 3, p. 197 – 208, mar. 2006.

VENANCE, L.; STELLA, N.; GLOWINSKI, J.; GIAUME, C. Mechanism involved in initiation and propagation of receptor – induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 1981 – 1992, mar. 1997.

VERKHRATSKY, A.; PARPURA, V. Store-operated calcium entry in neuroglia. **Neuroscience bulletin**, v. 30, n. 1, p. 125-133, maio 2014.

VERKHRATSKY, A.; RODRÍGUEZ, J. J.; PARPURA, V. Calcium signalling in astroglia. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 353, n. 1-2, p. 45-56, abr. 2012.

VILLARREAL, A. SEOANE, R.; TORRE, A. G.; ROSCISZEWSKI, G.; ANGELO, M. F.; ROSSI, A.; BARKER, P. A.; RAMOS, A. J. S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: Implications for its role in the propagation of reactive gliosis. **Journal of neurochemistry**, v. 131, n. 2, p. 190-205, out. 2014.

VOLTERRA, A.; LIAUDET, N.; SAVTCHOUK, I. Astrocyte Ca<sup>2+</sup> signalling: an unexpected complexity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 327-335, abr. 2014.

ZHANG, Y., SLOAN, S. A., CLARKE, L. E. et al. Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse. **Neuron**, v. 89, p. 37-53, jan. 2016.

YANG, Y., VIDENSKY, S., JIN, L., JIE, C., LORENZINI, I., FRANKL, M. AND ROTHSTEIN, J. D. Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. **Glia**, v. 59, p. 200-207, fev. 2011.

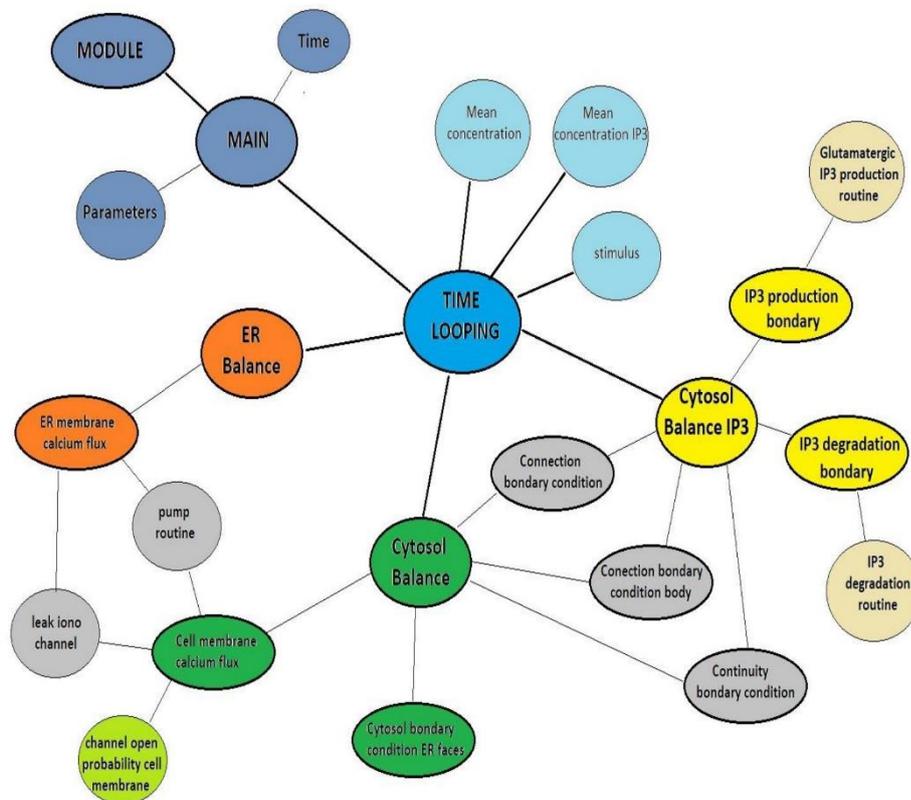
WU, Y-W.; TANG, X.; ARIZONO, M.; BANNAI, H.; SHIH, P-Y.; DEMBITSKAYA, Y.; KAZANTSEV, V.; TANAKA, M.; ITOHARA, S.; MIKOSHIBA, K.; SEMYANOV, A. Spatiotemporal calcium dynamics in single astrocytes and its modulation by neuronal activity. **Cell calcium**, v. 55, n. 2, p. 119-129, fev. 2014.

## APÊNDICE A – Programa computacional desenvolvido

# CALCIUM DYNAMICS IN ASTROCYTES CDA PROGRAM

Version CDAP-01

contribution of endoplasmic reticulum



```

! *****
! Module containing the problem variables
! *****
MODULE Global_Variables ; IMPLICIT NONE
!
REAL*8, PARAMETER :: pi = 3.1415D00, time = 1.0D00
INTEGER, PARAMETER :: n_of_regions = branches + cell_body, branches = 2, &
    Cell_membrane_Glu_open_channel = 1, cell_body = 1
!
INTEGER, PARAMETER :: Nt = time * 3.0D5, n_save_time = Nt/10000, nxy = 205 &
    n_show_screen = Nt/200
!
CHARACTER (len=29):: dir_results
CHARACTER*11, PARAMETER :: dir_main = "RESULTADOS4"
!
INTEGER :: Nx(n_of_regions), Ny(n_of_regions), k_organelles_x(n_of_regions,2), &
    k_organelles_y(n_of_regions,2), boundary_IP3(n_of_regions,2,2), &
    n_saved, reticulum(n_of_regions), points_where_is_the_branch(2), &
    boundary_Ca(n_of_regions,2,2)
!
REAL*8 :: length_x(n_of_regions), length_y(n_of_regions), &
    length_ER_y(n_of_regions), length_ER_x(n_of_regions), &
    delta_x(n_of_regions), delta_y(n_of_regions), Connection(n_of_regions,2,2)
!
REAL*8 :: C(n_of_regions,nxy,nxy,2), C_ER(n_of_regions, nxy, nxy,2), Glu_initial, &
    IP3(n_of_regions, nxy,nxy,2), Ca_initial, Ca_ER_initial, IP3_initial, &
    Ca_cleft,
!
REAL*8 :: Ca_cell_membrane_flux(n_of_regions), Ca_out_flux(n_of_regions), &
    Ca_ER_membrane_flux_cytosol(n_of_regions), IP3_out_flux(n_of_regions), &
    Ca_ER_membrane_flux_ER(n_of_regions), IP3_production_flux(n_of_regions), &
    IP3_degradation_flux_inst(n_of_regions), calcium_flux_ER_membrane, &
    IP3_production_flux_inst(n_of_regions), Ca_out_flux_inst(n_of_regions), &
    Ca_cell_membrane_flux_inst(n_of_regions), &
    IP3_degradation_flux(n_of_regions), IP3_out_flux_inst(n_of_regions), &
    connection_flux_Ca(n_of_regions, n_of_regions), &
    connection_flux_IP3(n_of_regions, n_of_regions), &
    connection_flux_Ca_inst(n_of_regions, n_of_regions), &
    connection_flux_IP3_inst(n_of_regions, n_of_regions)
!
REAL*8 :: leakage_area_fraction, leakage_area_fraction_ER, pump_area_fraction, &
    IP3_degradation_area_fraction, IP3_production_area_fraction, &
    Ca_channels_Glu_area_fraction, pump_area_fraction_ER, &
    Ca_channels_IP3_area_fraction
!
REAL*8 :: pump_coefficient, pump_saturation_coefficient, leakage_coefficient, &
    leakage_coefficient_ER, Diffusion(2), IP3_production_coefficient, &
    Ca_channels_Glu_coefficient, pump_coefficient_ER, &
    Ca_channels_IP3_coefficient, IP3_degradation_coefficient
!
REAL*8 :: pump_Hill, Glu_Hill, Ca_Hill, n_prob_Glu, Glu_sat, n_prob_IP3, IP3_sat, &
    n_prob_Ca, Ca_sat_1, Ca_sat_2, sat_IP3_production_Glu, &
    sat_IP3_production_Ca
!
REAL*8 :: refractory_period, refractory_end_time(n_of_regions, nxy, nxy), &
    refractory_end_time_Glu(n_of_regions, nxy, nxy)
!
REAL*8 :: Glu, Glu_amplitude, oscillation_period, stimulus_time

```

```
! -----  
REAL*8 :: time_n, delta_t, time_scale_to_open_channel_Glu, opening_time , &  
        channel_opening_time_Glu(n_of_regions, nxy, nxy), &  
        channel_time_scale_counting, &  
        channel_closing_time_Glu(n_of_regions, nxy, nxy)  
! -----  
REAL*8 :: ER_channels_time(n_of_regions,nxy,nxy,2), time_scale_to_open_channel_IP3,&  
        opened_closed_channel(n_of_regions, nxy, nxy)  
INTEGER :: opening(n_of_regions, nxy, nxy)  
! -----  
REAL*8 :: lambda_x(n_of_regions,2), lambda_y(n_of_regions,2)  
! -----  
END MODULE Global_Variables  
! *****
```

```

! *****
SUBROUTINE VERIFY_TIME_EXECUTION_AND_RESULT_DIRECTORY(k)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: k, k1, values(8), Initial_time, Partial_time
CHARACTER(8) :: date ; CHARACTER(10) time1 ; CHARACTER(5) :: zone
CHARACTER(4) year ; CHARACTER(2) :: month, day, hh, mm ; CHARACTER(60) :: LINHA1
INTEGER :: minu, seg, milli, Topology_time, After_retina_time, final_time
REAL :: execution_time, stimulation_time, runtime
! -----
! CHECK EXECUTION DATA AND TIME
! -----
IF (k.EQ.1) THEN
CALL DATE_AND_TIME(date,time1,zone,values)
Initial_time = ((values(5)*60 + values(6))*60 +values(7))*10**3 + values(8)
ENDIF
! -----
! CREATES DIRECTORY FOR PRINTING FILES WITH DATA END TIME
! -----
IF (k.EQ.1) THEN
OPEN(1,file="x_divide_the_date.txt")
WRITE(1,4) date ; WRITE(1,41) time1
CLOSE(1)
OPEN(1,file="x_divide_the_date.txt")
READ(1,5) year, month, day ; READ(1,51) hh, mm
CLOSE(1)
dir_results = dir_main/"\\"/year/"."/month/"."/day/"\\"/hh/"."/mm/"\"
CALL system('mkdir '// adjust1(trim(dir_results) ))
WRITE (*,1) "requested directory was created: ", dir_results
ENDIF
1 FORMAT(A37, A25)
4 FORMAT(A8)
41 FORMAT(A10)
5 FORMAT(A4,2A2)
51 FORMAT(2A2)
! -----
! SAVE IN FILE TIME AND DATA OF EXECUTION
! -----
IF (k.EQ.1) THEN
OPEN(55,file=dir_results/"000 data e tempos.txt")
WRITE (*,6) "Execution Date: ", values(3),"/",values(2),"/",values(1)
WRITE (55,6) "NeuronalSYS 3.0 -Execution Date:", &
values(3),"/",values(2),"/",values(1)
WRITE (*,7) " Execution Time:", &
values(5),":",values(6),",",values(7)
WRITE (55,7) " Execution Time:", &
values(5),":",values(6),",",values(7)
WRITE (*,8) "ExecutionDirectory:", dir_results
WRITE (55,8) "ExecutionDirectory:", dir_results
ENDIF
6 FORMAT(A38,i4,A1,i2,A1,i4) ;
7 FORMAT(A38,i4,A1,i2,A1,i3) ;
8 FORMAT(A38,A25)
! -----
! CREATES THE FILES FOR PRINTING RESULTS
! -----
IF (k.EQ.1) THEN
OPEN (102,file=dir_results/"00 Balance IP3 total a.txt")
OPEN (103,file=dir_results/"00 Balance Ca total a.txt")
OPEN (104,file=dir_results/"000 Fluxos Ca a.txt")
OPEN (105,file=dir_results/"000 Fluxos IP3 a.txt")
OPEN (106,file=dir_results/"000 Fluxos instantâneos Ca a.txt")
OPEN (107,file=dir_results/"000 Fluxos instantâneos IP3 a.txt")
ENDIF

```

```

! -----
!   CHECKS THE TIME SPENT ON THE CENTRAL LOOP AND ON THE OVERALL PROGRAM EXECUTION
! -----
IF (k.EQ.2) THEN
  CALL DATE_AND_TIME(date,time1,zone,values)
  final_time = ((values(5)*60 + values(6))*60 +values(7))*10**3 + values(8)
  IF (final_time.GT.Initial_time) THEN
    runtime = final_time - Initial_time
    runtime = runtime / 10**3
  ELSE
    runtime = (24*60*60*10**3 -Initial_time) + final_time
    runtime = runtime/10**3
  ENDIF
  WRITE (*,11) "Total time:",runtime," s"
  WRITE (55,11) "Total time: ",runtime," s"
ENDIF
11 FORMAT(A38,f10.3,A2)
! -----
!   END SUBROUTINE VERIFY_TIME_EXECUTION_AND_RESULT_DIRECTORY
!   *****

```

```
! *****  
PROGRAM Astrocytes_MAIN  
USE Global_Variables  
IMPLICIT NONE  
-----  
! CALL VERIFY_TIME_EXECUTION_AND_RESULT_DIRECTORY(1)  
-----  
! Call the subroutine that specifies the numerical and model parameters  
-----  
! CALL Numerical_parameters( )  
-----  
! Call the time looping to solve the equations  
-----  
! CALL Time_Looping( )  
-----  
! CALL VERIFY_TIME_EXECUTION_AND_RESULT_DIRECTORY(2)  
-----  
END PROGRAM Astrocytes_MAIN  
! *****
```

```

! *****
SUBROUTINE Numerical_parameters
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: j, r, ff, N_ER_y, nauX2, r_x(3), r_Nx(3), r_size(3), r_y(3), r_Ny(3)
REAL*8  :: ER_fraction
! -----
! Defines branches and cell body dimensions
! -----
Nx(1) = 60 ; Ny(1) = 20 ; length_x(1) = 6.0D00 ; length_y(1) = 1.0D00
Nx(2) = 60 ; Ny(2) = 20 ; length_x(2) = 6.0D00 ; length_y(2) = 1.0D00
Nx(3) = 100 ; Ny(3) = 200 ; length_x(3) = 10.0D00 ; length_y(3) = 10.0D00
! -----
reticulum(1) = 1
  IF (reticulum(1) == 1) THEN
    r_x(1) = 10 ; r_Nx(1) = 10 ; r_size(1) = 1 ; r_y(1) = 9 ; r_Ny(1) = 6
  ENDIF
! -----
reticulum(2) = 0
  IF (reticulum(2) == 1) THEN
    r_x(2) = 44 ; r_Nx(2) = 10 ; r_size(2) = 1 ; r_y(2) = 9 ; r_Ny(2) = 6
  ENDIF
! -----
reticulum(3) = 1
  r_x(3) = 18 ; r_Nx(3) = 66 ; r_size(3) = 1 ; r_y(3) = 35 ; r_Ny(3) = 133
! -----
  delta_t = time/Nt
DO r = 1, n_of_regions
  delta_x(r) = length_x(r)/Nx(r)
  delta_y(r) = length_y(r)/Ny(r)
  IF (reticulum(r) == 1) THEN
    k_organelles_x(r,1) = r_x(r)
    k_organelles_x(r,2) = r_x(r) + r_Nx(r) * r_size(r)
    k_organelles_y(r,1) = r_y(r)
    k_organelles_y(r,2) = r_y(r) + r_Ny(r)
    length_ER_x(r) = r_Nx(r) * r_size(r) * delta_x(r)
    length_ER_y(r) = r_Ny(r) * delta_y(r)
  ENDIF
ENDDO
! -----
OPEN(1, file = "0.Parameters.txt")
  READ(1,*) stimulus_time
  READ(1,*) Glu_amplitude, oscillation_period
  READ(1,*) Ca_initial,Ca_ER_initial,IP3_initial,Glu_initial,Ca_cleft
  READ(1,*) Diffusion(1), Diffusion(2)
  READ(1,*) leakage_area_fraction, leakage_coefficient
  READ(1,*) pump_area_fraction, pump_coefficient, pump_Hill, &
    pump_saturation_coefficient
  READ(1,*) Ca_channels_Glu_area_fraction, Ca_channels_Glu_coefficient
  READ(1,*) n_prob_Glu, Glu_sat
  READ(1,*) refractory_period, opening_time
  READ(1,*) time_scale_to_open_channel_Glu
  READ(1,*) leakage_area_fraction_ER, leakage_coefficient_ER
  READ(1,*) pump_area_fraction_ER, pump_coefficient_ER
  READ(1,*) IP3_production_area_fraction, IP3_production_coefficient, &
    sat_IP3_production_Glu, Glu_Hill
  READ(1,*) sat_IP3_production_Ca, Ca_Hill
  READ(1,*) IP3_degradation_area_fraction, IP3_degradation_coefficient
  READ(1,*) Ca_channels_IP3_area_fraction, Ca_channels_IP3_coefficient
  READ(1,*) n_prob_IP3, Ip3_sat, Ca_sat_1, Ca_sat_2, n_prob_Ca
  READ(1,*) time_scale_to_open_channel_IP3
CLOSE(1)

```

```

! -----
! boundary conditions: (2) isolation; (3) stimulus end, entry; (4) free outlet end
!                      (10) connecting branch and cell body
! -----
boundary_Ca(1,1,1) = 3
boundary_Ca(1,1,2) = 10
boundary_IP3(1,1,1) = 3
boundary_IP3(1,1,2) = 10
! -----
boundary_Ca(2,1,1) = 10
boundary_Ca(2,1,2) = 4
boundary_IP3(2,1,1) = 10
boundary_IP3(2,1,2) = 4
! -----
boundary_Ca(3,1,1) = 10
boundary_Ca(3,1,2) = 10
boundary_IP3(3,1,1) = 10
boundary_IP3(3,1,2) = 10
! -----
Connection(1,1,2) = 311
Connection(3,1,1) = 112
Connection(2,1,1) = 312
Connection(3,1,2) = 211
! -----
DO r = 1, n_of_regions
  DO j = 1, 2
    lambda_x(r,j) = Diffusion(j) * delta_t /delta_x(r)**2.
    lambda_y(r,j) = Diffusion(j) * delta_t /delta_y(r)**2.
  ENDDO
ENDDO
! -----
END SUBROUTINE Numerical_parameters
! *****

```

```

! *****
! TIME LOOP SUBROUTINE
! *****
SUBROUTINE Time_Looping( )
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: n, i, j, r, r1, n_count, n_count_to_screen, n_showed
REAL*8 :: Cyt_mass(n_of_regions), ER_mass(n_of_regions), IP3_mass(n_of_regions), &
         initial_mass(n_of_regions), initial_mass_ER(n_of_regions), &
         initial_mass_IP3(n_of_regions), MM_Ca(2), MM_IP3(2), MM_Ca_total, &
         MM_Ca_total_initial, MM_IP3_total, MM_IP3_total_initial
-----
! RESET THE COUNTERS
-----
n_saved = 0 ; n_count = 0 ; n_count_to_screen = 0 ; n_showed = 0
DO r = 1, n_of_regions
  Ca_cell_membrane_flux(r) = 0.0D00 ; Ca_out_flux(r) = 0.0D00
  Ca_ER_membrane_flux_cytosol(r) = 0.0D00 ; IP3_production_flux(r) = 0.0D00
  IP3_out_flux(r) = 0.0D00 ; IP3_degradation_flux(r) = 0.0D00
ENDDO
connection_flux_Ca(1,3) = 0.0D00 ; connection_flux_Ca(3,1) = 0.0D00
connection_flux_IP3(1,3) = 0.0D00 ; connection_flux_IP3(2,3) = 0.0D00
connection_flux_IP3(3,2) = 0.0D00 ; connection_flux_IP3(2,3) = 0.0D00
-----
! DEFINES A HOMOGENEOUS INITIAL CONCENTRATION FOR ALL MESH POINTS
-----
DO r = 1, n_of_regions ; DO i = 2, Nx(r)+2 ; DO j = 2, Ny(r)+2
  C(r,i,j,1) = Ca_initial
  C_ER(r,i,j,1) = Ca_ER_initial
  IP3(r,i,j,1) = IP3_initial
ENDDO ; ENDDO ; ENDDO
-----
! CALCULATES THE INITIAL MASS FOR HOMOGENEOUS CONCENTRATION
-----
DO r = 1, n_of_regions
  initial_mass_IP3(r) = (length_x(r) * length_y(r) &
    - length_ER_x(r)*length_ER_y(r)) * IP3_initial
  initial_mass(r) = (length_x(r) * length_y(r) &
    - length_ER_x(r)*length_ER_y(r)) * Ca_initial
  initial_mass_ER(r) = length_ER_x(r)*length_ER_y(r) * Ca_ER_initial
ENDDO
-----
! MAKES IT POSSIBLE TO PLACE A DIFFERENT INITIAL CONCENTRATION FOR SOME MESH POINTS
-----
!!!! DO r = 1, n_of_regions ! just an example
!!!! DO i = 50, 52 ; DO j = 3, 8
!!!! C(r,i,j,1) = 0.1D00 ; IP3(r,i,j,1) = 0.16D00
!!!! ENDDO ; ENDDO
!!!! DO i = 12, 14 ; DO j = 11, 12
!!!! C_ER(r,i,j,1) = 10.3D00
!!!! ENDDO ; ENDDO
!!!! ENDDO
-----
! CALCULATES THE INITIAL MASS FOR HETEROGENEOUS CONCENTRATION
-----
DO r = 1, n_of_regions
  CALL mean_concentration(1, r, initial_mass(r), initial_mass_ER(r))
  CALL mean_concentration_IP3(1, r, initial_mass_IP3(r))
ENDDO
-----
! TIME LOOPING
-----
DO n = 1, Nt
  DO r = 1, n_of_regions
    Ca_cell_membrane_flux_inst(r) = 0.0D00
    Ca_out_flux_inst(r) = 0.0D00
    IP3_production_flux_inst(r) = 0.0D00
    IP3_out_flux_inst(r) = 0.0D00
    IP3_degradation_flux_inst(r) = 0.0D00

```

```

ENDDO
  connection_flux_Ca_inst(1,3) = 0.0D00
  connection_flux_IP3_inst(1,3) = 0.0D00
  connection_flux_Ca_inst(2,3) = 0.0D00
  connection_flux_IP3_inst(2,3) = 0.0D00
!-----
!  DEFINES THE GLUTAMATERGIC STIMULATION
!-----
n_count = n_count + 1
time_n = (n-1) * delta_t
n_count_to_screen = n_count_to_screen + 1
channel_time_scale_counting = channel_time_scale_counting + delta_t
!-----
IF (n_count_to_screen .EQ. n_show_screen) THEN
  n_count_to_screen = 0 ; n_showed = n_showed + 1 ; WRITE(*,*) n_showed
ENDIF
!-----
!  APPLY THE GLUTAMATERGIC STIMULATION -
!-----
IF (time_n .LT. stimulus_time) THEN
  CALL stimulus
ELSE IF (time_n .GT. 2*stimulus_time .AND. time_n .LT. 3*stimulus_time) THEN
  CALL stimulus
ELSE IF (time_n .GT. 5*stimulus_time .AND. time_n .LT. 6*stimulus_time) THEN
  CALL stimulus
ELSE IF (time_n .GT. 8*stimulus_time .AND. time_n .LT. 9*stimulus_time) THEN
  CALL stimulus
ELSE
  Glu = Glu_initial
ENDIF
!-----
!  CONSERVATION EQUATIONS
!-----
DO r = 1, n_of_regions
  CALL cytosol_balance(r)
  IF (reticulum(r) == 1) CALL ER_balance(r)
  CALL cytosol_balance_IP3(r)
ENDDO
!-----
!  MASS BALANCE
!-----
DO r = 1, n_of_regions
  CALL mean_concentration(2, r, Cyt_mass(r), ER_mass(r))
  CALL mean_concentration_IP3(2, r, IP3_mass(r))
ENDDO
!-----
!  SAVE RESULTS ON FILES
!-----
IF (n_count .EQ. n_save_time) THEN
  n_count = 0 ; n_saved = n_saved + 1
  !-----
  MM_Ca_total = Cyt_mass(1) + Cyt_mass(2) + Cyt_mass(3) + ER_mass(1) &
    + ER_mass(2) + ER_mass(3)
  MM_Ca_total_initial = initial_mass(1) + initial_mass(2) + initial_mass(3) &
    + initial_mass_ER(1) + initial_mass_ER(2) + initial_mass_ER(3)
  MM_IP3_total = IP3_mass(1) + IP3_mass(2) + IP3_mass(3)
  MM_IP3_total_initial = initial_mass_IP3(1) + initial_mass_IP3(2) &
    + initial_mass_IP3(3)
  !-----
  WRITE (102,3) (n-1)*delta_t, MM_IP3_total, MM_IP3_total_initial, &
    MM_IP3_total - (MM_IP3_total_initial + IP3_production_flux(1) &
    - IP3_degradation_flux(1) - IP3_degradation_flux(2) &
    - IP3_degradation_flux(3) + IP3_out_flux(2))
  !-----
  WRITE (103,3) (n-1)*delta_t, MM_Ca_total, MM_Ca_total_initial, MM_Ca_total &
    - (MM_Ca_total_initial + Ca_out_flux(2) + Ca_cell_membrane_flux(1))
  !-----
  WRITE (104,4) (n-1)*delta_t, Ca_cell_membrane_flux(1), Ca_out_flux(2), &
    connection_flux_Ca(1,3) , connection_flux_Ca(2,3)

```

```

! -----
WRITE (105,5) (n-1)*delta_t, IP3_production_flux(1), &
IP3_degradation_flux(1),IP3_degradation_flux(2), &
IP3_degradation_flux(3), IP3_out_flux(2), &
connection_flux_IP3(1,3), connection_flux_IP3(2,3)
! -----
WRITE (106,4) (n-1)*delta_t, Ca_cell_membrane_flux_inst(1), &
Ca_out_flux_inst(2), connection_flux_Ca_inst(1,3) , &
connection_flux_Ca_inst(2,3)
! -----
WRITE (107,5) (n-1)*delta_t, IP3_production_flux_inst(1), &
IP3_degradation_flux_inst(1),IP3_degradation_flux_inst(2), &
IP3_degradation_flux_inst(3), IP3_out_flux_inst(2), &
connection_flux_IP3_inst(1,3), connection_flux_IP3_inst(2,3)
! -----
ENDIF
! -----
! CHANGE VALUES FRON TIME t+1 TO TIME t
! -----
DO r = 1,n_of_regions ; DO i = 2, Nx(r)+2 ; DO j = 2, Ny(r)+2
C(r,i,j,1) = C(r,i,j,2)
IF (reticulum(r) == 1) C_ER(r,i,j,1) = C_ER(r,i,j,2)
IP3(r,i,j,1) = IP3(r,i,j,2)
ENDDO ; ENDDO ; ENDDO
! -----
ENDDO
! -----
1 FORMAT (i6,"",e20.12,"",e20.12)
2 FORMAT (i6,"",8(e20.12,""),e20.12)
3 FORMAT (3(e20.12,""),e20.12)
4 FORMAT (4(e20.12,""),e20.12)
5 FORMAT (7(e20.12,""),e20.12)
ENDSUBROUTINE Time_Looping
! *****

```

```

! *****
! SUBROUTINE FOR CALCULATION OF CA AVERAGE CONCENTRATION
! *****
SUBROUTINE mean_concentration(t, r, mass, mass_ER)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: t, r, i, j
REAL*8 :: suns(9), mass, mass_ER, element, fator(17)
!-----
! MAKES SUMS = 0
!-----
suns(:) = 0.0D00
!-----
! DEFINES THE AREA ELEMENT FOR MASS CALCULATION
!-----
element = delta_x(r) * delta_y(r)
!-----
! CALCULATION OF CYTOSOL CA MEAN CONCENTRATION
!-----
! MASS IN CYTOSOL
!-----
DO i = 3, Nx(r) + 1 ; DO j = 3, Ny(r) + 1
  IF (reticulum(r) == 1 .AND. i .GE. k_organelles_x(r,1) .AND. &
    i .LE. k_organelles_x(r,2) .AND. j .GE. k_organelles_y(r,1) .AND. &
    j .LE. k_organelles_y(r,2)) GOTO 1
  suns(1) = suns(1) + C(r,i,j,t)
1 ENDDO ; ENDDO
!-----
! MASS IN THE BRANCH CONTOURS WITHOUT THE CORNERS
!-----
DO i=3, Nx(r) + 1
  suns(2) = suns(2) + C(r,i,2,t) + C(r,i,Ny(r)+2,t)
ENDDO
DO j=3, Ny(r) + 1
  suns(3) = suns(3) + C(r,2,j,t) + C(r,Nx(r)+2,j,t)
ENDDO
!-----
! MASS IN THE RETICULUM CONTOURS WITHOUT THE CORNERS
!-----
IF (reticulum(r) == 1 ) THEN
  DO i = k_organelles_x(r,1) + 1, k_organelles_x(r,2) - 1
    suns(4) = suns(4) + C(r,i,k_organelles_y(r,1),t) &
      + C(r,i,k_organelles_y(r,2),t)
  ENDDO
  DO j = k_organelles_y(r,1) + 1, k_organelles_y(r,2) - 1
    suns(5) = suns(5) + C(r,k_organelles_x(r,1),j,t) &
      + C(r,k_organelles_x(r,2),j,t)
  ENDDO
ENDIF
!-----
! MASS IN THE BRANCH CORNERS
!-----
suns(6) = C(r,2,2,t) + C(r,2,Ny(r)+2,t) + C(r,Nx(r)+2,2,t) &
  + C(r,Nx(r)+2,Ny(r)+2,t)
!-----
! MASS IN THE RETICULUM CORNERS
!-----
IF (reticulum(r) == 1 ) THEN
  suns(7) = C(r,k_organelles_x(r,1),k_organelles_y(r,1),t) &
    + C(r,k_organelles_x(r,2),k_organelles_y(r,1),t) &
    + C(r,k_organelles_x(r,1),k_organelles_y(r,2),t) &
    + C(r,k_organelles_x(r,2),k_organelles_y(r,2),t)
ENDIF
!-----
! TOTAL MASS IN CYTOSOL
!-----
mass = (suns(1) +(suns(2)+suns(3))/2.0D0 + (suns(4)+suns(5))/2.0D0 &
  + suns(6)/4.0D0 + 3.0D0*suns(7)/4.0D0)*element
!-----

```

```

!-----
! MAKES SUMS = 0
!-----
suns(:) = 0.0D00
!-----
! CALCULATION OF RETICULUM MEAN CONCENTRATION
!-----
IF (reticulum(r) == 1 ) THEN
  ! MASS INSIDE RETICULUM
  !-----
  DO i = k_organelles_x(r,1) +1, k_organelles_x(r,2) -1
    DO j = k_organelles_y(r,1) +1, k_organelles_y(r,2) -1
      suns(1) = suns(1) + C_ER(r,i,j,t)
    ENDDO
  ENDDO
  !-----
  ! MASS IN THE RETICULUM INTERNAL CONTOURS WITHOUT THE CORNERS
  !-----
  DO i = k_organelles_x(r,1) + 1, k_organelles_x(r,2) - 1
    suns(2) = suns(2) + C_ER(r, i, k_organelles_y(r,1),t) &
      + C_ER(r, i, k_organelles_y(r,2),t)
  ENDDO
  DO j = k_organelles_y(r,1) + 1, k_organelles_y(r,2) - 1
    suns(3) = suns(3) + C_ER(r, k_organelles_x(r,1),j,t) &
      + C_ER(r, k_organelles_x(r,2),j,t)
  ENDDO
  !-----
  ! MASS AT THE RETICULUM INTERNAL CORNERS
  !-----
  suns(4) = C_ER(r,k_organelles_x(r,1),k_organelles_y(r,1),t) &
    + C_ER(r,k_organelles_x(r,2),k_organelles_y(r,1),t) &
    + C_ER(r,k_organelles_x(r,1),k_organelles_y(r,2),t) &
    + C_ER(r,k_organelles_x(r,2),k_organelles_y(r,2),t)
  !-----
  ! RETICULUM CA TOTAL MASS
  !-----
  mass_ER = (suns(1) +(suns(2) +suns(3))/2.0D00 + suns(4)/4.0D00)*element
ENDIF
!-----
ENDSUBROUTINE mean_concentration
! *****

```

```

! *****
! SUBROUTINE FOR CALCULATION OF IP3 AVERAGE CONCENTRATION
! *****
SUBROUTINE mean_concentration_IP3(t, r, mass_IP3)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: t, r, i, j
REAL*8 :: suns(7), mass_IP3, element
!-----
suns(:) = 0.0D00 ! MAKES SUMS = 0
!-----
element = delta_x(r) * delta_y(r) ! DEFINES THE AREA ELEMENT FOR MASS CALCULATION
!-----
! CALCULATION OF CYTOSOL MEAN CONCENTRATION
!-----
! MASS IN CYTOSOL
!-----
DO i = 3, Nx(r)+1 ; DO j = 3, Ny(r)+1
  IF (reticulum(r) == 1 .AND. i .GE. k_organelles_x(r,1) .AND. i .LE. &
      k_organelles_x(r,2) .AND. j .GE. k_organelles_y(r,1) .AND.
      j .LE. k_organelles_y(r,2)) GOTO 1
  suns(1) = suns(1) + IP3(r,i,j,t)
1 ENDDO ; ENDDO
!-----
! MASS IN THE BRANCH CONTOURS WITHOUT THE CORNERS
!-----
DO i=3,Nx(r)+1
  suns(2) = suns(2) + IP3(r,i,2,t) + IP3(r,i,Ny(r)+2,t)
ENDDO
DO j=3,Ny(r)+1
  suns(3) = suns(3) + IP3(r,2,j,t) + IP3(r,Nx(r)+2,j,t)
ENDDO
!-----
! MASS IN THE RETICULUM CONTOURS WITHOUT THE CORNERS
!-----
IF (reticulum(r) == 1 ) THEN
  DO i = k_organelles_x(r,1)+1, k_organelles_x(r,2)-1
    suns(4) = suns(4) + IP3(r,i,k_organelles_y(r,1),t) &
                + IP3(r,i,k_organelles_y(r,2),t)
  ENDDO
  DO j = k_organelles_y(r,1)+1, k_organelles_y(r,2)-1
    suns(5) = suns(5) + IP3(r,k_organelles_x(r,1),j,t) &
                + IP3(r,k_organelles_x(r,2),j,t)
  ENDDO
ENDIF
!-----
! MASS IN THE BRANCH CORNERS
!-----
suns(6) = IP3(r,2,2,t) + IP3(r,2,Ny(r)+2,t) + IP3(r,Nx(r)+2,2,t) &
          + IP3(r,Nx(r)+2,Ny(r)+2,t)
!-----
! MASS IN THE RETICULUM CORNERS
!-----
IF (reticulum(r) == 1 ) THEN
  suns(7) = IP3(r,k_organelles_x(r,1),k_organelles_y(r,1),t) &
            + IP3(r,k_organelles_x(r,2),k_organelles_y(r,1),t) &
            + IP3(r,k_organelles_x(r,1),k_organelles_y(r,2),t) &
            + IP3(r,k_organelles_x(r,2),k_organelles_y(r,2),t)
ENDIF
!-----
! TOTAL MASS IN CYTOSOL
!-----
mass_IP3 = (suns(1)+(suns(2)+suns(3))/2.D00 + (suns(4)+suns(5))/2.D00 &
           + suns(6)/4.D00 + 3.D00*suns(7)/4.D00)*element
!-----
ENDSUBROUTINE mean_concentration_IP3
! *****

```

```
!*****  
SUBROUTINE stimulus  
USE Global_Variables  
IMPLICIT NONE  
!  
!-----  
! CALCULATES THE GLUTAMATE CONCNETRATION DURING STIMULATION  
!-----  
! Glu = Glu_initial + Glu_amplitude*sin((2*pi/oscillation_period)*time_n)  
  
! IF (Glu .LT. Glu_initial) Glu = Glu_initial  
!-----  
ENDSUBROUTINE stimulus  
!*****
```

```

! *****
! SUBROUTINE WITH CYTOSOL CALCIUM CONSERVATION EQUATIONS
! *****
SUBROUTINE cytosol_balance(r)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: i, j, r, s
REAL*8 :: l_x_aux, l_y_aux, C_i_plus_1, C_i_minus_1, C_j_plus_1, C_j_minus_1, aux(2)
COMMON/coefficients/ C_i_plus_1, C_i_minus_1, C_j_plus_1, C_j_minus_1

!-----
! CYCLES THROUGH THE COMPUTATIONAL MESH
!-----
DO i = 2, Nx(r) + 2
  DO j = 2, Ny(r) + 2
    !-----
    C_i_plus_1 = C(r,i+1,j,1) ; C_i_minus_1 = C(r,i-1,j,1)
    C_j_plus_1 = C(r,i,j+1,1) ; C_j_minus_1 = C(r,i,j-1,1)
    l_x_aux = lambda_x(r,1) ; l_y_aux = lambda_y(r,1)
    !-----
    ! SKIPS THE POINTS THAT BELONG TO THE ENDOPLASMIC RETICULUM
    !-----
    IF (reticulum(r) == 1) THEN
      IF (i .GT. k_organelles_x(r,1) .AND. i .LT. k_organelles_x(r,2) .AND. &
        j .GT. k_organelles_y(r,1) .AND. j .LT. k_organelles_y(r,2)) GOTO 1
    ENDIF
    !-----
    ! CALCULATES THE FOUR POINTS THAT CORRESPOND TO THE RETICULUM CORNERS
    !-----
    IF (reticulum(r) == 1) THEN
      IF (i.EQ.k_organelles_x(r,1) .AND. j.EQ.k_organelles_y(r,1)) THEN
        aux(1) = ( (C_i_plus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 &
          + (C_i_minus_1 - C(r,i,j,1)) ) / delta_x(r)**2.
        aux(2) = ( (C_j_plus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 &
          + (C_j_minus_1 - C(r,i,j,1)) ) / delta_y(r)**2.
        C(r,i,j,2) = C(r,i,j,1) &
          + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(1)*delta_t*(aux(1) + aux(2))
        GOTO 1
      ENDIF
      IF (i.EQ.k_organelles_x(r,1) .AND. j.EQ.k_organelles_y(r,2)) THEN
        aux(1) = ( (C_i_plus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 &
          + (C_i_minus_1 - C(r,i,j,1)) ) / delta_x(r)**2.
        aux(2) = ( (C_j_plus_1 - C(r,i,j,1)) &
          + (C_j_minus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_y(r)**2.
        C(r,i,j,2) = C(r,i,j,1) &
          + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(1)*delta_t*(aux(1) + aux(2))
        GOTO 1
      ENDIF
      IF (i.EQ.k_organelles_x(r,2) .AND. j.EQ.k_organelles_y(r,1)) THEN
        aux(1) = ( (C_i_plus_1 - C(r,i,j,1)) &
          + (C_i_minus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_x(r)**2.
        aux(2) = ( (C_j_plus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 &
          + (C_j_minus_1 - C(r,i,j,1)) ) / delta_y(r)**2.
        C(r,i,j,2) = C(r,i,j,1) &
          + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(1)*delta_t*(aux(1) + aux(2))
        GOTO 1
      ENDIF
      IF (i.EQ.k_organelles_x(r,2) .AND. j.EQ.k_organelles_y(r,2)) THEN
        aux(1) = ( (C_i_plus_1 - C(r,i,j,1)) &
          + (C_i_minus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_x(r)**2.
        aux(2) = ( (C_j_plus_1 - C(r,i,j,1)) &
          + (C_j_minus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_y(r)**2.
        C(r,i,j,2) = C(r,i,j,1) &
          + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(1)*delta_t*(aux(1) + aux(2))
        GOTO 1
      ENDIF
    ENDIF
  ENDIF
ENDIF

```

```

! -----
! CALLS THE ISOLATION BOUNDARY CONDITION
!
IF (i==2 .AND. boundary_Ca(r,1,1) .EQ. 2)      C_i_minus_1 = C(r,i,j,1)
IF (i==Nx(r) + 2 .AND. boundary_Ca(r,1,2) .EQ. 2) C_i_plus_1 = C(r,i,j,1)
IF (j==2)                                       C_j_minus_1 = C(r,i,j,1)
IF (j==Ny(r) + 2)                              C_j_plus_1 = C(r,i,j,1)
! -----
! CALLS THE INPUT BOUNDARY CONDITION
! -----
IF (i==2 .AND. boundary_Ca(r,1,1) .EQ. 3) THEN
  IF (j .EQ. 2 .OR. j .EQ. Ny(r)+2) THEN
    CALL cell_membrane_calcium_flux(r,i,j,C(r,i,j,1), delta_x(r), &
      Diffusion(1), delta_y(r)/int(2), C_i_minus_1)
  ELSE
    CALL cell_membrane_calcium_flux(r,i,j,C(r,i,j,1), delta_x(r), &
      Diffusion(1), delta_y(r), C_i_minus_1)
  ENDIF
ENDIF
! -----
! CALLS THE OUTPUT BOUNDARY CONDITION
! -----
IF (i==Nx(r) + 2 .AND. boundary_Ca(r,1,2) .EQ. 4) THEN
  IF (j .EQ. 2 .OR. j .EQ. Ny(r)+2) THEN
    CALL continuity_boundary_condition(1,r,C(r,i,j,1), delta_x(r), &
      Diffusion(1), delta_y(r)/int(2), C_i_plus_1)
  ELSE
    CALL continuity_boundary_condition(1,r,C(r,i,j,1), delta_x(r), &
      Diffusion(1), delta_y(r), C_i_plus_1) ;
  ENDIF
ENDIF
! -----
! CALLS THE CONTACT WITH CELL BODY BOUNDARY CONDITION
! -----
IF (r .EQ. 1 .OR. r .EQ. 2) THEN
  IF (boundary_Ca(r,1,1).EQ.10 .AND. i.EQ.2) THEN
    CALL connection_boundary_condition(1, r, i, j, C(r,i,j,1), &
      delta_x(r), Diffusion(1), delta_y(r), C_i_minus_1)
    IF (j .EQ. 2) THEN
      aux(1) = ( (C_i_plus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 &
        + (C_i_minus_1 - C(r,i,j,1)) ) / delta_x(r)**2.
      aux(2) = ( (C_j_plus_1 - C(r,i,j,1)) &
        + (C_j_minus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_y(r)**2.
      C(r,i,j,2) = C(r,i,j,1) &
        + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(1)*delta_t*(aux(1) + aux(2))
      GOTO 1
    ENDIF
    IF (j .EQ. Ny(r)+2) THEN
      aux(1) = ( (C_i_plus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 &
        + (C_i_minus_1 - C(r,i,j,1)) ) / delta_x(r)**2.
      aux(2) = ( (C_j_plus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 &
        + (C_j_minus_1 - C(r,i,j,1)) ) / delta_y(r)**2.
      C(r,i,j,2) = C(r,i,j,1) &
        + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(1)*delta_t*(aux(1) + aux(2))
      GOTO 1
    ENDIF
  ENDIF
ENDIF
IF (boundary_Ca(r,1,2).EQ.10 .AND. i.EQ.Nx(r)+2) THEN
  CALL connection_boundary_condition(1, r, i, j, C(r,i,j,1), &
    delta_x(r), Diffusion(1), delta_y(r), C_i_plus_1)
  IF (j .EQ. 2) THEN
    aux(1) = ( (C_i_plus_1 - C(r,i,j,1)) &
      + (C_i_minus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_x(r)**2.
    aux(2) = ( (C_j_plus_1 - C(r,i,j,1)) &
      + (C_j_minus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_y(r)**2.
    C(r,i,j,2) = C(r,i,j,1) &
      + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(1)*delta_t*(aux(1) + aux(2))
    GOTO 1
  ENDIF
ENDIF

```

```

      IF (j .EQ. Ny(r)+2) THEN
        aux(1) = ( (C_i_plus_1 - C(r,i,j,1)) &
          + (C_i_minus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_x(r)**2.
        aux(2) = ( (C_j_plus_1 - C(r,i,j,1))/2.0D00 &
          + (C_j_minus_1 - C(r,i,j,1)) ) / delta_y(r)**2.
        C(r,i,j,2) = C(r,i,j,1)
          + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(1)*delta_t*(aux(1) + aux(2))
        GOTO 1
      ENDIF
    ENDIF
  ENDIF
  IF (r .EQ. 3) THEN
    IF (boundary_Ca(r,1,1).EQ.10 .AND. i.EQ.2) THEN
      CALL connection_boundary_condition_body(1,1,r,i,j,C_i_minus_1,s)
      IF (s .EQ.2 ) GOTO 1
    ENDIF
    IF (boundary_Ca(r,1,2).EQ.10 .AND. i.EQ.Nx(r)+2) THEN
      CALL connection_boundary_condition_body(1,1,r,i,j,C_i_plus_1,s)
      IF (s .EQ.2 ) GOTO 1
    ENDIF
  ENDIF
! -----
! CALLS THE CONTACT WITH RETICULUM BOUNDARY CONDITION
! -----
  IF (reticulum(r) == 1 ) THEN
    IF (i .EQ. k_organelles_x(r,1) .AND. j .GT. k_organelles_y(r,1) .AND. &
      j .LT. k_organelles_y(r,2)) &
      CALL cytosol_boundary_conditions_ER_faces(r, i, j)
    IF (i .EQ. k_organelles_x(r,2) .AND. j .GT. k_organelles_y(r,1) .AND. &
      j .LT. k_organelles_y(r,2)) &
      CALL cytosol_boundary_conditions_ER_faces(r, i, j)
    IF (j .EQ. k_organelles_y(r,1) .AND. i .GT. k_organelles_x(r,1) .AND. &
      i .LT. k_organelles_x(r,2)) &
      CALL cytosol_boundary_conditions_ER_faces(r, i, j)
    IF (j .EQ. k_organelles_y(r,2) .AND. i .GT. k_organelles_x(r,1) .AND. &
      i .LT. k_organelles_x(r,2)) &
      CALL cytosol_boundary_conditions_ER_faces(r, i, j)
  ENDIF
! -----
! UPDATES LAMBDA TO CRITICAL POINTS
! -----
  IF (r .EQ. 1 .OR. r .EQ. 2) THEN
    IF (i==2 .AND. boundary_Ca(r,1,1).NE.10) THEN
      l_x_aux = 2.0D00*lambda_x(r,1)
    ENDIF
    IF (i==Nx(r)+2 .AND. boundary_Ca(r,1,2).NE.10) THEN
      l_x_aux = 2.0D00*lambda_x(r,1)
    ENDIF
  ENDIF
  IF (r .EQ. 3) THEN
    IF (i==2) THEN
      l_x_aux = 2.0D00*lambda_x(r,1)
    ENDIF
    IF (i==Nx(r)+2) THEN
      l_x_aux = 2.0D00*lambda_x(r,1)
    ENDIF
  ENDIF
  IF (j==2 .OR. j==Ny(r)+2) THEN
    l_y_aux = 2.0D00*lambda_y(r,1)
  ENDIF
! -----
  IF (i .EQ. k_organelles_x(r,1) .OR. i .EQ. k_organelles_x(r,2)) THEN
    IF (j.GT.k_organelles_y(r,1) .AND. j.LT.k_organelles_y(r,2)) &
      l_x_aux=2.0D00*lambda_x(r,1)
  ENDIF
  IF (j .EQ. k_organelles_y(r,1) .OR. j .EQ. k_organelles_y(r,2)) THEN

```

```

      IF (i.GT.k_organelles_x(r,1) .AND. i.LT.k_organelles_x(r,2)) &
         l_y_aux=2.0D00*lambda_y(r,1)
    ENDIF
! -----
! CONSERVATION EQUATION
! -----
    C(r,i,j,2) = C(r,i,j,1) + l_x_aux*(C_i_plus_1 - 2.D00*C(r,i,j,1) &
      + C_i_minus_1) + l_y_aux*(C_j_plus_1 - 2.D00*C(r,i,j,1) + C_j_minus_1)
! -----
1 ENDDO ; ENDDO
! -----
END SUBROUTINE cytosol_balance

```

```

! *****
! SUBROUTINE WITH CYTOSOL IP3 CONSERVATION EQUATIONS
! *****
SUBROUTINE cytosol_balance_IP3(r)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: i, j, r, s
REAL*8 :: l_x_aux, l_y_aux, IP3_i_plus_1, IP3_i_minus_1, IP3_j_plus_1, &
          IP3_j_minus_1, aux(2)
COMMON/coefficients_IP3/ IP3_i_plus_1, IP3_i_minus_1, IP3_j_plus_1, IP3_j_minus_1
!-----
! SWEEPS THE COMPUTATIONAL MESH
!-----
DO i = 2, Nx(r) + 2
  DO j = 2, Ny(r) + 2
    !-----
    IP3_i_plus_1 = IP3(r,i+1,j,1) ; IP3_i_minus_1 = IP3(r,i-1,j,1)
    IP3_j_plus_1 = IP3(r,i,j+1,1) ; IP3_j_minus_1 = IP3(r,i,j-1,1)
    l_x_aux = lambda_x(r,2) ; l_y_aux = lambda_y(r,2)
    !-----
    ! SKIPS THE POINTS THAT BELONG TO THE ENDOPLASMIC RETICULUM
    !-----
    IF (reticulum(r) == 1) THEN
      IF (i .GT. k_organelles_x(r,1) .AND. i .LT. k_organelles_x(r,2) .AND. &
        j .GT. k_organelles_y(r,1) .AND. j .LT. k_organelles_y(r,2)) GOTO 1
    ENDIF
    !-----
    ! CALCULATES THE FOUR POINTS THAT CORRESPOND TO THE RETICULUM CORNERS
    !-----
    IF (reticulum(r) == 1) THEN
      IF (i.EQ.k_organelles_x(r,1) .AND. j.EQ.k_organelles_y(r,1)) THEN
        aux(1) = ( (IP3_i_plus_1 - IP3(r,i,j,1))/2.0D00 + (IP3_i_minus_1 - &
          IP3(r,i,j,1)) ) / delta_x(r)**2.
        aux(2) = ( (IP3_j_plus_1 - IP3(r,i,j,1))/2.0D00 + (IP3_j_minus_1 - &
          IP3(r,i,j,1)) ) / delta_y(r)**2.
        IP3(r,i,j,2) = IP3(r,i,j,1) + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(2)*delta_t &
          *(aux(1) + aux(2))
        GOTO 1
      ENDIF
      IF (i.EQ.k_organelles_x(r,1) .AND. j.EQ.k_organelles_y(r,2)) THEN
        aux(1) = ( (IP3_i_plus_1 - IP3(r,i,j,1))/2.0D00 + (IP3_i_minus_1 - &
          IP3(r,i,j,1)) ) / delta_x(r)**2.
        aux(2) = ( (IP3_j_plus_1 - IP3(r,i,j,1)) + (IP3_j_minus_1 - &
          IP3(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_y(r)**2.
        IP3(r,i,j,2) = IP3(r,i,j,1) + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(2)*delta_t &
          *(aux(1) + aux(2))
        GOTO 1
      ENDIF
      IF (i.EQ.k_organelles_x(r,2) .AND. j.EQ.k_organelles_y(r,1)) THEN
        aux(1) = ( (IP3_i_plus_1 - IP3(r,i,j,1)) + (IP3_i_minus_1 - &
          IP3(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_x(r)**2.
        aux(2) = ( (IP3_j_plus_1 - IP3(r,i,j,1))/2.0D00 + (IP3_j_minus_1 - &
          IP3(r,i,j,1)) ) / delta_y(r)**2.
        IP3(r,i,j,2) = IP3(r,i,j,1) + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(2)*delta_t &
          *(aux(1) + aux(2))
        GOTO 1
      ENDIF
      IF (i.EQ.k_organelles_x(r,2) .AND. j.EQ.k_organelles_y(r,2)) THEN
        aux(1) = ( (IP3_i_plus_1 - IP3(r,i,j,1)) + (IP3_i_minus_1 - &
          IP3(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_x(r)**2.
        aux(2) = ( (IP3_j_plus_1 - IP3(r,i,j,1)) + (IP3_j_minus_1 - &
          IP3(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_y(r)**2.
        IP3(r,i,j,2) = IP3(r,i,j,1) + (4.0D00/3.0D00)*Diffusion(2)* &
          delta_t*(aux(1) + aux(2))
        GOTO 1
      ENDIF
    ENDIF
  ENDIF
!-----
! CALLS THE ISOLATION BOUNDARY CONDITION
!-----

```

```

! -----
IF (i==2 .AND. boundary_IP3(r,1,1) .EQ. 2) IP3_i_minus_1 = IP3(r,i,j,1)
IF (i==Nx(r)+2 .AND. boundary_IP3(r,1,2) .EQ. 2) IP3_i_plus_1 = IP3(r,i,j,1)
IF (j==2) IP3_j_minus_1 = IP3(r,i,j,1)
IF (j==Ny(r) + 2) IP3_j_plus_1 = IP3(r,i,j,1)
! -----
! CALLS THE INPUT BOUNDARY CONDITION
! -----
IF (i==2 .AND. boundary_IP3(r,1,1) .EQ. 3) THEN
  IF (j .EQ. 2 .OR. j .EQ. Ny(r)+2) THEN
    CALL IP3_production_boundary(r, IP3(r,i,j,1), C(r,i,j,1),delta_x(r), &
      Diffusion(2), delta_y(r)/int(2), IP3_i_minus_1)
  ELSE
    CALL IP3_production_boundary(r, IP3(r,i,j,1), C(r,i,j,1),delta_x(r), &
      Diffusion(2), delta_y(r), IP3_i_minus_1)
  ENDIF
ENDIF
! -----
! CALLS THE OUTPUT BOUNDARY CONDITION
! -----
IF (i==Nx(r) + 2 .AND. boundary_IP3(r,1,2) .EQ. 4) THEN
  IF (j .EQ. 2 .OR. j .EQ. Ny(r)+2) THEN
    CALL continuity_boundary_condition(2, r, IP3(r,i,j,1), delta_x(r), &
      Diffusion(2), delta_y(r)/int(2), IP3_i_plus_1)
  ELSE ;
    CALL continuity_boundary_condition(2, r, IP3(r,i,j,1), delta_x(r), &
      Diffusion(2), delta_y(r), IP3_i_plus_1)
  ENDIF
ENDIF
! -----
! CALLS THE CONTACT WITH CELL BODY BOUNDARY CONDITION
! -----
IF (r .EQ. 1 .OR. r .EQ. 2) THEN
  IF (boundary_IP3(r,1,1).EQ.10 .AND. i.EQ.2) THEN
    CALL connection_boundary_condition(2, r, i, j, IP3(r,i,j,1), &
      delta_x(r), Diffusion(2), delta_y(r), IP3_i_minus_1)
    IF (j .EQ. 2) THEN
      aux(1) = ((IP3_i_plus_1 - IP3(r,i,j,1))/2.0D00 + (IP3_i_minus_1 &
        - IP3(r,i,j,1)) / delta_x(r)**2.
      aux(2) = ( (IP3_j_plus_1 - IP3(r,i,j,1)) + (IP3_j_minus_1 - &
        IP3(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_y(r)**2.
      IP3(r,i,j,2) = IP3(r,i,j,1) + (4.0D00/3.0D00) *Diffusion(2) * &
        delta_t*(aux(1) + aux(2))
      GOTO 1
    ENDIF
    IF (j .EQ. Ny(r)+2) THEN
      aux(1) = ((IP3_i_plus_1 - IP3(r,i,j,1))/2.0D00 + (IP3_i_minus_1 &
        - IP3(r,i,j,1)) / delta_x(r)**2.
      aux(2) = ((IP3_j_plus_1 - IP3(r,i,j,1))/2.0D00 + (IP3_j_minus_1 &
        - IP3(r,i,j,1)) / delta_y(r)**2.
      IP3(r,i,j,2) = IP3(r,i,j,1) + (4.0D00/3.0D00) * Diffusion(2) ) &
        * delta_t*(aux(1) + aux(2))
      GOTO 1
    ENDIF
  ENDIF
  IF (boundary_IP3(r,1,2).EQ.10 .AND. i.EQ.Nx(r)+2) THEN
    CALL connection_boundary_condition(2, r, i, j, IP3(r,i,j,1), &
      delta_x(r), Diffusion(2), delta_y(r), IP3_i_plus_1)
    IF (j .EQ. 2) THEN
      aux(1) = ((IP3_i_plus_1 - IP3(r,i,j,1)) + (IP3_i_minus_1 &
        - IP3(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_x(r)**2.
      aux(2) = ( (IP3_j_plus_1 - IP3(r,i,j,1)) + (IP3_j_minus_1 &
        - IP3(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_y(r)**2.
      IP3(r,i,j,2) = IP3(r,i,j,1) + (4.0D00/3.0D00) *Diffusion(2) &
        * delta_t*(aux(1) + aux(2))
      GOTO 1
    ENDIF
    IF (j .EQ. Ny(r)+2) THEN
      aux(1) = ( (IP3_i_plus_1 - IP3(r,i,j,1)) + (IP3_i_minus_1 &

```

```

- IP3(r,i,j,1))/2.0D00 ) / delta_x(r)**2.
aux(2) = ((IP3_j_plus_1 - IP3(r,i,j,1))/2.0D00 + (IP3_j_minus_1 &
- IP3(r,i,j,1)) / delta_y(r)**2.
IP3(r,i,j,2) = IP3(r,i,j,1) + (4.0D00/3.0D00) * Diffusion(2) &
* delta_t*(aux(1) + aux(2))
GOTO 1
ENDIF
ENDIF
ENDIF
IF (r .EQ. 3) THEN
IF (boundary_IP3(r,1,1).EQ.10 .AND. i.EQ.2) THEN
CALL connection_boundary_condition_body(2,1,r,i,j,IP3_i_minus_1,s)
IF (s .EQ.2) GOTO 1
ENDIF
IF (boundary_IP3(r,1,2).EQ.10 .AND. i.EQ.Nx(r)+2) THEN
CALL connection_boundary_condition_body(2,1,r,i,j,IP3_i_plus_1,s)
IF (s .EQ.2) GOTO 1
ENDIF
ENDIF
ENDIF
!-----
! CALLS THE CONTACT WITH RETICULUM BOUNDARY CONDITION
!-----
IF (reticulum(r) == 1) THEN
IF (i .EQ. k_organelles_x(r,1) .AND. j.GT.k_organelles_y(r,1) .AND. &
J .LT. k_organelles_y(r,2)) &
CALL IP3_degradation_boundary(r, IP3(r,i,j,1), delta_x(r), &
Diffusion(2), delta_y(r), IP3_i_plus_1)
IF (i .EQ. k_organelles_x(r,2) .AND. j.GT.k_organelles_y(r,1) .AND. &
J .LT. k_organelles_y(r,2)) &
CALL IP3_degradation_boundary(r,IP3(r,i,j,1), delta_x(r), &
Diffusion(2), delta_y(r), IP3_i_minus_1)
IF (j .EQ. k_organelles_y(r,1) .AND. i.GT.k_organelles_x(r,1) .AND. &
I .LT. k_organelles_x(r,2)) &
CALL IP3_degradation_boundary(r,IP3(r,i,j,1), delta_y(r), &
Diffusion(2), delta_x(r), IP3_j_plus_1)
IF (j .EQ. k_organelles_y(r,2) .AND. i.GT.k_organelles_x(r,1) .AND. &
I .LT. k_organelles_x(r,2)) &
CALL IP3_degradation_boundary(r,IP3(r,i,j,1), delta_y(r), &
Diffusion(2), delta_x(r), IP3_j_minus_1)
ENDIF
!-----
! UPDATES LAMBDA TO CRITICAL POINTS
!-----
IF (r .EQ. 1 .OR. r .EQ. 2) THEN
IF (i==2 .AND. boundary_IP3(r,1,1).NE.10) THEN
l_x_aux = 2.0D00*lambda_x(r,2)
ENDIF
IF (i==Nx(r)+2 .AND. boundary_IP3(r,1,2).NE.10) THEN
l_x_aux = 2.0D00*lambda_x(r,2)
ENDIF
ENDIF
IF (r .EQ. 3) THEN
IF (i==2) THEN ; l_x_aux = 2.0D00*lambda_x(r,2) ; ENDIF
IF (i==Nx(r)+2) THEN ; l_x_aux = 2.0D00*lambda_x(r,2) ; ENDIF
ENDIF
IF (j==2 .OR. j==Ny(r)+2) THEN
l_y_aux = 2.0D00*lambda_y(r,2)
ENDIF
!-----
IF (reticulum(r) == 1) THEN
IF (i .EQ. k_organelles_x(r,1) .OR. i .EQ. k_organelles_x(r,2)) THEN
IF (j.GT.k_organelles_y(r,1) .AND. j.LT.k_organelles_y(r,2)) &
l_x_aux = 2.0D00 * lambda_x(r,2)
ENDIF
IF (j .EQ. k_organelles_y(r,1) .OR. j .EQ. k_organelles_y(r,2)) THEN
IF (i.GT.k_organelles_x(r,1) .AND. i.LT.k_organelles_x(r,2)) &
l_y_aux = 2.0D00 * lambda_y(r,2)
ENDIF
ENDIF
ENDIF
ENDIF

```

```
! -----  
! CONSERVATION EQUATION  
!  
! IP3(r,i,j,2) = IP3(r,i,j,1) + l_x_aux*(IP3_i_plus_1 - 2.D00*IP3(r,i,j,1) &  
! + IP3_i_minus_1) + l_y_aux*(IP3_j_plus_1 - 2.D00*IP3(r,i,j,1) &  
! + IP3_j_minus_1)  
!  
1 ENDDO  
ENDDO  
!  
END SUBROUTINE cytosol_balance_IP3  
! *****
```

```

! *****
! SUBROUTINE WITH RETICULUM CONSERVATION EQUATIONS
! *****
SUBROUTINE ER_balance(r)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: i, j, r
REAL*8 :: l_x_aux, l_y_aux, C_ER_i_plus_1, C_ER_i_minus_1, C_ER_j_plus_1, &
          C_ER_j_minus_1
!-----
! CYCLES THROUGH THE COMPUTATIONAL MESH
!-----
DO i = k_organelles_x(r,1), k_organelles_x(r,2)
  DO j = k_organelles_y(r,1), k_organelles_y(r,2)
    !-----
    C_ER_i_plus_1 = C_ER(r,i+1,j,1) ; C_ER_i_minus_1 = C_ER(r,i-1,j,1)
    C_ER_j_plus_1 = C_ER(r,i,j+1,1) ; C_ER_j_minus_1 = C_ER(r,i,j-1,1)
    l_x_aux = lambda_x(r,1) ; l_y_aux = lambda_y(r,1)
    !-----
    ! CALLS THE CONTACT WITH RETICULUM BOUNDARY CONDITION
    !-----
    IF (i .EQ. k_organelles_x(r,1)) THEN
      IF (j .EQ. k_organelles_y(r,1) .OR. j .EQ. k_organelles_y(r,2)) THEN
        C_ER_i_minus_1 = C_ER(r,i,j,1)
      ELSE
        CALL ER_membrane_calcium_flux(2,r,i,j,C_ER(r,i,j,1),C(r,i,j,1), &
          delta_x(r), Diffusion(1), delta_y(r), C_ER_i_minus_1)
      ENDIF
    ENDIF
    !-----
    IF (i .EQ. k_organelles_x(r,2)) THEN
      IF (j .EQ. k_organelles_y(r,1) .OR. j .EQ. k_organelles_y(r,2)) THEN
        C_ER_i_plus_1 = C_ER(r,i,j,1)
      ELSE
        CALL ER_membrane_calcium_flux(2,r,i,j,C_ER(r,i,j,1),C(r,i,j,1), &
          delta_x(r), Diffusion(1), delta_y(r), C_ER_i_plus_1)
      ENDIF
    ENDIF
    !-----
    IF (j .EQ. k_organelles_y(r,1)) THEN
      IF (i .EQ. k_organelles_x(r,1) .OR. i .EQ. k_organelles_x(r,2)) THEN
        C_ER_j_minus_1 = C_ER(r,i,j,1)
      ELSE
        CALL ER_membrane_calcium_flux(2,r,i,j,C_ER(r,i,j,1),C(r,i,j,1), &
          delta_y(r), Diffusion(1), delta_x(r), C_ER_j_minus_1)
      ENDIF
    ENDIF
    !-----
    IF (j .EQ. k_organelles_y(r,2)) THEN
      IF (i .EQ. k_organelles_x(r,1) .OR. i .EQ. k_organelles_x(r,2)) THEN
        C_ER_j_plus_1 = C_ER(r,i,j,1)
      ELSE
        CALL ER_membrane_calcium_flux(2,r,i,j,C_ER(r,i,j,1),C(r,i,j,1), &
          delta_y(r), Diffusion(1), delta_x(r), C_ER_j_plus_1)
      ENDIF
    ENDIF
    !-----
    ! UPDATES LAMBDA TO CRITICAL POINTS
    !-----
    IF (i .EQ. k_organelles_x(r,1) .OR. i .EQ. k_organelles_x(r,2)) THEN
      IF (j .EQ. k_organelles_y(r,1) .OR. j .EQ. k_organelles_y(r,2)) THEN
        l_x_aux = 2.0d00 * lambda_x(r,1) ; l_y_aux = 2.0d00 * lambda_y(r,1)
      ELSE
        l_x_aux = 2.0d00 * lambda_x(r,1)
      ENDIF
    ENDIF
    IF (j .EQ. k_organelles_y(r,1) .OR. j .EQ. k_organelles_y(r,2)) THEN
      IF (i .EQ. k_organelles_x(r,1) .OR. i .EQ. k_organelles_x(r,2)) THEN
        l_x_aux = 2.0d00 * lambda_x(r,1) ; l_y_aux = 2.0d00 * lambda_y(r,1)
      ENDIF
    ENDIF
  END DO
END DO

```

```

        ELSE
          l_y_aux = 2.0d00 * lambda_y(r,1)
        ENDIF
      ENDIF
! -----
! CONSERVATION EQUATION
! -----
      C_ER(r,i,j,2) = C_ER(r,i,j,1) + l_x_aux*(C_ER_i_plus_1 - 2.D00*C_ER(r,i,j,1) &
        + C_ER_i_minus_1) + l_y_aux*(C_ER_j_plus_1 &
        - 2.D00*C_ER(r,i,j,1) + C_ER_j_minus_1)
! -----
    ENDDO
  ENDDO
! -----
END SUBROUTINE ER_balance

```

```

!*****
SUBROUTINE cytosol_boundary_conditions_ER_faces(r, i, j)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: i, j, r
REAL*8 :: C_i_plus_1, C_i_minus_1, C_j_plus_1, C_j_minus_1, IP3_i_plus_1, &
          IP3_i_minus_1, IP3_j_plus_1, IP3_j_minus_1
COMMON/coefficients/ C_i_plus_1, C_i_minus_1, C_j_plus_1, C_j_minus_1, IP3_i_plus_1, &
                    IP3_i_minus_1, IP3_j_plus_1, IP3_j_minus_1
! -----
! Endoplasmic reticulum membrane boundary conditions
! -----
IF (i .EQ. k_organelles_x(r,1) .AND. j .GT. k_organelles_y(r,1) .AND. &
    j .LT. k_organelles_y(r,2)) THEN
    CALL ER_membrane_calcium_flux(1,r,i,j,C(r,i,j,1), C_ER(r,i,j,1), delta_x(r), &
                                  Diffusion(1), delta_y(r), C_i_plus_1 )
ENDIF

IF (i .EQ. k_organelles_x(r,2) .AND. j .GT. k_organelles_y(r,1) .AND. &
    j .LT. k_organelles_y(r,2)) THEN
    CALL ER_membrane_calcium_flux(1,r,i,j,C(r,i,j,1),C_ER(r,i,j,1), delta_x(r), &
                                  Diffusion(1), delta_y(r), C_i_minus_1)
ENDIF

IF (j .EQ. k_organelles_y(r,1) .AND. i .GT. k_organelles_x(r,1) .AND. &
    i .LT. k_organelles_x(r,2)) THEN
    CALL ER_membrane_calcium_flux(1,r,i,j,C(r,i,j,1),C_ER(r,i,j,1), delta_y(r), &
                                  Diffusion(1), delta_x(r), C_j_plus_1)
ENDIF

IF (j .EQ. k_organelles_y(r,2) .AND. i .GT. k_organelles_x(r,1) .AND. &
    i .LT. k_organelles_x(r,2)) THEN
    CALL ER_membrane_calcium_flux(1,r,i,j,C(r,i,j,1),C_ER(r,i,j,1), delta_y(r), &
                                  Diffusion(1), delta_x(r), C_j_minus_1)
ENDIF
! -----
END SUBROUTINE cytosol_boundary_conditions_ER_faces
!*****

```

```

*****
SUBROUTINE ER_membrane_calcium_flux(k, r, i, j, conc_1, conc_2, delta, &
    diffusion_coefficient, area, imaginary_point_concentration)
USE Global_Variables ; IMPLICIT NONE
REAL*8 :: leakage_flux, pump_flux, ionotropic_flux, pump_concentration, &
    conc_1, conc_2, pump_conc, delta, diffusion_coefficient, area, ran, C_IP3, ni, na, &
    imaginary_point_concentration, probability
INTEGER :: r, i, j, k, k1
-----
! CALCULATE FLOWS IN OPEN CHANNELS AND PUMP
-----
CALL leak_iono_channel(area, leakage_area_fraction_ER, leakage_coefficient_ER, &
    conc_1, conc_2, leakage_flux) ! LEAKAGE FLUX
IF (k.EQ.1) THEN ; pump_conc = conc_1 ; ELSE ; pump_conc = conc_2
ENDIF
CALL pump_routine(area, pump_area_fraction_ER, pump_coefficient_ER, &
    pump_conc, pump_hill, pump_saturation_coefficient, pump_flux) ! PUMP FLUX
-----
! VERIFIES POSSIBILITY OF OPENING CLOSED IONOTROPIC CHANNELS OUTSIDE REFRACTORY PERIOD
-----
IF (k.EQ.1 .AND. opened_closed_channel(r, i, j).EQ.0) THEN ! IS THE CHANNEL CLOSED?
    IF (time_n .GT. ER_channels_time(r,i,j,2)) THEN
        ! HAVE IT REACHED THE END OF REFRACTORY PERIOD?
        C_IP3 = IP3(r,i,j,1) - Ip3_initial ; ni = n_prob_IP3 ; na = n_prob_Ca
        probability = 4 * C_IP3**ni / ( C_IP3**ni + Ip3_sat**ni ) * &
            (C(r,i,j,1)*Ca_sat_1)**na / ((C(r,i,j,1)**na + Ca_sat_1**na) &
            * (C(r,i,j,1)**na + Ca_sat_2**na) ) ! CALCULATES THE PROBABILITY OF OPENING
        CALL RANDOM_NUMBER(ran)
        IF (ran .LT. probability) THEN ! THE CHANNEL WILL OPEN
            opened_closed_channel(r, i, j) = 1 ! REGISTER OPENED CHANNEL
            ER_channels_time(r,i,j,1) = time_n + opening_time
            ! REGISTER THE TIME FOR THE CHANNEL TO CLOSE
            ER_channels_time(r,i,j,2) = ER_channels_time(r,i,j,1) + refractory_period
            ! REGISTER TIME FOR END OF REFRACTORY PERIOD
        ENDIF
    ENDIF
ENDIF
-----
! CALCULATES THE FLOW THROUGH OPEN IONOTROPIC CHANNELS
-----
IF (opened_closed_channel(r, i, j).EQ.1) THEN ! IS THE CHANNEL OPENED?
    CALL leak_iono_channel(area, Ca_channels_IP3_area_fraction, &
        Ca_channels_IP3_coefficient, conc_1, conc_2, ionotropic_flux)
ELSE
    ionotropic_flux = 0.0D00
ENDIF
-----
! CALCULATES THE TOTAL FLOW BY ADDING THE CONTRIBUTIONS OF THE THREE TYPES OF CHANNELS
-----
k1 = 1 ; IF (k.EQ.2) k1 = -1 ! DEFINES THE SIGN OF PUMP TERM
calcium_flux_ER_membrane = ionotropic_flux + leakage_flux + k1 * pump_flux
-----
! CLOSES THE IONOTROPIC CHANNEL THAT HAS ALREADY COMPLETED THE OPENING TIME
-----
IF (k.EQ.2 .AND. opened_closed_channel(r, i, j).EQ.1 .AND. time_n .GT. &
    ER_channels_time(r, i, j, 1)) THEN ; opened_closed_channel(r, i, j) = 0
ENDIF
-----
imaginary_point_concentration = conc_1 - calcium_flux_ER_membrane * delta &
    / (diffusion_coefficient * area)
-----
IF (k.EQ.1) THEN : Ca_ER_membrane_flux_cytosol(r) = &
    Ca_ER_membrane_flux_cytosol(r) + calcium_flux_ER_membrane * delta_t
ELSE
    Ca_ER_membrane_flux_ER(r) = Ca_ER_membrane_flux_ER(r) + &
    calcium_flux_ER_membrane * delta_t ; ENDIF
-----
ENDSUBROUTINE ER_membrane_calcium_flux
*****

```

```

*****
SUBROUTINE continuity_boundary_condition (component, r, point_concentration, delta, &
diffusion_coefficient, area, imaginary_point_concentration)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
REAL*8 :: out_flux, point_concentration, initial_concentration, delta, &
diffusion_coefficient, area, imaginary_point_concentration
INTEGER:: component, r
!-----
IF (component .EQ. 1) initial_concentration = Ca_initial
IF (component .EQ. 2) initial_concentration = IP3_initial
!-----
imaginary_point_concentration = initial_concentration
!-----
out_flux = - area * diffusion_coefficient *(imaginary_point_concentration &
- point_concentration) / delta
!-----
IF (component .EQ. 1) THEN
Ca_out_flux(r) = Ca_out_flux(r) + out_flux * delta_t
Ca_out_flux_inst(r) = Ca_out_flux_inst(r) + out_flux * delta_t
ENDIF
IF (component .EQ. 2) THEN
IP3_out_flux(r) = IP3_out_flux(r) + out_flux * delta_t
IP3_out_flux_inst(r) = IP3_out_flux_inst(r) + out_flux * delta_t
ENDIF
!-----
ENDSUBROUTINE continuity_boundary_condition
*****

```

```

!*****
SUBROUTINE IP3_production_boundary(r, point_concentration, Ca_point_concentration, &
                                delta, diffusion_coefficient, area, imaginary_point_concentration)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: r
REAL*8 :: point_concentration, Ca_point_concentration, delta, area, &
          diffusion_coefficient, imaginary_point_concentration, production_flux
!-----
CALL glutamatergic_IP3_production_routine(area, IP3_production_area_fraction, &
     IP3_production_coefficient, Glu, Ca_point_concentration, Glu_initial, Glu_Hill,&
     Ca_Hill, sat_IP3_production_Glu, sat_IP3_production_Ca, production_flux)
!-----
imaginary_point_concentration = point_concentration + production_flux * delta &
                               / (diffusion_coefficient * area)
!-----
IP3_production_flux(r) = IP3_production_flux(r) + production_flux * delta_t
IP3_production_flux_inst(r) = IP3_production_flux_inst(r) + production_flux &
                              * delta_t
!-----
ENDSUBROUTINE IP3_production_boundary
!*****

```

```

!*****
SUBROUTINE IP3_degradation_boundary(r, point_concentration, delta, &
    diffusion_coefficient, area, imaginary_point_concentration)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: r
REAL*8 :: point_concentration, delta, diffusion_coefficient, area, &
    imaginary_point_concentration, degradation_flux
! -----
CALL IP3_degradation_routine(area, IP3_degradation_area_fraction, &
    IP3_degradation_coefficient, point_concentration, Ip3_initial, degradation_flux)
! -----
imaginary_point_concentration = point_concentration - degradation_flux * delta &
    / (diffusion_coefficient * area)
! -----
IP3_degradation_flux(r) = IP3_degradation_flux(r) + degradation_flux * delta_t
IP3_degradation_flux_inst(r) = IP3_degradation_flux_inst(r) + degradation_flux &
    * delta_t
! -----
ENDSUBROUTINE IP3_degradation_boundary
!*****

```

```

!*****
SUBROUTINE connection_boundary_condition (component, r, i, j, point_concentration, &
delta, diffusion_coefficient, areal, imaginary_point_concentration)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: i, j, k, r, r1, component, nd1, nd2, naux, k_body_coordinate, &
k_body_aux, k_body, kbc, kba, final_count
REAL*8 :: length_cell_body, body_delta, branch_coordinate, body_coordinate, &
point_concentration, initial_concentration, delta, diffusion_coefficient, &
area, areal, imaginary_point_concentration, distance(2), c_up, c_down, &
C1, C2, C_i_plus_1, C_i_minus_1, C_j_plus_1, C_j_minus_1, IP3_i_plus_1, &
IP3_i_minus_1, IP3_j_plus_1, IP3_j_minus_1
COMMON/coefficients/ C_i_plus_1, C_i_minus_1, C_j_plus_1, C_j_minus_1
COMMON/coefficients_IP3/ IP3_i_plus_1, IP3_i_minus_1, IP3_j_plus_1, IP3_j_minus_1
!
! Definition of the element connected with this element
!-----
area = areal
IF (i .EQ. Nx(r)+2) THEN
r1 = Connection(r,1,2) /100 ; naux = Connection(r,1,2) / 10
nd1 = Connection(r,1,2) - naux*10 ; nd2 = (Connection(r,1,2) - r1*100 - nd1)/10
ENDIF
IF (i .EQ. 2) THEN
r1 = Connection(r,1,1) /100 ; naux = Connection(r,1,1) / 10
nd1 = Connection(r,1,1) - naux*10 ; nd2 = (Connection(r,1,1) - r1*100 - nd1)/10
ENDIF
!
! Necessary information
!-----
IF (nd2 == 1) THEN
length_cell_body = length_y(r1) ; final_count = Ny(r1) ; body_delta = delta_y(r1)
ENDIF
IF (nd2 == 2) THEN
length_cell_body = length_x(r1) ; final_count = Nx(r1) ; body_delta = delta_x(r1)
ENDIF
IF (i .EQ. 2) k_body = Nx(r1) + 1 ; IF (i .EQ. Nx(r)+2 ) k_body = 3
IF (i .EQ. 2) k_body_aux = Nx(r1) + 2 ; IF (i .EQ. Nx(r)+2 ) k_body_aux = 2
!
! Definition of the element connected with this element
!-----
branch_coordinate = (j-2)*delta_y(r) + (length_cell_body - length_y(r)) /2
DO k = 2, final_count+2
body_coordinate = (k-2)*body_delta ;
IF (body_coordinate .GE. branch_coordinate) THEN
k_body_coordinate = k ; GO TO 1
ENDIF
ENDDO
1 CONTINUE
IF (j .EQ. 2) points_where_is_the_branch(1) = k
IF (j .EQ. Ny(r)+2) points_where_is_the_branch(2) = k
distance(1) = abs(body_coordinate - branch_coordinate)
distance(2) = abs((body_coordinate-body_delta) - branch_coordinate)

IF (nd2 .EQ. 1 .AND. component .EQ. 1) THEN
c_up = C(r1,k_body,k_body_coordinate,1)
c_down = C(r1,k_body,k_body_coordinate -1,1)
ENDIF
IF (nd2 .EQ. 1 .AND. component .EQ. 2) THEN
c_up = IP3(r1,k_body,k_body_coordinate,1)
c_down = IP3(r1,k_body,k_body_coordinate-1,1)
ENDIF
IF (nd2 .EQ. 2 .AND. component .EQ. 1) THEN
c_up = C(r1,k_body_coordinate,k_body,1)
c_down = C(r1,k_body_coordinate-1,k_body,1)
ENDIF
IF (nd2 .EQ. 2 .AND. component .EQ. 2) THEN
c_up = IP3(r1,k_body_coordinate,k_body,1)
c_down = IP3(r1,k_body_coordinate-1,k_body,1)
ENDIF
ENDIF

```

```

imaginary_point_concentration = (c_up*distance(2) + c_down*distance(1)) &
                               / (distance(1) + distance(2))
IF (j==2 .OR. j==Ny(r)+2) THEN
  IF (j == 2) branch_coordinate = (j-2)*delta_y(r) - delta_y(r) &
    + (length_cell_body-length_y(r))/2
  IF (j == Ny(r)+2) branch_coordinate = (j-2)*delta_y(r) + delta_y(r) &
    + (length_cell_body-length_y(r))/2
  DO k = 2, final_count+2
    body_coordinate = (k-2)*body_delta
    IF (body_coordinate .GE. branch_coordinate) THEN
      k_body_coordinate = k ; GO TO 2
    ENDIF
  ENDDO
2 CONTINUE
  distance(1) = abs(body_coordinate - branch_coordinate) ; distance(2) =
abs((body_coordinate-body_delta) - branch_coordinate)
! -----
  kbc = k_body_coordinate + 1 ; kba = k_body_aux

IF (nd2 == 1) THEN
  IF (j == 2) THEN
    IF (component .EQ. 1) C_j_minus_1 = (C(r1,kba,kbc,1)*distance(2) &
      + C(r1,kba,kbc-1,1)*distance(1)) / (distance(1) + distance(2))
    IF (component .EQ. 2) IP3_j_minus_1 = (IP3(r1,kba,kbc,1)*distance(2) &
      + IP3(r1,kba,kbc-1,1)*distance(1)) / (distance(1) + distance(2))
  ENDIF
  IF (j == Ny(r)+2) THEN
    IF (component .EQ. 1) C_j_plus_1 = (C(r1,kba,kbc,1)*distance(2) &
      + C(r1,kba,kbc-1,1)*distance(1)) / (distance(1) + distance(2))
    IF (component .EQ. 2) IP3_j_plus_1 = (IP3(r1,kba,kbc,1)*distance(2) &
      + IP3(r1,kba,kbc-1,1)*distance(1)) / (distance(1) + distance(2))
  ENDIF
ENDIF
! -----
IF (nd2 == 2) THEN
  IF (j == 2) THEN
    IF (component .EQ. 1) C_j_minus_1 = &
      C(r1,k_body_coordinate,k_body_aux,1)*distance(2) &
      + C(r1,k_body_coordinate-1,k_body_aux,1)*distance(1) &
      / (distance(1) + distance(2))
    IF (component .EQ. 2) IP3_j_minus_1 = &
      (IP3(r1,k_body_coordinate,k_body_aux,1)*distance(2) &
      + IP3(r1,k_body_coordinate-1,k_body_aux,1)*distance(1)) &
      / (distance(1) + distance(2))
  ENDIF
  IF (j == Ny(r)+2) THEN
    IF (component .EQ. 1) C_j_plus_1 = &
      (C(r1,k_body_coordinate,k_body_aux,1)*distance(2) &
      + C(r1,k_body_coordinate-1,k_body_aux,1)*distance(1)) / (distance(1) &
      + distance(2))
    IF (component .EQ. 2) IP3_j_plus_1 = &
      (IP3(r1,k_body_coordinate,k_body_aux,1)*distance(2) &
      + IP3(r1,k_body_coordinate-1,k_body_aux,1)*distance(1)) / (distance(1) &
      + distance(2))
  ENDIF
ENDIF
! -----
IF (i.EQ.2) THEN
  C2 = imaginary_point_concentration ; ELSE ; C1 = imaginary_point_concentration
ENDIF
IF (j .EQ. 2 .OR. j .EQ. Ny(r) + 2) area = area/2.0D00

IF (component .EQ. 1) THEN
  IF (i.EQ.2) THEN
    C1 = C(r,2,j,1) ; ELSE ; C2 = C(r, Nx(r)+2,j,1)
  ENDIF
ENDIF

```

```

        connection_flux_Ca(r,r1) = connection_flux_Ca(r,r1)
        - area * diffusion_coefficient / (delta) * (c1 - c2) * delta_t
        connection_flux_Ca_inst(r,r1) = connection_flux_Ca_inst(r,r1) &
        - area * diffusion_coefficient / (delta) * (c1 - c2) * delta_t
ELSE
    IF (i.EQ.2) THEN
        C1 = IP3(r,2,j,1) ; ELSE ; C2 = IP3(r, Nx(r)+2,j,1)
    ENDIF
    connection_flux_IP3(r,r1) = connection_flux_IP3(r,r1) &
    - area * diffusion_coefficient / (delta) * (c1 - c2) * delta_t
    connection_flux_IP3_inst(r,r1) = connection_flux_IP3_inst(r,r1) &
    - area * diffusion_coefficient / (delta) * (c1 - c2) * delta_t
ENDIF

IF (j.EQ.2 .AND. component.EQ.1) THEN
    c1 = C(r,i,j,1) ; c2 = C_j_minus_1
ENDIF
IF (j .EQ. Ny(r)+2 .AND. component.EQ.1) THEN
    c1 = C_j_plus_1 ; c2 = C(r,i,j,1)
ENDIF
IF (j.EQ.2 .AND. component.EQ.2) THEN
    c1 = IP3(r,i,j,1) ; c2 = IP3_j_minus_1
ENDIF
IF (j .EQ. Ny(r)+2 .AND. component.EQ.2) THEN
    c1 = IP3_j_plus_1 ; c2 = IP3(r,i,j,1)
ENDIF
IF (j .EQ. 2 .OR. j .EQ. Ny(r) + 2) THEN
    area = delta/2.0D00
    delta = area*2.0D00
    IF (component .EQ. 1) THEN
        connection_flux_Ca(r,r1) = connection_flux_Ca(r,r1) &
        - area * diffusion_coefficient / (delta) * ( c1 - c2 ) * delta_t/2.0D0
        connection_flux_Ca_inst(r,r1) = connection_flux_Ca_inst(r,r1) &
        - area * diffusion_coefficient / (delta) * ( c1 - c2 ) * delta_t/2.0D0
    ELSE
        connection_flux_IP3(r,r1) = connection_flux_IP3(r,r1) &
        - area * diffusion_coefficient / (delta) * ( c1 - c2 ) * delta_t/2.0D0
        connection_flux_IP3_inst(r,r1) = connection_flux_IP3_inst(r,r1) &
        - area * diffusion_coefficient / (delta) * ( c1 - c2 ) * delta_t/2.0D0
    ENDIF
ENDIF
! -----
! ENDSUBROUTINE connection_boundary_condition
! *****

```

```

*****
SUBROUTINE connection_boundary_condition_body (component, d, r, i, j, &
                                             imaginary_point_concentration, s)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: component, i, j, k, r, r1, d, space_counter, k_branch_coordinate, s
REAL*8 :: length_cell_body, body_delta, branch_coordinate, body_coordinate, &
          aux_branch1, aux_branch2, imaginary_point_concentration, distance(2), aux1, aux2
-----
! Definition of the element connected with this element
-----
IF (i .EQ. 2)          r1 = Connection(r,d,1) /100
IF (i .EQ. Nx(r)+2)  r1 = Connection(r,d,2) /100
-----
! Necessary information
-----
IF (d .EQ. 1) THEN
  space_counter = j ; body_delta = delta_y(r) ; length_cell_body = length_y(r)
ENDIF
IF (d .EQ. 2) THEN
  space_counter = i ; body_delta = delta_x(r) ; length_cell_body = length_x(r)
ENDIF
-----
! Definition of the element connected with this element
-----
body_coordinate = (space_counter-2)*body_delta
aux_branch1 = length_cell_body/2-length_y(r1)/2
aux_branch2 = length_cell_body/2+length_y(r1)/2

IF (body_coordinate .LT. aux_branch1 .OR. body_coordinate .GT. aux_branch2) THEN
  IF (component .EQ. 1) imaginary_point_concentration = C( r, i, j, 1)
  IF (component .EQ. 2) imaginary_point_concentration = IP3( r, i, j, 1)
  s = 1
ELSE
  DO k = 2, Ny(r1) + 2
    branch_coordinate = (k-2)*delta_y(r1) + (length_cell_body-length_y(r1))/2
    IF (branch_coordinate .GE. body_coordinate) THEN
      k_branch_coordinate = k ; GO TO 2
    ENDIF
  ENDDO
  CONTINUE
  distance(1) = abs(body_coordinate-branch_coordinate)
  distance(2) = abs(body_coordinate-(branch_coordinate-delta_y(r1)))
  IF (i .EQ. 2 .OR. j .EQ. 2) THEN
    IF (component .EQ. 1) THEN
      aux1 = C(r1,Nx(r1)+2,k_branch_coordinate,2)
      aux2 = C(r1,Nx(r1)+2,k_branch_coordinate-1,2)
      C(r,i,j,2) = (aux1*distance(2)+aux2*distance(1))/(distance(1)+distance(2))
    ENDIF
    IF (component.EQ.2) IP3(r,i,j,2) = (IP3(r1,Nx(r1)+2,k_branch_coordinate,2) &
      * distance(2) + IP3(r1,Nx(r1)+2,k_branch_coordinate-1,2)*distance(1)) &
      / (distance(1)+distance(2))
  ENDIF
  IF (i .EQ. Nx(r)+2 .OR. j .EQ. Ny(r)+2) THEN
    IF (component.EQ.1) C(r,i,j,2) = (C(r1,2,k_branch_coordinate,2) &
      * distance(2) + C(r1,2,k_branch_coordinate-1,2) *distance(1)) &
      / (distance(1) + distance(2))
    IF (component.EQ.2) IP3(r,i,j,2) = (IP3(r1,2,k_branch_coordinate,2) &
      *distance(2) + IP3(r1,2,k_branch_coordinate-1,2)*distance(1)) &
      / (distance(1) + distance(2))
  ENDIF
  s = 2
ENDIF
-----
IF (component .EQ. 1) connection_flux_Ca(r,r1) = - connection_flux_Ca(r1,r)
IF (component .EQ. 2) connection_flux_IP3(r,r1) = - connection_flux_IP3(r1,r)
-----
ENDSUBROUTINE connection_boundary_condition_body
*****

```

```

!*****
SUBROUTINE glutamatergic_IP3_production_routine (area, IP3_p_fraction, IP3_p_rate, &
      glu_c, ca_c, glu_c_i, glu_Hill_c, ca_Hill_c, k_glu, k_ca, flux)
IMPLICIT NONE
REAL*8 :: area, IP3_p_fraction, IP3_p_rate, glu_c, ca_c, glu_c_i, glu_Hill_c, &
      ca_Hill_c, k_glu, k_ca, flux
REAL*8 :: Glutamate_contribution_term, Ca_contribution_term
REAL*8 :: glu_term, Ca_term
!-----
! area: area of the element perpendicular to the flux
! IP3_p_fraction: fraction of the area element where IP3 production occurs
! IP3_p_rate: IP3 production rate
! glu_c: concentration of glutamate
! ca_c: concentration of calcium
! glu_c_i: initial concentration of glutamate
! glu_Hill_c: Hill coefficient of the term that takes into account the contribution &
! of glutamate to the IP3 production
! Ca_Hill_c: Hill coefficient of the term that takes into account the contribution &
! of calcium to the IP3 production
! k_glu: saturation coefficient of the term that takes into account the contribution &
! of glutamate to the IP3 production
! k_ca: saturation coefficient of the term that takes into account the contribution &
! of calcium to the IP3 production
! flux: mass flux of IP3 degradation
!-----
      Glutamate_contribution_term = (glu_c - glu_c_i)**glu_Hill_c &
            / ((glu_c - glu_c_i)**glu_Hill_c + k_glu**glu_Hill_c )

      Ca_contribution_term = ca_c**ca_Hill_c / (ca_c**ca_Hill_c + k_ca**ca_Hill_c )

      flux = area * IP3_p_fraction * IP3_p_rate * Glutamate_contribution_term * &
            Ca_contribution_term
!-----
ENDSUBROUTINE glutamatergic_IP3_production_routine
!*****

```

```
!*****
SUBROUTINE IP3_degradation_routine (area, IP3_degradation_fraction, &
    IP3_degradation_rate, internal_concentration, external_concentration, flux)
IMPLICIT NONE
REAL*8 :: area, IP3_degradation_fraction, IP3_degradation_rate, &
    internal_concentration, external_concentration, flux
! -----
! area: area of the element perpendicular to the the flux
! IP3_degradation_fraction: fraction of the area element where IP3 degradation occurs
! IP3_degradation_rate: IP3 degradation rate
! internal_concentration: concentration at the point where the boundary condition is
! being applied
! external_concentration: external concentration to the point where the boundary
! condition is being applied
! flux: mass flux of IP3 degradation
! -----
    flux = area * IP3_degradation_fraction * IP3_degradation_rate &
        * (internal_concentration - external_concentration)
! -----
ENDSUBROUTINE IP3_degradation_routine
!*****
```

```

*****
SUBROUTINE cell_membrane_calcium_flux (r, i, j, C_in, delta, Diffusion2, area, &
                                     C_i_minus_1)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
REAL*8 :: leakage_flux, pump_flux, ionotropic_flux, C_in, C_i_minus_1, delta, &
          diffusion2, area, calcium_flux_cell_membrane
INTEGER :: r, i, j, opened_closed_channel_Glu
-----
IF (Cell_membrane_Glu_open_channel.EQ.1) &
  CALL channel_open_probability_cell_membrane (r, i, j, opened_closed_channel_Glu)
CALL leak_iono_channel (area, Ca_channels_Glu_area_fraction, &
  Ca_channels_Glu_coefficient, C_in, Ca_cleft, ionotropic_flux)
CALL leak_iono_channel (area, leakage_area_fraction, leakage_coefficient, &
  C_in, Ca_cleft, leakage_flux)
CALL pump_routine (area, pump_area_fraction, pump_coefficient, C_in, pump_Hill, &
  pump_saturation_coefficient, pump_flux)
-----
calcium_flux_cell_membrane = - (opened_closed_channel_Glu * ionotropic_flux + &
  leakage_flux + pump_flux)
-----
C_i_minus_1 = C_in + calcium_flux_cell_membrane * delta / (diffusion2 * area)
-----
Ca_cell_membrane_flux(r) = Ca_cell_membrane_flux(r) + calcium_flux_cell_membrane * &
  delta_t
Ca_cell_membrane_flux_inst(r) = Ca_cell_membrane_flux_inst(r) + &
  calcium_flux_cell_membrane * delta_t
-----
ENDSUBROUTINE cell_membrane_calcium_flux
*****

```

```

!*****
SUBROUTINE channel_open_probability_cell_membrane(r, i, j, opened_closed_channel_Glu)
USE Global_Variables
IMPLICIT NONE
INTEGER :: r, i, j, opened_closed_channel_Glu
REAL*8   :: ran, Pb, deltaG
!-----
  IF (time_n .GT. refractory_end_time_Glu (r, i, j)) THEN
    deltaG = Glu - Glu_initial
    Pb = deltaG**n_prob_Glu / (deltaG**n_prob_Glu + Glu_sat**n_prob_Glu )
    CALL RANDOM_NUMBER(ran)
    IF (ran.LT.Pb.AND.channel_time_scale_counting.GE.time_scale_to_open_channel_Glu) &
      THEN
        channel_opening_time_Glu(r,i,j) = time_n
        channel_closing_time_Glu(r,i,j) =channel_opening_time_Glu(r,i,j) +opening_time
        refractory_end_time_Glu(r,i,j) = channel_closing_time_Glu(r,i,j) + &
          refractory_period
        opened_closed_channel_Glu = 1
      ENDIF
    ELSE
      IF (time_n .GT. channel_closing_time_Glu(r, i, j)) opened_closed_channel_Glu = 0
    ENDIF
!-----
  ENDSUBROUTINE channel_open_probability_cell_membrane
!*****

```

```
!*****
SUBROUTINE leak_iono_channel (area, channel_fraction, k_transfer, C_in, C_out, flux)
  IMPLICIT NONE
  REAL*8 :: area, channel_fraction, k_transfer, C_in, C_out, flux
!-----
! area:          area of the control volume face perpendicular to the flux
! channel_fraction: fraction of total area occupied by channels
! k_transfer:    channel mass transfer coefficient
! C_in and C_out: internal and external concentration at boundary condition position
! flux:         calcium mass flux produced by this channel
!-----
  flux = area * channel_fraction * k_transfer * (C_in - C_out)
!-----
ENDSUBROUTINE leak_iono_channel
!*****
```

```

*****
SUBROUTINE pump_routine (area, pump_fraction, k_pump, C_in, p_Hill, sat_coefficient, &
                        flux)
IMPLICIT NONE
REAL*8 :: area, pump_fraction, k_pump, C_in, p_Hill, sat_coefficient, flux
! -----
! area:          area of control volume face perpendicular to the flux
! pump_fraction: fraction of total area occupied by pumps
! k_pump:        maximal pumping rate
! C_in:          internal concentration at boundary condition position
! flux:          calcium mass flux produced by the pumps
! -----
      flux = area * pump_fraction * k_pump * C_in**p_Hill &
             / (C_in**p_Hill + sat_coefficient **p_Hill)
! -----
ENDSUBROUTINE pump_routine
*****

```

**File 0.Parameters**

```

1.0D-2          stimulus_time
1.0D03          1.00D-2      Glu_amplitude, oscillation_period
0.1D00          10.30D00    0.16D00  3.00D00  2.00D03  Ca_inicial, Ca_RE_inicial,
IP3_initial, Glu_initial, Ca_cleft
25.0D00         280.00D00   Diffusion(1), Diffusion(2)
1.0D-4          269.00D00   leakage_area_fraction, leakage_coefficient
1.0D-4          1075946.20D00 2.00D00  0.10D00  pump_area_fraction, pump_coefficient,
pump_Hill, pump_saturation_coefficient
6.0D-4          0.30D00     Ca_channels_Glu_area_fraction, Ca_channels_Glu_coefficient
1.00D3          2.20D00     n_prob_Glu, Glu_sat
10.8D-3         7.60D-3     refractory_period, opening_time
0.00D00         time_scale_to_open_channel_Glu
1.0D-4          269.00D00   leakage_area_fraction_ER, leakage_coefficient_ER
1.0D-4          5487.60D00  pump_area_fraction_ER, pump_coefficient_ER
6.0D-4          6.00D06     0.78D00  0.30D00  IP3_production_area_fraction,
IP3_production_coefficient, sat_IP3_production_Glu, Glu_Hill
0.3D00          2.00D00     sat_IP3_production_Ca, Ca_Hill
6.0D-4          600.00D01   IP3_degradation_area_fraction, IP3_degradation_coefficient
6.0D-4          150.00D00   Ca_channels_IP3_area_fraction, Ca_channels_IP3_coefficient
2.2D00          0.10D00     0.16D00  0.15D00  2.05D00  n_prob_IP3, Ip3_sat,
Ca_sat_1, Ca_sat_2, n_prob_Ca
0.01D0         time_scale_to_open_channel_IP3

```