



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Azcapotzalco

Modelado de la participación del Adenosín Trifosfato (ATP)
en la actividad eléctrica de las células alfa (α) del páncreas

Tesis para obtener el grado de
Maestra en Ingeniería de Procesos
que presenta

Ing. Karen Karina Pérez Ramírez

Directoras de Tesis:

Dra. Virginia González Vélez

Departamento Ciencias Básicas, UAM-A

Dra. Geneviève Dupont

Unidad de Cronobiología Teórica, ULB

Azcapotzalco, Octubre 3 2018



Agradecimientos

A mis padres y familia que siempre han estado apoyándome en las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida y por estar cerca de mí en los momentos más difíciles.

A mis compañeros de posgrado que me ayudaron a ser mejor persona, a trabajar en equipo y sobre todo aprender cosas nuevas así como el significado de la amistad.

A la Dra. Virginia por ser un gran ser humano, asesora y profesora, que gracias a ella he logrado concluir este trabajo exitosamente, gracias por su paciencia, dedicación y sobre todo por brindarme su confianza y apoyo.

A la Dra. Geneviève por ser una excelente persona que me brindo su confianza y sobre todo su paciencia para colaborar conmigo, así como su apoyo durante la estancia de movilidad realizada en el posgrado.

A los profesores, que gracias a ellos logré una buena formación académica así como la obtención de nuevos conocimientos que apliqué a lo largo del posgrado.

Gracias a la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Azcapotzalco (UAM-A) por haberme dado la oportunidad de continuar y concluir mis estudios de posgrado así como una enriquecedora formación académica y por brindarme el apoyo para lograr una estancia en el extranjero.

Gracias a la Universidad Libre de Bruselas (ULB) por permitirme realizar una estancia de movilidad.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado el apoyo económico para realizar mis estudios de posgrado así como el apoyo económico que hizo posible mi estancia en el extranjero

Contenido

Agradecimientos.....	3
Lista de tablas	5
Lista de figuras	6
Resumen.....	7
Abstract	8
1 Introducción	9
2 Estado del arte.....	11
3 Marco teórico	13
3.1 Proceso de la actividad eléctrica en la célula pancreática alfa	13
3.2 Canal de K^+ sensible al ATP (K_{ATP}).....	15
3.3 Producción de ATP: procesos metabólicos mitocondriales en la célula alfa	15
3.4 Nucleótidos de adenina y receptores sensibles a la adenosina en células alfa y β	16
4 Justificación.....	18
5 Hipótesis.....	18
6 Objetivos	18
6.1 Objetivo general.....	18
6.2 Objetivos particulares	18
7 Procedimiento.....	19
8 Modelado.....	20
8.1 Modelo de la actividad eléctrica.....	20
8.2 Modelo de metabolismo mitocondrial.....	27
8.3 Modelo eléctrico-metabólico propuesto.....	27
9 Discusión de resultados	36
9.1 Parámetro K_{gly}	37
9.2 Parámetro A_c^{TOT}	39
10 Conclusiones y perspectivas	43
Referencias.....	44
11 Apéndice I: Sistemas rígidos y diagramas de bifurcación.....	47
12 Apéndice II: Modelo del metabolismo mitocondrial	50
13 Apéndice III: Implementación de modelos.....	53
14 Apéndice IV. Regla de Simpson 1/3 [25].....	54

Lista de tablas

Tabla 8.1. Regiones de estabilidad en el diagrama de bifurcación para el potencial de membrana	23
Tabla 8.2. Puntos críticos de bifurcación de Hopf.....	24
Tabla 8.3. Parámetros propuestos para las ecuaciones de Ca^{2+}	25
Tabla 8.4. Regiones de estabilidad en el diagrama de bifurcación para el Ca^{2+} citosólico	26
Tabla 8.5 Puntos críticos de bifurcación de Hopf de Ca^{2+} citosólico	27
Tabla 8.6. Ecuaciones diferenciales del modelo eléctrico-metabólico para la célula alfa.....	31
Tabla 8.7. Definición de flujos [39].....	32
Tabla 8.8. Parámetros usados en el modelo eléctrico metabólico	33
Tabla 8.9. Parámetros de las funciones sigmoide y campana.....	35
Tabla 9.1.Variación del parámetro K_{gly}	38
Tabla 9.2.Variación del parámetro A_c^{TOT}	39

Lista de figuras

Figura 3.1. Secuencia que dispara la actividad eléctrica y exocitosis en la célula alfa propuesta en [31]. Se puede observar que a baja glucosa, esta entra a la célula a través de un transportador, se metaboliza produciendo ATP/ADP y este cociente es el encargado de moderar la actividad del canal K_{ATP} , comenzando así con la actividad eléctrica y finalmente secreción de glucagón.....	14
Figura 8.1. Dinámica del potencial de membrana en 1 s donde se aprecian los potenciales de acción.....	22
Figura 8.2. Dinámica de las corrientes iónicas en 1 s donde se muestra la corriente IK_{ATP}	22
Figura 8.3. Diagrama de bifurcación del V_m vs $g_{K_{ATP}}$ para el modelo eléctrico.....	23
Figura 8.4. Dinámicas de Ca^{2+} citosólico y Ca^{2+} en la sub membrana con $g_{K_{ATP}} = 0.2 nS$	25
Figura 8.5. Diagrama de bifurcación del Ca^{2+} citosólico y Ca^{2+} en la sub membrana.....	26
Figura 8.6. Modelo conceptual propuesto para el vínculo de la actividad eléctrica y el metabolismo mitocondrial por medio de ATP.....	29
Figura 8.7. Relación entre ATP^{4-}/ADP^{3-} , ATP/ADP y la corriente K_{ATP} en registros de la línea celular RINm5F (célula β) reproducidos por [8].....	30
Figura 9.1. Dinámicas del V_m y Ca^{2+} citosólico obtenidas con el modelo eléctrico-metabólico.....	36
Figura 9.2. Plano fase del potencial de membrana y Ca^{2+} citosólico con $g_{K_{ATP}}$ como variable.....	37
Figura 9.3. Diagramas de bifurcación.....	40
Figura 9.4. Comportamiento en contra fase de Ca^{2+} y ATP citosólico a diferentes valores de A_C^{TOT}	41
Figura 9.5. Esquema propuesto del control de glucosa con el parámetro A_C^{TOT} cuando es baja.....	42
Figura 9.6 Esquema propuesto del control de glucosa con el parámetro A_C^{TOT} cuando es alta.....	42
Figura.12.1. Dinámica del intercambio de Ca^{2+} entre el citosol, RE y mitocondria con $IP_3=1 \mu M$ y $0.1 \mu M$	51
Figura.12.2. Región de un pico de Ca^{2+} en los tres compartimentos.....	52
Figura.12.3 .Dinámica del ATP mitocondrial y citosólico frente a un pico de Ca^{2+} citosólico.....	52
Figura 13.1. Diagrama de flujo que muestra la implementación del modelo matemático.....	54

Resumen

Esta tesis tiene como objetivo proponer un modelo computacional que permita entender la participación del adenosín trifosfato (ATP) en la autorregulación de la célula alfa del páncreas, enfocándose tanto en su actividad eléctrica como en su metabolismo mitocondrial. Las herramientas de modelado y simulación de procesos han sido aplicadas para modelar el funcionamiento celular, donde se hace uso de balances de materia, cinética enzimática así como fenómenos de transporte (difusión facilitada). Los sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias obtenidos son resueltos utilizando métodos numéricos tales como Runge-Kutta y analizados numéricamente mediante diagramas de bifurcación.

El modelo computacional propuesto relaciona la actividad eléctrica y el metabolismo mitocondrial por medio de los mensajeros ATP y calcio intracelular (Ca^{2+}). Los resultados mostraron un comportamiento en contra fase de las dinámicas de ATP y Ca^{2+} . Se obtuvieron ráfagas de potenciales de acción, así como oscilaciones de Ca^{2+} que se encuentran dentro de rangos fisiológicos.

Con el fin de simular el estímulo externo que la concentración de glucosa ejerce sobre la célula alfa, se analizaron dos parámetros de bifurcación, uno que representa la ruta glucolítica (k_{gly}), y otro que representa la cantidad total de nucleótidos de adenina en el citosol (A_c^{TOT}). Se observó que el parámetro k_{gly} no reproduce el comportamiento conocido de la célula alfa ante diferentes niveles de glucosa, mientras que el parámetro A_c^{TOT} sí. Más aún, este análisis numérico permite relacionar las variaciones en el nivel de ATP y de la conductancia de los canales de potasio sensibles al ATP ($g_{K_{ATP}}$) con la presencia de ráfagas intermitentes de potenciales de acción a baja glucosa, tal como se ha observado en experimentos realizados sobre células alfa aisladas, además de que sugiere que los nucleótidos de adenosina actúan como moduladores en la autorregulación celular.

Abstract

The objective of the present thesis is to propose a computational model to understand the participation of adenosine triphosphate (ATP) in the self-regulation of the alpha cell of the pancreas, focusing both on its electrical activity and on its mitochondrial metabolism. Modeling and simulation tools have been applied to model the cellular function. In order to propose mathematical models, I used mass balances, enzymatic kinetics and transport phenomena (diffusion). The systems of ordinary differential equations were solved using numerical methods as such as Runge-Kutta and were analyzed numerically using bifurcation diagrams.

The computational model proposed relates electrical activity and mitochondrial metabolism through both messengers ATP and intracellular calcium (Ca^{2+}). The results showed a behavior in opposite phase of ATP and Ca^{2+} dynamics. Bursts of action potentials were obtained, as well as Ca^{2+} oscillations in physiological ranges.

In order to simulate the stimulatory effect of external glucose concentrate in alpha cell, we analyzed two bifurcation parameters, one representing the glycolytic pathway (k_{gly}), and other, representing the total adenine nucleotides in the cytosol (A_c^{TOT}). We obtained that the k_{gly} parameter cannot reproduce the known behavior of alpha cell at different glucose levels, whereas the A_c^{TOT} parameter does. Moreover this analysis allowed us to relate variations on ATP level and conductance of ATP-dependent K^+ channels ($g_{K_{ATP}}$) with intermittent burst of action potentials at low glucose as it has been reported by experiments done about isolated alpha cell. Our results also point out the role of adenosine nucleotides as modulator of alpha cell activity.

1 Introducción

Con el paso de los años la humanidad se ha enfrentado a diferentes enfermedades que han puesto en riesgo la calidad de vida de las personas en todo el mundo, así como la causa de muerte a temprana edad. Una de estas enfermedades es la diabetes, en la cual el páncreas deja de producir insulina o deja de utilizarla adecuadamente llevando al organismo a estados hiperglucémicos (alta concentración de glucosa en sangre), originando problemas graves como enfermedades renales, vasculares y oculares [23, 30]. Según datos de la Organización Mundial de la Salud la diabetes ha ido en aumento afectando en el 2014 a 422 millones de personas, por lo que esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial [30]. Sin embargo

En el páncreas hay diferentes células endócrinas encargadas de regular la glucosa en sangre, tales como células alfa, β , δ y polipéptidas. Estas células se encuentran agrupadas por islotes conocidos como islotes de Langerhans y secretan hormonas en respuesta al nivel de glucosa en sangre, cuando los niveles son elevados, las células β secretan insulina para activar mecanismos celulares que permitan bajar el nivel hasta la concentración normal de glucosa, mientras que las células alfa secretan glucagón cuando se tienen bajos niveles de glucosa hasta alcanzar una concentración normal, las células δ secretan somatostatina, la cual inhibe la secreción hormonal de las células alfa y β [38]. Si estas células no funcionan adecuadamente se puede desarrollar la enfermedad de la diabetes [31].

Proponer modelos del proceso de autorregulación de las células alfa es un tema innovador y de gran importancia, ya que se ha prestado mucha atención a células β y muy poca a las células alfa dado que las células β se encuentran en mayor proporción en los islotes de Langerhans, lo cual facilita su estudio. La proporción de células pancreáticas es diferente tanto en ratón o rata como en humano. En islotes de ratón o rata se tiene una proporción de 65 a 80 % de células β , del 15 al 20% de células alfa, ~10% de células δ y < 1% de células polipéptidas, mientras que, en islotes de Langerhans en humano se tiene una proporción de 48 a 59% de células β , de 33 a 46% de células alfa y de 8 a 12% de células δ [38].

Para poder entender el funcionamiento a detalle de un proceso tan complejo como lo es la regulación celular, se ha propuesto usar herramientas de modelado y simulación de procesos ya que pueden ser aplicadas tanto a procesos químicos como bioquímicos [41]. Los modelos matemáticos ayudan a identificar los mecanismos involucrados en cada etapa y da la oportunidad de explicar, optimizar y simular el proceso específico, así como obtener nueva información que pueda tener relevancia en el caso de estudio.

En las células alfa se llevan a cabo diferentes procesos que pueden ser modelados tales como la actividad eléctrica y el metabolismo mitocondrial. Estas células son eléctricamente excitables ya que al ser estimuladas por la ausencia o baja concentración de glucosa generan cambios bruscos en el potencial de membrana (gradiente eléctrico) en forma de espiga, los cuales son conocidos como potenciales de acción [34, 38]. Para validar los modelos matemáticos se hace uso de técnicas experimentales. En el caso de una célula excitable la técnica "Patch-clamp" permite obtener información valiosa para modelos a nivel celular y sub celular. Esta técnica electrofisiológica consiste en la estimulación eléctrica de una célula excitable para cambiar su potencial de membrana [10]. Algunos de los iones más importantes en la regulación celular son calcio (Ca^{2+}), sodio (Na^+) y potasio (K^+) y pueden transportarse al interior o exterior de la célula a través de canales iónicos, transportadores, bombas e intercambiadores.

2 Estado del arte

Actualmente se acepta que la mala regulación de la secreción de glucagón está relacionada con el desarrollo de la diabetes; sin embargo, se siguen debatiendo los mecanismos que se llevan a cabo en la regulación celular. Estos mecanismos pueden ser tanto intrínsecos o autocrinos (inherentes a la célula alfa) como extrínsecos o paracrinos (dentro o fuera del islote pancreático). La insulina, el ácido γ -aminobutírico (GABA) y el Zinc (Zn^{2+}) liberados por la célula β así como la somatostatina liberada por la célula δ son ejemplos de factores paracrinos que inhiben la secreción de glucagón en islotes de ratón y humano [3, 22].

De entre los mecanismos intrínsecos destaca la glucosa como estímulo controlador de la secreción de glucagón en base a la función de los canales iónicos, ya que se asocia la baja glucosa con un nivel moderado de actividad del canal de K^+ sensible al ATP (K_{ATP}), el cual es suficiente para abrir canales de Ca^{2+} tipo T, ocasionando un cambio en el potencial de membrana (despolarización) que activa los canales de Na^+ y Ca^{2+} tipo N y L para culminar con la generación de potenciales de acción y oscilaciones de Ca^{2+} que sirven como señal principal para disparar la secreción de glucagón en células alfa de humano y de ratón en islotes intactos [31]. Sin embargo, una de las cuestiones sin resolver para células alfa es cómo responde de manera contraria a las células β si ambas tienen el mismo tipo de canales K_{ATP} , y más aún, si la conductividad de estos canales a baja y alta glucosa en células alfa no presenta grandes diferencias, como ocurre en células β [36]. Por esta razón, tanto el ATP como el Ca^{2+} han sido objetos de estudio en células alfa para tratar de entender la autorregulación a través de, al menos, estos dos mensajeros [19, 43]. Algunos estudios experimentales realizados en islotes de ratón respaldan la hipótesis de que la inhibición de la secreción de glucagón está regulada por el mecanismo intrínseco durante la hipoglicemia (estado de baja glucosa en sangre), mientras que los factores paracrinos se vuelven importantes cuando la concentración de glucosa se eleva y llega a los umbrales de estimulación de la célula β y δ [18]. Por otro lado, se ha reportado que el cociente ATP/ADP en células alfa expuestas a baja glucosa es similar al de células β expuestas a niveles de alta glucosa, por lo que el metabolismo de las células alfa está optimizado para funcionar con muy poca glucosa extracelular [6, 17]. Se ha observado en células alfa y β de rata que la velocidad de oxidación de la glucosa a 1 mM es mayor en células β que en células alfa (4.5 veces) y los niveles de ATP corresponden a una concentración de ~ 2.2 veces mayor en célula alfa (6.5 mM) que en células β (3 mM) [6].

Uno de los primeros modelos matemáticos basados sobre datos experimentales obtenidos en islote de ratón fue el propuesto por Diderichsen & Göpel [7] en el cual se modela la actividad eléctrica en una célula alfa y se muestra el papel que juega la conductividad de los canales de K^+ sensibles al ATP. Otros modelos

matemáticos han tratado de investigar cómo es que la glucosa puede regular la secreción de glucagón al incorporar los efectos de la conductancia del canal sensible al ATP ($g_{K_{ATP}}$) y la conductancia del canal de Ca^{2+} regulados por depósitos conocidos como SOC (g_{SOC}), también se han propuesto modelos de la parte metabólica, actividad eléctrica, Ca^{2+} y secreción relativa de glucagón [9, 40]. Otros trabajos han propuesto modelos matemáticos que toman en cuenta tanto factores paracrinos, como la somatostatina liberada por la célula δ , así como mecanismos intrínsecos, señalando que ambos factores pueden operar en paralelo para regular la secreción de glucagón [3, 27]. Es importante resaltar que ninguno de estos modelos ha podido explicar la presencia de ráfagas intermitentes de potenciales de acción, la relación entre el ATP y el Ca^{2+} , ni la presencia de oscilaciones en contra fase de estos mensajeros.

Nuestro grupo ha analizado, por medio de modelos en cascada, el proceso de exocitosis de glucagón a bajas concentraciones de glucosa (0.5 y 1 mM) basándose en datos experimentales de series temporales de Ca^{2+} en islotes de ratón. Postulando que, es necesaria la unión de tres iones de Ca^{2+} para que los gránulos se fusionen, que la glucosa modula la velocidad de recuperación de gránulos y que la insulina ejerce un efecto inhibitorio de la secreción de glucagón [14]. Hasta este punto se han propuesto modelos compartamentales de la dinámica de Ca^{2+} en célula alfa que señalan que los canales de Ca^{2+} son un factor clave en la regulación de la exocitosis. Para todos estos modelos se han usados métodos determinísticos que implican la solución de ecuaciones diferenciales ordinarias partiendo de un análisis de forma compartamental, balances de materia, cinética enzimática así como fenómenos del transporte (difusión).

3 Marco teórico

La membrana plasmática se caracteriza por tener una permeabilidad selectiva, así como proteínas que facilitan la entrada o salida de iones y moléculas según los requerimientos de la célula; algunas de estas proteínas actúan como transportadores, canales iónicos y bombas. Existen tres clases de transportadores: los únicos (en inglés *uniport*, transporte de un soluto en una dirección), los paralelos (en inglés *simport* transporte de dos solutos en la misma dirección) y antiparalelos (en inglés *antiport*, transporte de dos soluto en direcciones opuestas) [20].

El transporte de iones se debe a las diferencias de concentraciones (gradiente de concentración) entre el exterior y el interior de la célula separados por la membrana permeable, por lo tanto se tendrá una difusión simple cuando el soluto de una región con mayor concentración pase a una región con menor concentración hasta que ambos compartimentos tengan concentraciones iguales de soluto. Cuando se tienen iones de cargas opuestas, se crea un gradiente eléctrico conocido como potencial de membrana (V_m); éste produce una fuerza opuesta al movimiento de los iones que lo aumentan e impulsa el movimiento de los iones que lo reducen. Si el transporte es a favor del gradiente de concentración, el soluto puede continuar su camino por difusión facilitada (transporte pasivo), pero en ocasiones el transporte se lleva a cabo contra su gradiente de concentración, carga eléctrica o ambos (transporte activo), entonces se necesita energía obtenida de la hidrólisis del ATP [20, 28].

3.1 Proceso de la actividad eléctrica en la célula pancreática alfa

Para que en las células alfa se lleve a cabo la actividad eléctrica y por lo tanto la secreción de glucagón es necesario tener baja concentración de glucosa ya que este es el estímulo principal para que la célula realice su función. La glucosa al ingresar a la célula se metaboliza obteniendo ATP y ADP, el cociente ATP/ADP baja la actividad del canal de K^+ sensible al ATP (K_{ATP}), llevando a la célula a una despolarización, es decir, a un cambio en su potencial de membrana donde es activado el canal de Ca^{2+} tipo T (-60 mV). Al ingresar Ca^{2+} , este despolariza aún más la célula activando el canal de Na^+ (-30 mV) y comienza el potencial de acción, cuando se tiene un potencial de membrana alrededor de -20 mV son activados los canales de Ca^{2+} tipo L y N, donde el canal de Ca^{2+} tipo N es el responsable de la exocitosis, es decir, secreción de glucagón [31, 38]. El canal de Ca^{2+} tipo N está relacionado con la secreción de glucagón ya que en estudios de mediciones de glucagón realizados en islotes de ratón han mostrado que la escases de canales de Ca^{2+} tipo N reducen los niveles de glucagón, en cambio la escases de canales de Ca^{2+} tipo L no reducen los niveles de glucagón considerablemente [22]. La célula necesita autorregularse una vez que se ha llevado a cabo la exocitosis,

para ello, cuenta con el canal de K^+ tipo A, el cual se encarga de repolarizar la célula, es decir, lleva a la célula a potenciales de membrana cerca del umbral de inicio del potencial de acción [31, 38]. La figura 3.1 muestra el esquema propuesto por Quesada I., et al [31], en el cual se puede observar la secuencia que da origen a la actividad eléctrica y exocitosis en la célula pancreática alfa.

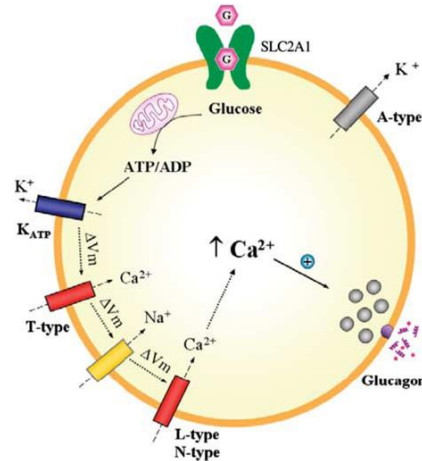


Figura 3.1. Secuencia que dispara la actividad eléctrica y exocitosis en la célula alfa propuesta en [31]. Se puede observar que a baja glucosa, esta entra a la célula a través de un transportador, se metaboliza produciendo ATP/ADP y este cociente es el encargado de moderar la actividad del canal K_{ATP} , comenzando así con la actividad eléctrica y finalmente secreción de glucagón.

Experimentalmente ha sido demostrada la relación que tiene el Ca^{2+} con el potencial de membrana a baja concentración de glucosa usando técnicas de fluorescencia en células alfa aisladas. En los registros experimentales simultáneos del potencial de membrana y la concentración de Ca^{2+} citosólico en la célula alfa en presencia de 0.5 mM de glucosa se reportó que hay aproximadamente una oscilación de Ca^{2+} por minuto y 4 potenciales de acción por segundo que rebasan los 0 mV del pico de voltaje [ver figura 2B de referencia 32]. Estos valores varían, ya que se ha reportado 21 potenciales de acción por segundo en islotes de ratón [7]. Cabe mencionar que aunque el nivel de glucosa permanece fijo, la actividad eléctrica es intermitente.

La entrada de Ca^{2+} a la célula es favorecida debido a su fuerte gradiente electroquímico ya que hay una gran diferencia de concentración en el medio extracelular (1-2 mM) e intracelular (0.0001-0.0002 mM), permitiendo así que el Ca^{2+} funcione como mensajero celular altamente sensible dando paso a la secreción de glucagón [38]. Para que la célula vuelva a operar y no sea afectada por la alta concentración de Ca^{2+} , en la membrana plasmática se tienen transportadores de cationes impulsados por ATP conocidos como ATPasas tipo P (bombas de Ca^{2+} -ATPasa) e intercambiadores Na^+/Ca^{2+} encargados de extruir Ca^{2+} al medio extracelular. La bomba de Ca^{2+} -ATPasa en la membrana plasmática (PMCA, por sus siglas en inglés: *Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase*) transporta un ion de Ca^{2+} fuera de la célula por una molécula de ATP hidrolizada [3, 5, 20].

3.2 Canal de K^+ sensible al ATP (K_{ATP})

El canal K_{ATP} es muy importante en la célula alfa ya que en trabajos experimentales ha mostrado diversos comportamientos a diferentes estímulos. Se ha observado que la actividad de los canales K_{ATP} es modulada por el ATP en ausencia de glucosa en células alfa, tal como la encontrada en células β expuestas a concentraciones de glucosa que estimulan la secreción de insulina [38].

En células alfa a bajas concentraciones de glucosa (de 0 a 3 mM) los canales K_{ATP} bajan su actividad (comienzan a cerrarse) ocasionando disparos de potencial de acción así como oscilaciones de Ca^{2+} citosólico lo cual lleva a la secreción de glucagón [36]. Sin embargo, cuando se tiene alta concentración de glucosa, los canales K_{ATP} son cerrados completamente y ocasionan una despolarización de la membrana tal que inactivan los canales de Ca^{2+} y Na^+ , ya que no se alcanza un potencial de membrana tal que active estos canales por lo tanto, no se generan potenciales de acción y se inhibe la secreción de glucagón [31, 36]. En las células β bajo condiciones de alta concentración de glucosa, los canales K_{ATP} bajan su actividad y provocan la despolarización de la membrana, la actividad eléctrica y la secreción de insulina [43].

Se ha observado que los canales de K_{ATP} son más sensibles al ATP en células alfa de ratón que en células alfa de rata y se encuentran en menor cantidad en células alfa que en células β , entonces para tener una máxima inhibición en los canales K_{ATP} se requieren menor concentración de ATP comparado con la célula β [26, 31, 38].

3.3 Producción de ATP: procesos metabólicos mitocondriales en la célula alfa

Todos los organismos necesitan energía para vivir. Estos organismos se pueden dividir en dos grupos: los autótrofos, que utilizan dióxido de carbono de la atmósfera como única fuente de carbono y los heterótrofos que obtienen carbono a partir de moléculas orgánicas relativamente complejas tales como la glucosa. Algunos organismos autótrofos obtienen su energía a partir de la luz solar por medio de la fotosíntesis (autotróficos) y algunos organismos heterótrofos obtienen su energía a partir de la degradación de nutrientes orgánicos producidos por los autótrofos (heterotróficos).

La fuente principal de energía utilizable por las células para realizar sus actividades es obtenida por la hidrólisis del ATP (de ahí el nombre de moneda energética). Este nucleótido energético está constituido por una cadena de tres fosfatos, una ribosa (azúcar de cinco carbonos) y una base nitrogenada de adenina. Los enlaces entre los grupos fosfatos se llaman enlaces fosfoanhídros, que al romperse mediante la reacción de hidrólisis ($ATP + H_2O \leftrightarrow ADP + P_i + \text{energía}$) liberan una gran cantidad de energía [21].

El ATP es producido en la célula por diferentes rutas metabólicas tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico) y la fosforilación oxidativa, llevándose a cabo entre el citosol y la mitocondria. La primera ruta metabólica que produce ATP es la glucólisis donde la glucosa comienza a ser metabolizada. Esta ruta está compuesta por dos fases, una fase preparatoria y una fase de beneficios. En la fase preparatoria se invierten dos moléculas de ATP encargadas de elevar el contenido de energía libre de los intermediarios, posteriormente comienza la fase de beneficios donde dos moléculas del metabolito piruvato libera energía. Esta energía es conservada a través de la fosforilación acoplada de dos moléculas de ADP a ATP. Por lo tanto se tiene un rendimiento neto de dos moléculas de ATP por una molécula de glucosa metabolizada dado que se han invertido dos moléculas de ATP en la fase preparatoria. De igual forma se conserva energía mediante la formación de dos moléculas de NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina hidrogenado o reducido) [20].

El piruvato obtenido de la glucólisis es transformado en la mitocondria en acetil coenzima A (Acetil-CoA) iniciando así el ciclo de Krebs, donde se producen los nucleótidos NADH, FADH (dinucleótido de flavina y adenina hidrogenado o reducido) y GTP (guanina trifosfato). Las coenzimas reducidas obtenidas del ciclo de Krebs son el comienzo de la fosforilación oxidativa mitocondrial donde los electrones son transferidos y usados para extruir protones (H^+). Esta fuente electroquímica de energía es manejada por la enzima F_0F_1 -ATPasa (ATP sintasa), esta enzima de tipo F, cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP, un grupo fosfato y la energía suministrada por el flujo de protones [20]. En esta ruta metabólica es donde se produce mayor cantidad de energía en forma de ATP. Cabe señalar que el Ca^{2+} que ingresa a la mitocondria promueve al ciclo de Krebs y favorece a la producción de NADH y producción de ATP por la F_0F_1 -ATPasa [39].

3.4 Nucleótidos de adenina y receptores sensibles a la adenosina en células alfa y β

Los nucleótidos son unidades monómeras de los ácidos nucleicos (DNA y RNA). Cada nucleótido está conformado por una base nitrogenada derivada de la purina (adenina y guanina) o pirimida (citosina, timina y uracilo para RNA), una pentosa tal como la 2-desoxi-D-ribosa para el desoxirribonucleótido o D-ribosa para el ribonucleotido y una molécula de ácido fosfórico. Cuando el grupo fosfato de un nucleótido se separa por hidrólisis, la estructura final recibe el nombre de nucleósido. Se tienen tres nucleósidos 5'-fosforilados para la adenosina los cuales son: 5'-monofosfato de adenosina (AMP), 5'-difosfato de adenosina (ADP), 5'-trifosfato de adenosina también conocido como adenosín trifosfato (ATP) [20].

Los nucleósidos de adenosina son reguladores importantes en las células alfa y β ya que ha sido observado que regulan la función de secreción en ambas células. La adenosina extracelular puede unirse a cuatro diferentes proteínas receptoras de adenosina que se encuentran en la membrana plasmática, ya sea para

estimular o inhibir la actividad de la adenil ciclasa y producir el monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) en la célula lo cual corresponde a una ruta de secreción diferente a la que se está modelado [42].

Experimentalmente en islotes de ratón aislados, ha sido comprobada la existencia de los receptores de adenosina A_1 , A_{2A} y P_2Y_1 en células alfa y ha sido demostrado que la adenosina y el ATP extracelular a una concentración de 1 a 10 μ M disminuyen la frecuencia oscilatoria de Ca^{2+} citosólico a una baja concentración de glucosa [38, 42]. Por lo tanto, la activación de los receptores A_{2A} y P_2Y_1 lleva a la inhibición reversible de las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico [37]. En células β se tienen los receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3 donde el receptor A_1 incrementa la permeabilidad de los iones K^+ llevando a la inhibición de Ca^{2+} y reducción de insulina, el receptor A_{2A} promueve la secreción de insulina, el receptor A_{2B} suprime la liberación de insulina y promueve la proliferación de la célula y el receptor A_3 induce la necrosis, es decir, muerte celular [1, 42]. Por lo tanto, los receptores de adenosina están implicados en la regulación de la secreción de insulina y glucagón.

Con base en lo mencionado anteriormente, un decremento en la glucosa de 3 mM a 0 mM en islotes de ratón aislado causa un incremento en la adenosina extracelular, en cambio, un incremento en la glucosa de 3 mM a 5-25 mM causa un decremento en los niveles de adenosina extracelular por lo tanto la adenosina se correlaciona inversamente con la concentración de glucosa, entonces en condiciones de baja glucosa, los niveles endógenos de adenosina son los suficientemente altos como para inhibir la secreción de insulina y estimular la secreción de glucagón. Por el contrario, en condiciones de glucosa elevada, los niveles de adenosina disminuyen junto con la liberación de glucagón, mientras que aumenta la secreción de insulina [1, 42].

4 Justificación

La diabetes es una enfermedad grave que ha afectado durante años a un enorme número de personas en todo el mundo ocasionando diferentes enfermedades secundarias e incluso la muerte. Esta enfermedad se debe a un desequilibrio en el nivel de glucosa en sangre que ocurre por la mala regulación de la secreción de las hormonas pancreáticas involucradas, principalmente insulina y glucagón.

En las células pancreáticas, la glucosa es transformada en energía en forma de ATP (glucólisis y metabolismo mitocondrial) El cociente ATP/ADP regula la actividad eléctrica y la secreción hormonal. Por muchos años, el estudio experimental y de modelado se limitó a las células β secretoras de insulina quedando un vacío en el estudio de las células alfa secretoras de glucagón.

En esta tesis se propone un modelo matemático eléctrico-metabólico, desde un enfoque compartamental, el cual permite estudiar el vínculo entre el ATP y la actividad eléctrica en las células alfa, con la finalidad de aportar más información a las posibles rutas metabólicas involucradas en el desarrollo de la diabetes tipo 2.

5 Hipótesis

Es posible construir un modelo matemático que describa la actividad eléctrica en células alfa vinculada al metabolismo mitocondrial a través del ATP.

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Proponer un modelo matemático que permita el estudio de la participación del ATP en la regulación de la actividad eléctrica de las células alfa.

6.2 Objetivos particulares

- Definir la relación entre el ATP y los potenciales de acción disparados a baja glucosa en células alfa, tomando como referencia un modelo eléctrico [7] y un modelo metabólico [39].
- Simular la dinámica del ATP y la actividad eléctrica bajo diferentes niveles de estimulación.

7 Procedimiento

Se trabajó en la construcción de un nuevo modelo matemático (eléctrico-metabólico), donde fueron realizadas las actividades que se muestran a continuación:

1. Se analizaron por separado los modelos eléctrico [7] y metabólico [39] para reproducir los resultados publicados y obtener diagramas de bifurcación.
2. Se modificó el modelo eléctrico con una corriente de Ca^{2+} tipo N así como dos ecuaciones de Ca^{2+} .
3. Se propuso un modelo conceptual que muestra los procesos eléctricos y metabólicos que tienen lugar en la célula alfa, así como las consideraciones respecto a los canales iónicos para la formulación del modelo.
4. Se propuso un modelo matemático eléctrico-metabólico que incluyó la participación del ATP en ambos procesos (actividad eléctrica y metabolismo mitocondrial).
5. Se implementó en Matlab el modelo propuesto y se hicieron simulaciones de validación.
6. Se simularon diferentes estímulos que disparan la actividad eléctrica de la célula alfa para entender la participación del ATP y del metabolismo mitocondrial en este proceso.

8 Modelado

En esta sección se muestran los pasos descritos en la sección 7, donde se implementó y se validó el funcionamiento de los modelos matemáticos tomados como referencia, así como algunas modificaciones realizadas a los modelos, la reproducción de algunos resultados relevantes publicados y la propuesta de un modelo matemático-eléctrico junto con simulaciones de validación. Para la implementación se utilizó Matlab con rutinas ode23 dado que los modelos comienzan a presentar rigidez (ver apéndice I y III) y para la obtención de diagramas de bifurcación se utilizó Xppaut ya que facilita la obtención de estos diagramas y da información interesante para un análisis numérico.

8.1 Modelo de la actividad eléctrica

Hodgkin y Huxley publicaron en 1952 un trabajo donde estudiaron experimentalmente la actividad eléctrica en el axón gigante de calamar, propusieron un modelo matemático simple que logró reproducir las corrientes de Na^+ observadas en estas fibras nerviosas, ganando así un premio nobel por su trabajo [16]. Sus modelos desde entonces son considerados básicos en neurofisiología y se les ha utilizado para describir la actividad eléctrica de las células excitables.

El modelo de la actividad eléctrica usado como referencia fue propuesto por Diderichsen y Göpel (2006) con base en datos experimentales obtenidos en un islote de ratón intacto [7]. El trabajo se basó en modelos tipo Hodgkin y Huxley para los diferentes canales iónicos de la célula alfa. Consideraron corrientes activadas por voltaje para canales de Ca^{2+} tipo L y T, una corriente de Na^+ , corrientes de K^+ como rectificador retardado (K_{DR}), tipo A (K_A) y sensible al ATP (K_{ATP}), además de una corriente fuga (*leak*). Cada corriente I_i del ion i es modelada como se muestra en la expresión 8.1.

$$I_i = g_i(V_m - V_i) \text{ donde } g_i = g_i^* m_i^l h_i \quad (8.1)$$

donde la fuerza motriz está dada por la diferencia de potencial ($V_m - V_i$), siendo V_m el potencial de membrana y V_i el potencial de inversión o potencial de Nernst del ion i que transporta la corriente. La conductancia del canal (g_i) está definida por la conductancia máxima (g_i^*), donde m_i , y h_i son la activación y desactivación del canal iónico, l es un parámetro que representa el orden de activación del proceso, está asociado a la morfología del canal iónico y puede tomar valores de 1, 2, 3 y 4, ya que estos valores dieron un mejor ajuste a datos experimentales obtenidos de un islote de ratón. Las ecuaciones que describen la activación e inactivación (apertura o cierre) del canal iónico i están dadas por la ecuación 8.2 y 8.3.

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{m_i^\infty(V_m) - m_i}{\tau_i^m(V_m)} \quad (8.2)$$

$$\frac{dh_i}{dt} = \frac{h_i^\infty(V_m) - h_i}{\tau_i^h(V_m)} \quad (8.3)$$

donde m_i^∞ y h_i^∞ describen los estados estacionarios de activación e inactivación de los canales iónicos, τ_i^m y τ_i^h describen las constantes de tiempo, definiéndolos con una función sigmoide y una función tipo campana, las expresiones 8.4 y 8.5 muestran las expresiones mencionadas anteriormente.

$$sig(V_m, V^*, S^*) = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{-(V_m - V^*)}{S^*}\right)}} \quad (8.4)$$

$$bell(V_m, V^*, S^*, \tau^*, \tau_0) = \frac{\tau^*}{e^{\left(\frac{-(V_m - V^*)}{S^*}\right)} + e^{\left(\frac{(V_m - V^*)}{S^*}\right)}} + \tau_0 \quad (8.5)$$

Ambas funciones dependen de los parámetros V^* y S^* . Donde V^* es el voltaje que define el punto de inflexión de la función sigmoide, así como el voltaje central en la función campana y S^* es el parámetro que define la pendiente expresando lo inclinado en la función sigmoide y campana, τ_0 es el valor asintótico de la función campana a V_m infinito, mientras que el máximo de la campana es $\frac{\tau_0 + \tau^*}{2}$.

En el modelo se aplicó la de Ley de conservación de cargas o Ley de corrientes de Kirchoff (8.6).

$$0 = I_{cap} + I_{ion} = C_m \frac{dV_m}{dt} + \sum_i I_i \quad (8.6)$$

donde I_{cap} es una corriente de capacitancia asociada con el recargamiento de la membrana celular, C_m es la capacitancia de la célula alfa en la membrana celular, $\sum_i I_i$ es la sumatoria de las corrientes de los canales iónicos. Por lo tanto el modelo matemático referido está conformado por siete diferentes corrientes.

$$I_{Ca_T} = g_{Ca_T}^* m_{Ca_T}^3 h_{Ca_T} (V_m - V_{Ca}) \quad (8.7)$$

$$I_{Ca_L} = g_{Ca_L}^* m_{Ca_L}^2 h_{Ca_L} (V_m - V_{Ca}) \quad (8.8)$$

$$I_{Na} = g_{Na}^* m_{Na}^3 h_{Na} (V_m - V_{Na}) \quad (8.9)$$

$$I_{K_A} = g_{K_A}^* m_{K_A}^3 h_{K_A} (V_m - V_K) \quad (8.10)$$

$$I_{K_{DR}} = g_{K_{DR}}^* m_{K_{DR}}^4 h_{K_{DR}} (V_m - V_K) \quad (8.11)$$

$$I_{K_{ATP}} = g_{K_{ATP}}^* (V_m - V_K) \quad (8.12)$$

$$I_{Leak} = g_{Leak}^* (V_m - V_{Leak}) \quad (8.13)$$

De entre estas corrientes destaca la corriente $I_{K_{ATP}}$ (8.12) ya que es quien vincula la actividad eléctrica con el metabolismo mitocondrial. Es por ello que este modelo es tomado como referencia en células pancreáticas alfa para simular el disparo de potenciales de acción en respuesta a un estímulo metabólico.

El modelo descrito anteriormente, fue implementado en Matlab y Xppaut. En Matlab, al ser un modelo determinístico, las ecuaciones diferenciales fueron resueltas con la rutina ode23 requiriendo un tiempo de simulación de 1 s, donde se puede apreciar los disparos de potenciales de acción con una frecuencia de 21 oscilaciones por segundo. La figura 8.1 y 8.2 muestra la dinámica del potencial de membrana con una conductancia $g_{K_{ATP}} = 0.2$ nS así como la dinámica de las corrientes involucradas en el proceso de la actividad eléctrica de la célula alfa respectivamente, donde se ha remarcado la corriente $I_{K_{ATP}}$.

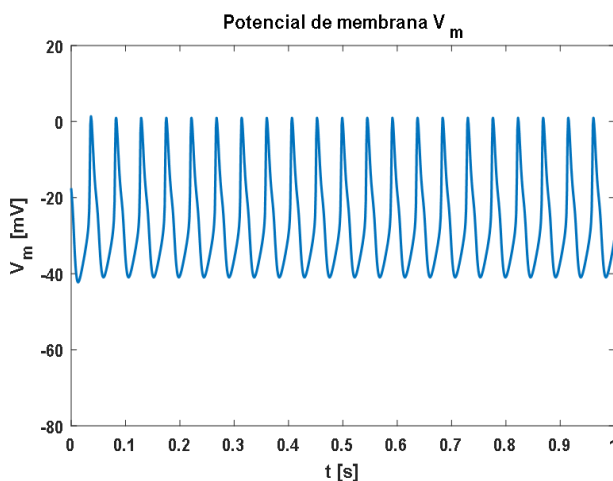


Figura 8.1. Dinámica del potencial de membrana en 1 s donde se aprecian los potenciales de acción

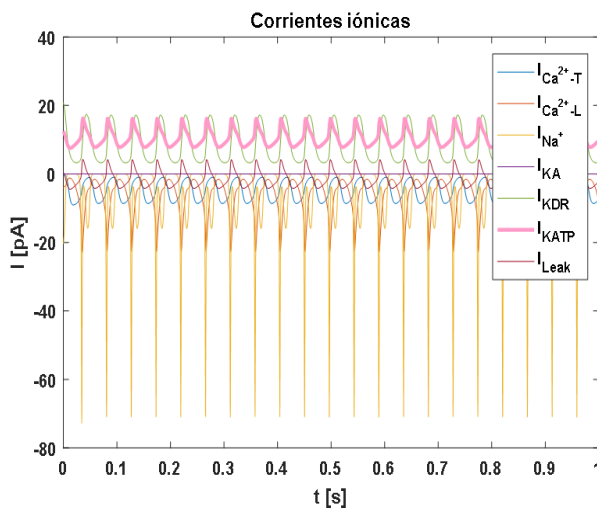


Figura 8.2. Dinámica de las corrientes iónicas en 1 s donde se muestra la corriente $I_{K_{ATP}}$

Como se ha reportado en el modelo eléctrico [7] la estabilidad del sistema cambia con la conductancia del canal de K^+ sensible al ATP ($g_{K_{ATP}}$). Para analizar numéricamente este comportamiento se realizó un diagrama de bifurcación usando Xppaut con la finalidad de definir la región oscilatoria así como la estabilidad del sistema con base en este parámetro. La figura 8.3 muestra el diagrama de bifurcación del potencial de membrana.

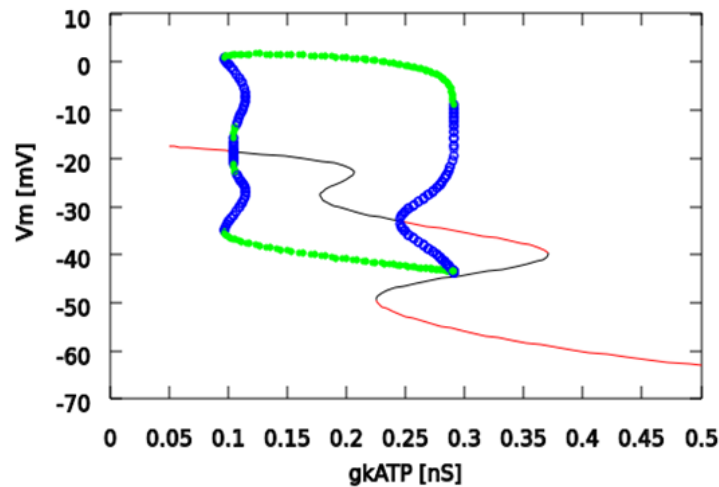


Figura 8.3. Diagrama de bifurcación del V_m vs $g_{K_{ATP}}$ para el modelo eléctrico

En la figura 8.3 se muestran diferentes regiones de estabilidad del sistema. En este diagrama las líneas rojas representan estabilidad, las líneas negras representan inestabilidad, los puntos color verde representan los valores máximos y mínimos de las oscilaciones en el potencial de membrana, los círculos color azul representan soluciones periódicas estables y el área delimitada por los círculos color azul y puntos verdes representan la región oscilatoria. En la tabla 8.1 se muestran los valores que delimitan las regiones en el diagrama de bifurcación, donde HB corresponde a los puntos de bifurcación tipo Hopf (ver apéndice I).

Tabla 8.1. Regiones de estabilidad en el diagrama de bifurcación para el potencial de membrana

	Parámetro de bifurcación $g_{K_{ATP}}$	Variable V_m	Estabilidad del sistema
Región 1	[0.02 - 0.1052)	[-16.99 - -18.57)	Estable
Región 2	[0.1052 - 0.2454)	[-18.57 - -33.09)	Inestable, región oscilatoria HB
Región 3	[0.2454 - 0.3712)	[-33.09 - -39.97)	Estable
Región 4	[0.3712 - 0.2252)	[-39.97 - -49.28)	Inestable
Región 5	[0.2252 - 0.452)	[-49.28 - -60.27)	Estable

A través de la construcción del diagrama de bifurcación, se obtuvieron numéricamente los puntos críticos (estado estacionario) en los cuales la estabilidad del sistema cambia y surgen soluciones periódicas (Bifurcación de Hopf). Estos valores se muestran en la tabla 8.2.

Tabla 8.2. Puntos críticos de bifurcación de Hopf

Región 2 (Región oscilatoria)	Parámetro de bifurcación g_{KATP}	Variable V_m	Estabilidad
Inicio	0.1052	-18.57	Cambia de estable a inestable
Termino	0.2454	-33.09	Cambia de inestable a estable

El modelo eléctrico [7] se modificó añadiendo una corriente de Ca^{2+} tipo N y dos ecuaciones de Ca^{2+} en la sub membrana plasmática y citosol, las cuales representan una forma común de modelar la dinámica de Ca^{2+} cuando se tienen corrientes activadas por voltaje [4,29]. Las ecuaciones diferenciales fueron obtenidas de un análisis de forma compartamental entre la membrana plasmática y el citosol en la célula alfa. Estas modificaciones se proponen porque en trabajos previos se ha postulado a los canales de Ca^{2+} tipo N como los responsables de disparar la exocitosis en células alfa [22, 31], y porque para el presente trabajo era importante modelar la dinámica de Ca^{2+} cuando se tienen corrientes activadas por voltaje [27].

Para plantear el nuevo modelo se utilizó un enfoque de tipo compartamental para el exterior celular, la región sub membranal y el citosol, de forma que se pueda calcular la concentración de Ca^{2+} en cada compartimento en su respectivo tiempo, como se muestra en las ecuaciones 8.15 y 8.16. La corriente I_{Ca_N} se planteó siguiendo el modelo propuesto para la secreción de glucagón en células alfa pancreáticas [14].

$$I_{Ca_N} = g_{Ca_N}^* m_{Ca_N}^2 h_{Ca_N} (V_m - V_{Ca}) \quad (8.14)$$

$$\frac{d[Ca_{me}]}{dt} = fr \left(-\frac{\sum_i I_{Ca_i}}{2F \left(\frac{vol}{20} \right)} \right) + v_{base} - r_m \left(\frac{Ca_{me}^2}{K_M^2 + Ca_{me}^2} \right) - \gamma (Ca_{me} - Ca_c) \quad (8.15)$$

$$\frac{d[Ca_c]}{dt} = \gamma (Ca_{me} - Ca_c) \quad (8.16)$$

Las ecuaciones 8.15 y 8.16 describen el comportamiento del Ca^{2+} en la sub membrana y Ca^{2+} en el citosol, estas ecuaciones han sido propuestas con base en estudios previos acerca de modelado de Ca^{2+} en células β , donde se toman en cuenta diferentes compartimentos tales como la membrana plasmática y el citosol, cada uno de los términos descritos en la ecuaciones representan un mecanismo [4]. El primer término de la ecuación 8.15 se refiere a la actividad eléctrica donde ocurre el transporte de Ca^{2+} extracelular a través de los canales iónicos al interior de la célula, el segundo término se refiere a la concentración basal de Ca^{2+} en el interior celular, el tercer término representa el transporte de Ca^{2+} fuera de la célula y el cuarto término es la parte difusiva homogénea (fenómenos del transporte) entre el compartimento de la sub membrana así

como el citosol dada la gran diferencia en la concentración de Ca^{2+} entre el medio extracelular e intracelular [38]. El parámetro fr es la fracción de Ca^{2+} libre en el citosol, $\sum_i I_{Ca_i}$ es la sumatoria de los tipos de corrientes de Ca^{2+} (T, L y N), F es la constante de Faraday (cantidad de carga que existe en un mol), vol es el volumen celular, v_{base} es la tasa de concentración basal de Ca^{2+} , r_m es la remoción de Ca^{2+} en la sub membrana, K_M es la afinidad por el Ca^{2+} en el proceso enzimático de orden 2, este valor representa el número de sitios de unión al sustrato por molécula de enzima, conocido como numero de Hill. La ecuación 8.16 describe del comportamiento del Ca^{2+} en el citosol donde γ refleja la tasa de difusión de Ca^{2+} de la capa en la cual el Ca^{2+} en la sub membrana es definido y corresponde a un veinteavo del total del volumen celular.

Estas ecuaciones diferenciales fueron agregadas al modelo para poder simular la dinámica de Ca^{2+} en presencia de actividad eléctrica así como la obtención de diagramas de bifurcación. La tabla 8.3 muestra los valores propuestos para los parámetros en las ecuaciones de Ca^{2+} .

Tabla 8.3. Parámetros propuestos para las ecuaciones de Ca^{2+}

Parámetro	Valor
fr	0.1
vol	1.05 pL
F	$0.096487 \frac{C}{\mu mol}$
v_{base}	$40 \frac{\mu M}{s}$
r_m	$362.5 \frac{\mu M}{s}$
K_m	$0.4 \mu M$
γ	$5 s^{-1}$

En la figura 8.4 se muestran las dinámicas del Ca^{2+} citosólico y Ca^{2+} en la sub membrana junto con el modelo eléctrico en un tiempo de simulación de 1 s, en las cuales se puede ver la presencia de oscilaciones de Ca^{2+} .

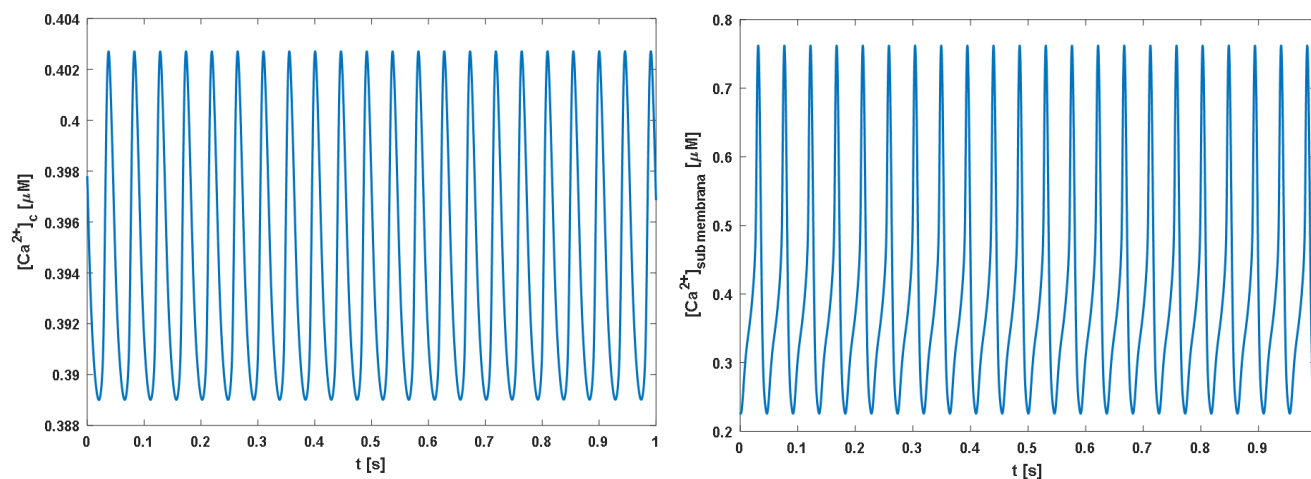


Figura 8.4. Dinámicas de Ca^{2+} citosólico y Ca^{2+} en la sub membrana con $g_{K_{ATP}} = 0.2 nS$

En analogía al potencial de membrana, también se obtuvieron los diagramas de bifurcación para el Ca^{2+} citosólico y Ca^{2+} en la sub membrana en función de $g_{K_{ATP}}$ (figura 8.5).

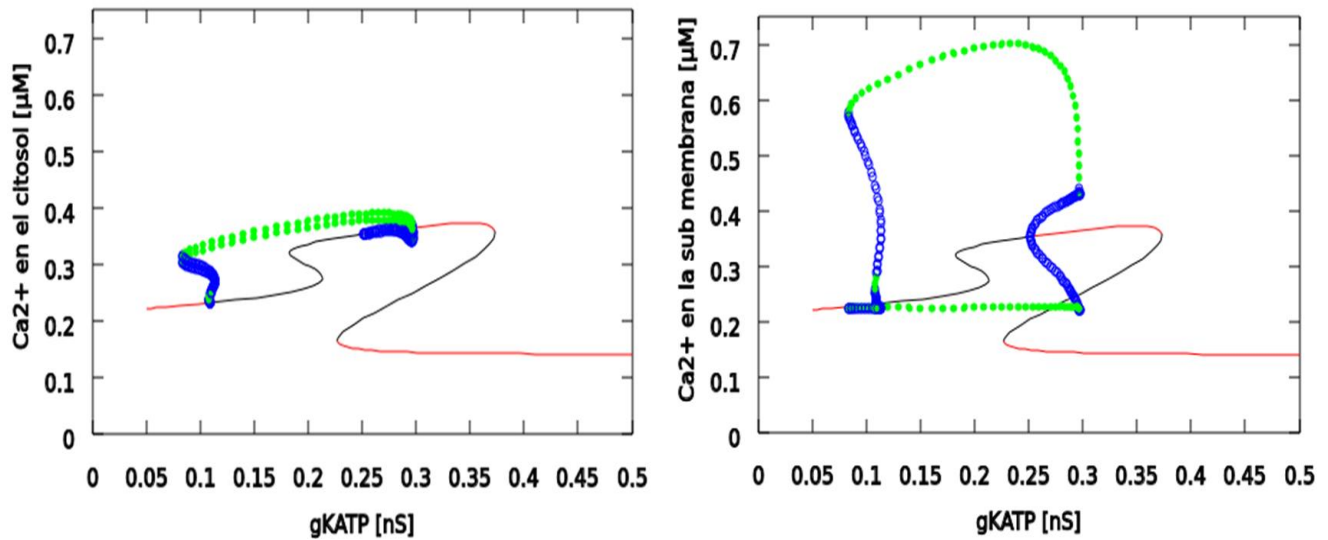


Figura 8.5. Diagrama de bifurcación del Ca^{2+} citosólico y Ca^{2+} en la sub membrana

Como se observa en la figura 8.5 se tienen diferentes regiones de estabilidad en los diagramas de bifurcación. La tabla 8.4 muestran los valores correspondientes a estas regiones para el Ca^{2+} en el citosol

Tabla 8.4. Regiones de estabilidad en el diagrama de bifurcación para el Ca^{2+} citosólico

	Parámetro de bifurcación $g_{K_{ATP}}$	Variable Ca_c	Estabilidad del sistema
Región 1	[0.05 - 0.1094)	[0.2226 - 0.233)	Estable
Región 2	[0.1094 - 0.2517)	[0.233 - 0.3541)	Inestable, región oscilatoria
Región 3	[0.2517 - 0.373)	[0.3541 - 0.3561)	Estable
Región 4	[0.373 - 0.227)	[0.3561 - 0.1672)	Inestable
Región 5	[0.227 - 0.452)	[0.1672 - 0.141)	Estable

De igual forma, se obtuvieron numéricamente los puntos críticos (estados estacionarios) en los cuales la estabilidad del sistema cambia y surgen soluciones periódicas. Estos valores se muestran en la tabla 8.5.

Tabla 8.5 Puntos críticos de bifurcación de Hopf de Ca^{2+} citosólico

Ca ²⁺ citosólico			
Región 2 (Región oscilatoria)	Parámetro de bifurcación $g_{K_{ATP}}$	Variable Ca_c	Estabilidad
Inicio	0.1094	0.233	Cambia de estable a inestable
Termino	0.2517	0.3541	Cambia de inestable a estable

Nótese que los valores del parámetro $g_{K_{ATP}}$ que definen la región oscilatoria en el diagrama de bifurcación sin las ecuaciones de Ca^{2+} así como los valores de los diagramas con las ecuaciones de Ca^{2+} son cercanos.

Este análisis numérico nos indica que existe un vínculo entre la actividad eléctrica, Ca^{2+} y ATP dado que la conductancia $g_{K_{ATP}}$ es capaz de cambiar la estabilidad del sistema entrando y saliendo de la región oscilatoria. Por lo tanto el Ca^{2+} juega un papel tan importante como el ATP, y la mitocondria es el organelo intracelular más involucrado en la regulación de estos dos mensajeros. Hasta este punto se validó el modelo eléctrico modificado con las ecuaciones de Ca^{2+} , el siguiente paso fue establecer un modelo de metabolismo mitocondrial que pudiera acoplarse al modelo eléctrico modificado.

8.2 Modelo de metabolismo mitocondrial

Se validó el funcionamiento del modelo metabólico a través de la reproducción de los resultados reportados (ver apéndice II). Para la propuesta de un nuevo modelo eléctrico-metabólico solo se tomaron algunas ecuaciones del modelo metabólico [39]. Se tomó la ecuación 12.2 definida para el Ca^{2+} en la mitocondria, la ecuación 12.4 para el NADH mitocondrial, la ecuación 12.5 y 12.6 para el ADP mitocondrial y citosólico, respectivamente, así como la ecuación 12.7 para la diferencia de voltaje a través de la membrana mitocondrial interna. Con respecto a las ecuaciones de conservación solo se tomó la ecuación 12.9 para el NADH y las ecuaciones 12.10 y 12.11 para los nucleótidos de adenina total en la mitocondria y en el citosol, respectivamente. La ecuación 12.1 para el Ca^{2+} en el citosol no se tomó en cuenta dado que en el modelo eléctrico se propuso una ecuación para el Ca^{2+} en el citosol (8.16). Tampoco se tomó en cuenta la ecuación 12.3 que describe la fracción de inactividad del receptor 1, 4, 5-inositol trifosfato (IP_3 R) y la ecuación 12.8 de conservación de Ca^{2+} . Estas ecuaciones no se tomaron dado que no se modeló el compartimento del RE y el receptor IP_3 está relacionado con el RE ya que sirve como regulador de las oscilaciones de Ca^{2+} que ocurren por un intercambio cíclico entre el Ca^{2+} citosólico y Ca^{2+} en el RE.

8.3 Modelo eléctrico-metabólico propuesto

En la figura 8.6 se muestra el modelo conceptual propuesto para describir los procesos involucrados en el funcionamiento de la célula alfa a baja glucosa, tales como el metabolismo mitocondrial (producción de ATP), actividad eléctrica y oscilaciones de Ca^{2+} en la célula pancreática alfa. La glucosa puede entrar a la

célula a través de transportadores específicos donde comienza a ser metabolizada por la primer ruta metabólica conocida como glucólisis; esta ocurre en el citosol y produce NADH, piruvato y energía en forma de ATP, el piruvato entra a la mitocondria para iniciar el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. El NADH producido en el ciclo de Krebs así como el FADH son tomados por la fosforilación oxidativa y nuevamente se obtiene energía en forma de ATP; estas etapas generan aproximadamente 24 moles de ATP por mol de glucosa.

La producción de ATP hace que el canal de K^+ sensible al ATP (K_{ATP}) baje su actividad lo cual ocasiona una despolarización en la membrana celular que lleva a la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo T en ~ -60 mV; al abrirse estos canales se despolariza aún más la célula lo cual conlleva a la apertura del canal de Na^+ activado por voltaje en ~ -30 mV. Cuando es abierto este canal la célula se despolariza de nuevo y lleva a la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L y N en ~ -20 mV a ~ -10 mV, lo que genera los potenciales de acción. La elevación de Ca^{2+} por canales tipo N dispara la exocitosis [31, 38]. Los otros canales de K^+ repolarizan a la célula y la bomba de Ca^{2+} ubicada en la membrana plasmática (PMCA) permite recuperar el nivel basal de Ca^{2+} citosólico, consumiendo un mol de ATP por un ion de Ca^{2+} expulsado.

El balance entre ATP y Ca^{2+} es manejado principalmente por la mitocondria a través del transporte único de Ca^{2+} mitocondrial (J_{MCU}), la extrusión de Ca^{2+} fuera de la mitocondria está dada por el intercambiador de Na^+/Ca^{2+} (J_{NCX}). Es considerado un flujo bidireccional que permite la existencia de oscilaciones sostenidas cuando el intercambiador de Na^+/Ca^{2+} es inhibido (J_x); para que la actividad del translocador se lleve a cabo se necesita la unión del ATP, ADP o ambos para que ocurra un cambio conformacional (J_{ANT}), el flujo J_o describe la tasa a la cual el NADH es oxidado en la cadena de transporte de electrones y representa la tasa de extrusión de protones (H^+). La activación de la enzima piruvato deshidrogenasa a través de la fosforilación reversible sensible al Ca^{2+} , camino glucolítico y ciclo de Krebs está dado por el flujo J_{PDH} ; así mismo $J_{F_oF_1}$ describe la velocidad de síntesis de ATP por la F_oF_1 -ATPasa y toma en cuenta un débil decremento en la velocidad con un incremento en el ATP mitocondrial, J_{HYD} es la tasa de consumo de ATP en el citosol, J_{HLEAK} representa la tasa de protones fuga, J_{AGC} representa el flujo de la actividad del translocador aspartato-glutamato, el cual es activado por un aumento de Ca^{2+} citosólico e inhibido por Ca^{2+} mitocondrial y promueve la producción de NADH [39]. El flujo por el cuál es extruido un ion de Ca^{2+} de la membrana plasmática por una molécula de ATP hidrolizada esta descrito por J_{PMCA} por lo que el transporte de Ca^{2+} consume ATP [5].

La figura 8.7 muestra la relación entre los nucleótidos ATP^{4-}/ADP^{3-} y ATP/ADP con la corriente del canal K_{ATP} .

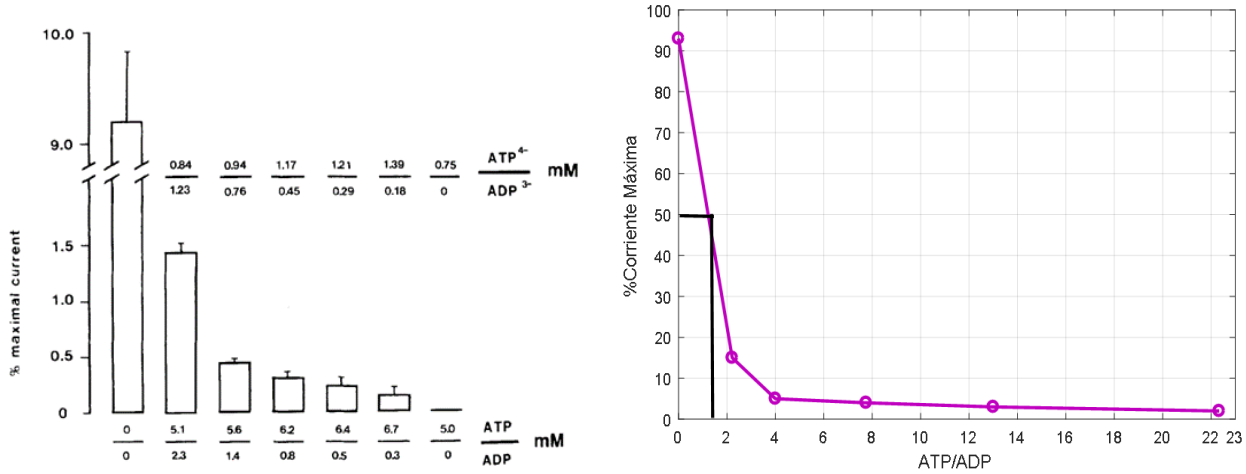


Figura 8.7. Relación entre ATP^{4-}/ADP^{3-} , ATP/ADP y la corriente K_{ATP} en registros de la línea celular RINm5F (célula β) reproducidos por [8]

En la figura 8.7 se muestra que al 50 % de la máxima corriente del canal de K_{ATP} ($\frac{I_{K_{ATP}max}}{2}$) le corresponde un valor del cociente ATP/ADP de 1.3, por lo tanto la concentración de ATP/ADP a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la corriente máxima fue tomado como $K_{M_{ATP}}=2$, el cual corresponde al valor entero inmediato superior. A continuación se propuso la expresión 8.17 para la dependencia de $\tilde{g}_{K_{ATP}}$ sobre el cociente ATP/ADP , estimando los valores óptimos de los parámetros $\bar{g}_{K_{ATP}}$ y $K_{M_{ATP}}$ en $\bar{g}_{K_{ATP}} = 0.5 nS$ y $K_{M_{ATP}}=2$.

$$\tilde{g}_{K_{ATP}} = \bar{g}_{K_{ATP}} \cdot \frac{K_{M_{ATP}}^2}{K_{M_{ATP}}^2 + \left(\frac{ATP}{ADP}\right)_c^2} \quad (8.17)$$

El parámetro $\bar{g}_{K_{ATP}} = 0.5 nS$ fue propuesto de tal forma que permitiera entrar y salir de la región oscilatoria manteniendo $K_{M_{ATP}}$ fija.

La ecuación diferencial para el Ca^{2+} en la sub membrana implementada junto con la ecuación para el Ca^{2+} citosólico y el modelo de la actividad eléctrica para la célula alfa, fue modificada, ya ahora se toma en cuenta el carácter electrogénico del transporte de Ca^{2+} en la membrana plasmática fuera de la célula, por lo que la ecuación de Ca^{2+} en la sub membrana que se usó para el modelo eléctrico-metabólico se muestra en la ecuación 8.18.

$$\frac{d[Ca_{me}]}{dt} = fr \left(-\frac{\sum_i I_{Ca_i}}{2F \left(\frac{vol}{6.5}\right)} \right) + v_{base} - J_{PMCA} - \gamma(Ca_{me} - Ca_c) \quad (8.18)$$

donde

$$J_{PMCA} =$$

$$r_m \frac{Ca_{me}^2}{K_M^2 + Ca_{me}^2} \frac{[ATP]_c}{[ATP]_c + K_e} \quad (8.19)$$

En trabajos previos se ha afirmado que la activación de la ATPasa por Ca^{2+} se describe mejor mediante una ecuación de Hill donde el coeficiente de Hill es 2, lo cual está relacionado con la unión de 2 iones de Ca^{2+} en el sitio de unión de la bomba PMCA, donde se transporta un ion de Ca^{2+} fuera de la membrana plasmática por una molécula hidrolizada de ATP [5, 11].

La ecuación 8.18 describe el comportamiento del Ca^{2+} en la sub membrana, donde se toma en cuenta los tipos de corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje, el volumen basal, el transporte de Ca^{2+} por la ATPasa tipo P fuera de la membrana plasmática así como la parte difusiva entre el citosol y la sub membrana dado un gradiente de concentración. Nótese que es considerado que el volumen de la capa exterior se define como el volumen de la célula alfa dividido por 6.5.

Para el modelo eléctrico-metabólico las concentraciones de ATP y ADP citosólico siguen la ecuación de conservación 12.11 del modelo del metabolismo mitocondrial, y afectan el valor de la función $\tilde{g}_{K_{ATP}}$ que gobierna la corriente $I_{K_{ATP}}$ del modelo de la actividad eléctrica a través de la regulación del nivel de ATP y ADP citosólico. La actividad eléctrica afecta al metabolismo mitocondrial mediante la homeostasis de Ca^{2+} citosólico que incluyen mecanismos activos y pasivos. La tabla 8.6 muestra las ecuaciones del nuevo modelo matemático eléctrico-metabólico propuesto.

Tabla 8.6. Ecuaciones diferenciales del modelo eléctrico-metabólico para la célula alfa

Ecuaciones del metabolismo mitocondrial [39]
* Concentración de Ca^{2+} mitocondrial: $\frac{d[Ca_m]}{dt} = f_m (J_{MCU} - J_{NCX} + J_X)$
* Concentración de NADH mitocondrial: $\frac{d[NADH]}{dt} = J_{PDH} - J_0 + J_{AGC}$
* Concentración de ADP mitocondrial: $\frac{d[ADP]_m}{dt} = J_{ANT} - \delta J_{F_0F_1}$
* Concentración de ADP citosólico: $\frac{d[ADP]_c}{dt} = J_{HYD} - \delta J_{ANT}$
* Diferencia de voltaje a través de la membrana mitocondrial interna: $\frac{d\Delta\Psi}{dt} = (\alpha_1 J_0 - \alpha_2 J_{F_1F_0} - J_{ANT} - J_{leak} - J_{NCX} - 2J_{MCU} - 2J_X - J_{AGC}) / C_P$
Ecuaciones de conservación
* Conservación total de NADH: $[NADH] + [NAD^+] = [NAD]_m^{TOT}$
* Conservación total de nucleótidos de adenina di y trifosfato en la mitocondria: $[ADP]_m + [ATP]_m = [A]_m^{TOT}$

* Conservación total de nucleótidos de adenina di y trifosfato en el citosol: $[ADP]_c + [ATP]_c = [A]_c^{TOT}$
Continúa
Acoplamiento de modelos a través del ATP por la función propuesta para \tilde{g}_{KATP}
* $\tilde{g}_{KATP} = \bar{g}_{KATP} \cdot \frac{K_{MATP}^2}{K_{MATP}^2 + \left(\frac{ATP}{ADP}\right)_c}$, donde \bar{g}_{KATP} y K_{MATP} son parámetros, $\bar{g}_{KATP} = 0.5 \text{ nS}$ y $K_{MATP} = 2$
Modelo de la actividad eléctrica en células pancreáticas [7]
<p>Corrientes iónicas</p> <p>* $I_{CaT} = g_{CaT}^* m_{CaT}^3 h_{CaT} (V_m - V_{Ca})$</p> <p>* $I_{CaL} = g_{CaL}^* m_{CaL}^2 h_{CaL} (V_m - V_{Ca})$</p> <p>* $I_{CaN} = g_{CaN}^* m_{CaN}^2 h_{CaN} (V_m - V_{Ca}) \rightarrow$ corriente añadida</p> <p>* $I_{Na} = g_{Na}^* m_{Na}^3 h_{Na} (V_m - V_{Na})$</p> <p>* $I_{KA} = g_{KA}^* m_{KA}^3 h_{KA} (V_m - V_K)$</p> <p>* $I_{KDR} = g_{KDR}^* m_{KDR}^4 h_{KDR} (V_m - V_K)$</p> <p>* $I_{KATP} = \tilde{g}_{KATP} (V_m - V_K)$</p> <p>* $I_{Leak} = g_{Leak}^* (V_m - V_{Leak})$</p> <p>* Potencial de membrana: $\frac{dV_m}{dt} = \frac{(I_{CaT} + I_{CaL} + I_{CaN} + I_{Na} + I_{KA} + I_{KDR} + I_{KATP} + I_{LEAK})}{C_m}$</p> <p>* Activación del ion i: $\frac{dm_i}{dt} = \frac{m_i^\infty(V_m) - m_i}{\tau_i^m(V_m)}$, * Desactivación del ion i: $\frac{dh_i}{dt} = \frac{h_i^\infty(V_m) - h_i}{\tau_i^h(V_m)}$</p> <p>* Función sigmoideal para m_i^∞ y h_i^∞: $sig(V_m, V^*, S^*) = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{-(V_m - V^*)}{S^*}\right)}}$</p> <p>* Función campana para τ_i^m y τ_i^h: $bell(V_m, V^*, S^*, \tau^*, \tau_0) = \frac{\tau^*}{e^{\left(\frac{-(V_m - V^*)}{S^*}\right)} + e^{\left(\frac{(V_m - V^*)}{S^*}\right)}} + \tau_0$</p>
Acoplamiento de modelos a través de Ca^{2+} en el citosol
<p>* Concentración de Ca^{2+} en la sub membrana plasmática:</p> <p>$\frac{d[Ca_{me}]}{dt} = fr \left(-\frac{\sum_i I_{Ca_i}}{2F_1 \left(\frac{vol}{6.5}\right)} \right) + v_{base} - J_{PMCA} - \gamma(Ca_{me} - Ca_c)$</p> <p>* Concentración de Ca^{2+} citosolico: $\frac{d[Ca_c]}{dt} = \gamma(Ca_{me} - Ca_c)$</p>

Los flujos de la tabla 8.7 son descritos por reacciones enzimáticas. La tabla 8.8, y 8.9 muestran los parámetros.

Tabla 8.7. Definición de flujos [39]

Flujos	Definición
--------	------------

$J_{MCU} = V_{MCU} \frac{\frac{Ca_c}{K_1} (1 + Ca_c)^3}{\left(1 + \frac{Ca_c}{K_1}\right)^4 + \frac{L}{\left(1 + \frac{Ca_c}{K_2}\right)^{2.8}}} e^{P_1 \Delta \Psi}$	Flujo de Ca^{2+} citosólico al interior de la mitocondria (Uniporte de Ca^{2+} mitocondrial).
Continúa	
Flujos	Definición
$J_{NCX} = V_{NCX} \left(\frac{Ca_m}{Ca_c}\right) e^{P_2 \Delta \Psi}$	Extrusión de Ca^{2+} fuera de la mitocondria a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+}
$J_x = k_x (Ca_c - Ca_m) e^{P_3 \Delta \Psi}$	Flujo bidireccional que permite la existencia de oscilaciones sostenidas cuando es inhibido el intercambiador Na^+/Ca^{2+}
$J_o = k_o \frac{[NADH]}{q_3 + [NADH]} \left(1 + e^{\frac{\Delta \Psi - q_4}{q_5}}\right)^{-1}$	Tasa a la cual el NADH es oxidado en la cadena de transporte de electrones
$J_{ANT} = V_{ANT} \frac{1 - \frac{\alpha_c [ATP]_c [ADP]_m}{\alpha_m [ADP]_c [ATP]_m} e^{-\frac{F \Delta \Psi}{RT}}}{\left(1 + \frac{\alpha_c [ATP]_c}{[ADP]_m} e^{-0.5 \frac{F \Delta \Psi}{RT}}\right) \left(1 + \frac{[ADP]_m}{\alpha_m [ATP]_m}\right)}$	Actividad del translocador que necesita de un ATP, ADP o ambos para que se lleve a cabo un cambio conformacional.
$J_{PDH} = k_{GLY} \frac{1}{q_1 + \frac{[NADH]}{[NAD^+]}} \frac{Ca_m}{q_2 + Ca_m}$	Activación de la enzima piruvato deshidrogenasa, camino glucolítico y ciclo de Krebs.
$J_{AGC} = V_{AGC} \frac{Ca_c}{K_{AGC} + Ca_c} \frac{q_2}{q_2 + Ca_m} e^{P_4 \Delta \Psi}$	Actividad del trasportador aspartato-glutamato que es activado por un aumento de Ca^{2+} citosólico e inhibido por Ca^{2+} mitocondrial y promueve la producción de NADH
$J_{F_oF_1} = V_{F_oF_1} \left(\frac{q_6}{q_6 + [ATP]_m}\right) \left(1 + e^{\frac{q_7 - \Delta \Psi}{q_8}}\right)^{-1}$	Tasa de síntesis del ATP por la F_oF_1 -ATPasa
$J_{HYD} = k_{HYD} \frac{[ATP]_c}{[ATP]_c + K_h} + J_{PMCA}$	Tasa de consumo de ATP en el citosol
$J_{H,LEAK} = q_9 \Delta \Psi + q_{10}$	Tasa de protones fuga
$J_{PMCA} = rm \frac{Ca_{me}^2}{K_M^2 + Ca_{me}^2} \frac{[ATP]_c}{[ATP]_c + K_e}$	Flujo del transporte de Ca^{2+} fuera de la membrana plasmática por la bomba activa PMCA [4].

Tabla 8.8. Parámetros usados en el modelo eléctrico metabólico

Parámetro	Definición	Valor	Referencia
a_1	Factor de escalamiento entre el consumo de NAHD y el cambio en el potencial de membrana mitocondrial	20	39
a_2	Factor de escalamiento entre la producción de ATP por la ATPasa y el cambio en el potencial de membrana mitocondrial	3.43	39
α_c	Factor que toma en cuenta al ADP citosólico y buffer de ATP	0.111	39
α_m	Factor que toma en cuenta al ADP mitocondrial y buffer de ATP	0.139	39
A_c^{TOT}	Concentración total de nucleótidos de adenina en el citosol	2500 μM	39
A_m^{TOT}	Concentración total de nucleótidos de adenina en la mitocondria	15000 μM	39
C_p	Capacitancia de membrana interna mitocondrial dividida por F	1.8 $\mu M.mV^{-1}$	39
δ	Relación de volumen entre las mitocondrias y la citosol	0.0733	39
F	Constante de Faraday	96480 C.mol ⁻¹	39

f_m	Fracción de Ca^{2+} libre sobre el buffer en la mitocondria	0.0003	39
K_1	Constante de disociación de la translocación de Ca^{2+} por el MCU	6 μM	39
K_2	Constante de disociación para la activación del MCU por Ca^{2+}	0.38 μM	39
K_{AGC}	Constante de disociación de Ca^{2+} desde el AGC	0.14 μM	39
K_e	Constante de disociación del ATP (desde bomba SERCA)	0.05 μM	39
k_{GLY}	Velocidad de glucólisis (empírica)	450 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	39
K_h	Constante de Michaelis-Menten para la hidrólisis de ATP	1000 μM	39
Continúa			
Parámetro	Definición	Valor	Referencia
k_{HYD}	Máxima tasa de hidrólisis para el ATP	Antes: 100 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ Ahora: 66 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	39 Propuesto
k_o	Tasa constante de la oxidación de NADH por la cadena de transporte de electrones	600 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	39
k_x	Tasa constante del flujo bidireccional de la fuga de Ca^{2+} desde la mitocondria	0.008 s^{-1}	39
L	Constante de equilibrio alostérico para conformaciones del uniporte	50	39
$\text{NAD}_m^{\text{TOT}}$	Concentración total de nucleótidos de piridina mitocondriales	Antes: 250 μM Ahora 400 μM	39 Propuesto
P_1	Coefficiente de dependencia de voltaje de la actividad MCU	0.1 mV^{-1}	39
P_2	Coefficiente de dependencia de voltaje de la actividad NCX	0.016 mV^{-1}	39
P_3	Coefficiente de dependencia de voltaje de fuga de calcio	0.05 mV^{-1}	39
P_4	Coefficiente de dependencia de voltaje de la actividad AGC	0.01 mV^{-1}	39
q_1	Constante similar a Michaelis-Menten para el consumo de NAD^+ por el ciclo de Krebs	1	39
q_2	Valor de $S_{0.5}$ para la activación del ciclo de Krebs por Ca^{2+}	0.1 μM	39
q_3	Constante de Michaelis-Menten para el consumo de NADH por la cadena de transporte de electrones (ETC)	100 μM	39
q_4	Coefficiente de dependencia de voltaje 1 de actividad en ETC	177 mV	39
q_5	Coefficiente de dependencia de voltaje 2 de actividad en ETC	5 mV	39
q_6	Constante de inhibición de la actividad de ATPasa por ATP	10000 μM	39
q_7	Coefficiente de dependencia de voltaje de la actividad de ATPasa	190 mV	39
q_8	Coefficiente de dependencia de voltaje de la actividad de ATPasa	8.5 mV	39
q_9	Dependencia del voltaje de la fuga de protones	2 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mV}^{-1}$	39
q_{10}	Constante de velocidad de la fuga de protones independiente del voltaje	-30 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	39
R	Constante de los gases ideales	8315 $\text{mJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	39
T	Temperatura	310.16 K	39
V_{ANT}	Constante de velocidad del translocador de nucleótidos de adenina	5000 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	39
V_{AGC}	Proporción de velocidad de producción de NADH a través del malato-aspartato	25 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	39
V_{F1FO}	Constante de velocidad de la F1Fo ATPasa	35000 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	39
V_{MCU}	Constante de velocidad del MCU	0.0006 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	39
V_{NCX}	Constante de velocidad del NCX	0.35 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	39
$g_{Ca,T}^*$	Máxima conductancia de Ca^{2+} tipo T en célula α	1 nS	7
$g_{Ca,L}^*$	Máxima conductancia de Ca^{2+} tipo L en célula α	1 nS	7
$g_{Ca,N}^*$	Máxima conductancia de Ca^{2+} tipo N en célula α	1 nS	13
g_{Na}^*	Máxima conductancia de Na^+ en célula α	10 nS	7
$g_{K,A}^*$	Máxima conductancia de K_A en célula α	20 nS	7
$g_{K,DR}^*$	Máxima conductancia de K_{DR} en célula α	4.9 nS	7
g_{leak}^*	Máxima conductancia de <i>leak</i> en célula α	0.2 nS	7
$\bar{g}_{K,ATP}$	Máxima conductancia de K_{ATP} en célula α	Antes: 0.2 nS Ahora: 0.5 nS	7 Propuesto
$K_{M,ATP}$	Parámetro adimensional para la función $\bar{g}_{K,ATP}$	2	Propuesto
C_m	Capacitancia de la célula α en la membrana plasmática	5 pF	7

V_{Na}	Potencial de reversión de la corriente iónica transportada por sodio	110 mV	7
V_K	Potencial de reversión de la corriente iónica transportada por potasio	-80 mV	7
V_{Ca}	Potencial de reversión de la corriente iónica transportada por calcio	60 mV	7
V_L	Potencial de reversión de la corriente iónica transportada por componentes fuga	-20 mV	7
F_1	Constante de Faraday	0.09648 C. μmol^{-1}	7
Vol	Volumen celular en la membrana plasmática	1.05 pL	Propuesto
Continúa			
Parámetro	Definición	Valor	Referencia
fr	Fracción libre de Ca^{2+} en el citosol	0.1	Propuesto
r_m	Remoción de Ca^{2+} fuera de la membrana plasmática	Antes: 362.5 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ Ahora: 230 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	Propuesto
K_{Me}	Afinidad por el Ca^{2+} en el proceso enzimático de orden 2	0.4 μM	Propuesto
V_{base}	Tasa de concentración basal de Ca^{2+}	40 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	Propuesto
γ	refleja la tasa de difusión de Ca^{2+} de la capa en la cual el Ca^{2+} en la membrana es definido	0.5 s^{-1}	Propuesto

Tabla 8.9. Parámetros de las funciones sigmoide y campana

Canal	Valores	Referencia
Ca^{2+} tipo T	$m^\infty(V_m) = (\text{sig})(V_m, -44 \text{ mV}, 4 \text{ mV})$ $h^\infty(V_m) = (\text{sig})(V_m, -46 \text{ mV}, -5 \text{ mV})$ $\tau^m(V_m) = (\text{bell})(V_m, -50 \text{ mV}, 12 \text{ mV}, 40 \text{ ms}, 0 \text{ ms})$ $\tau^h(V_m) = (\text{bell})(V_m, -50 \text{ mV}, 15 \text{ mV}, 20 \text{ mV}, 5 \text{ ms})$	7
Ca^{2+} tipo L	$m^\infty(V_m) = (\text{sig})(V_m, -25 \text{ mV}, 10 \text{ mV})$ $h^\infty(V_m) = (\text{sig})(V_m, -28 \text{ mV}, -5 \text{ mV},)$ $\tau^m(V_m) = (\text{bell})(V_m, -23 \text{ mV}, 20 \text{ mV}, 1 \text{ ms}, 0.05 \text{ ms})$ $\tau^h(V_m) = (\text{bell})(V_m, -50 \text{ mV}, 15 \text{ mV}, 20 \text{ mV}, 5 \text{ ms})$	7
Ca^{2+} tipo N	$m^\infty(V_m) = (\text{sig})(V_m, -4 \text{ mV}, 10.6 \text{ mV})$ $h^\infty(V_m) = (\text{sig})(V_m, -37 \text{ mV}, -11.5 \text{ mV})$ $\tau^m(V_m) = (\text{bell})(V_m, 20 \text{ mV}, 30 \text{ mV}, 0 \text{ ms}, 0.4 \text{ ms})$ $\tau^h(V_m) = (\text{bell})(V_m, -47 \text{ mV}, 26, \text{ mV}, 22 \text{ ms}, 850 \text{ ms})$	13
Na^+	$m^\infty(V_m) = (\text{sig})(V_m, -25 \text{ mV}, 4 \text{ mV})$ $h^\infty(V_m) = (\text{sig})(V_m, -47 \text{ mV}, -8 \text{ mV})$ $\tau^m(V_m) = (\text{bell})(V_m, -50 \text{ mV}, 10 \text{ mV}, 6 \text{ ms}, 0.05 \text{ ms})$ $\tau^h(V_m) = (\text{bell})(V_m, -50 \text{ mV}, 8 \text{ mV}, 80 \text{ ms}, 0.5 \text{ ms})$	7
K_A	$m^\infty(V_m) = (\text{sig})(V_m, 0 \text{ mV}, 10 \text{ mV})$ $h^\infty(V_m) = (\text{sig})(V_m, -68 \text{ mV}, -4 \text{ mV})$ $\tau^m(V_m) = 0.5 \text{ ms}$ $\tau^h(V_m) = (\text{bell})(V_m, 5 \text{ mV}, 20 \text{ mV}, 30 \text{ ms}, 21 \text{ ms})$	7
K_{DR}	$m^\infty(V_m) = (\text{sig})(V_m, -18.5 \text{ mV}, 23 \text{ mV})$ $\tau^m(V_m) = (\text{bell})(V_m, -10 \text{ mV}, 25\text{mV}, 1.5 \text{ ms}, 15 \text{ ms})$	7

9 Discusión de resultados

El modelo eléctrico-metabólico para células alfa fue implementado en Matlab y se usó la rutina ode23 para resolver las ecuaciones diferenciales (ver apéndice III). La rutina ode23 es utilizada cuando se tiene un sistema rígido, el cual se caracteriza principalmente por tener variables cuya dinámica está en escalas de tiempo diferentes [33]. En célula alfa la actividad eléctrica se activa en el orden de mili segundos mientras que el metabolismo mitocondrial varía en el orden de segundos, por lo que se tiene como variables lentas aquellas relacionadas con el metabolismo mitocondrial y como variables rápidas aquellas que estén relacionadas con la actividad eléctrica. La figura 9.1 muestra las dinámicas del potencial de membrana V_m así como Ca^{2+} citosólico simuladas con el modelo eléctrico-metabólico en un tiempo de simulación de 600 s (10 min).

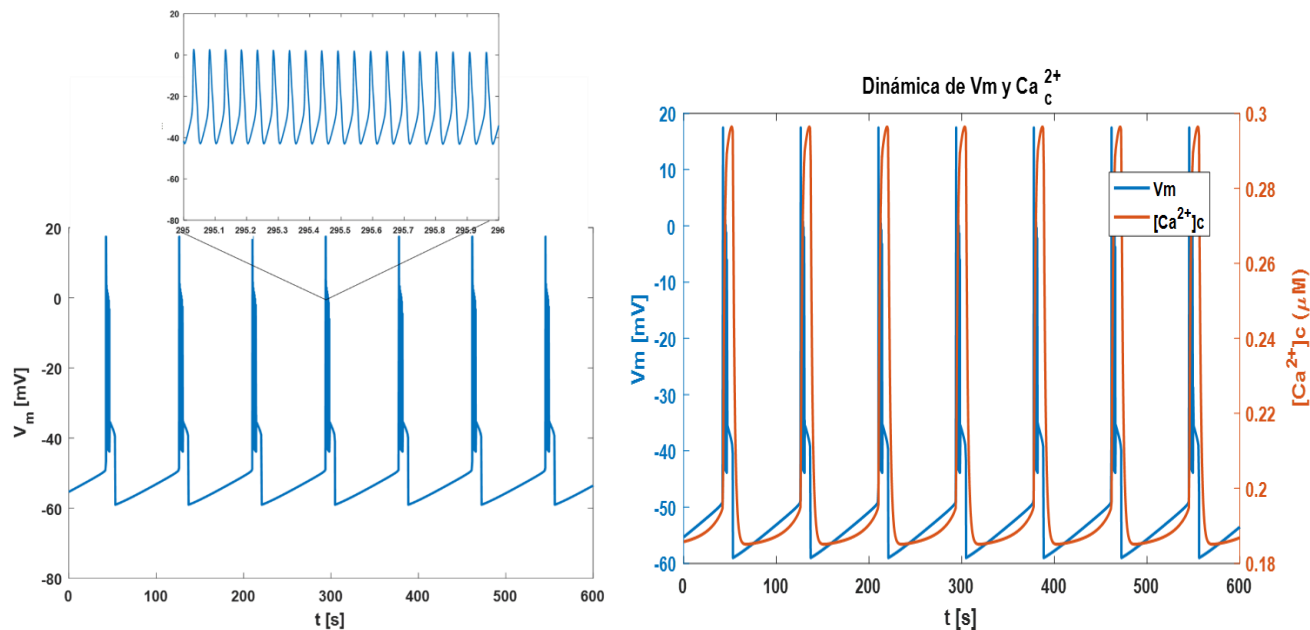


Figura 9.1. Dinámicas del V_m y Ca^{2+} citosólico obtenidas con el modelo eléctrico-metabólico

En la figura 9.1 se puede observar que las ráfagas de las oscilaciones en el voltaje (potencial de membrana) se encuentran entre los valores de ~ 0 mV a ~ -40 mV lo cual está de acuerdo con los valores reportados por [31, 32]. Así mismo se tiene una frecuencia de 20 oscilaciones en 1 s, lo cual ha sido reportado en [7]. Las

concentraciones de Ca^{2+} citosólico de la región oscilatoria van aproximadamente en un rango de ~ 0.19 a $\sim 0.3 \mu\text{M}$ donde es similar al reportando en observaciones de [13].

La figura 9.2 muestra el plano fase del potencial de membrana y Ca^{2+} citosólico con respecto a la conductancia del canal de K^+ sensible al ATP (\tilde{g}_{KATP}).

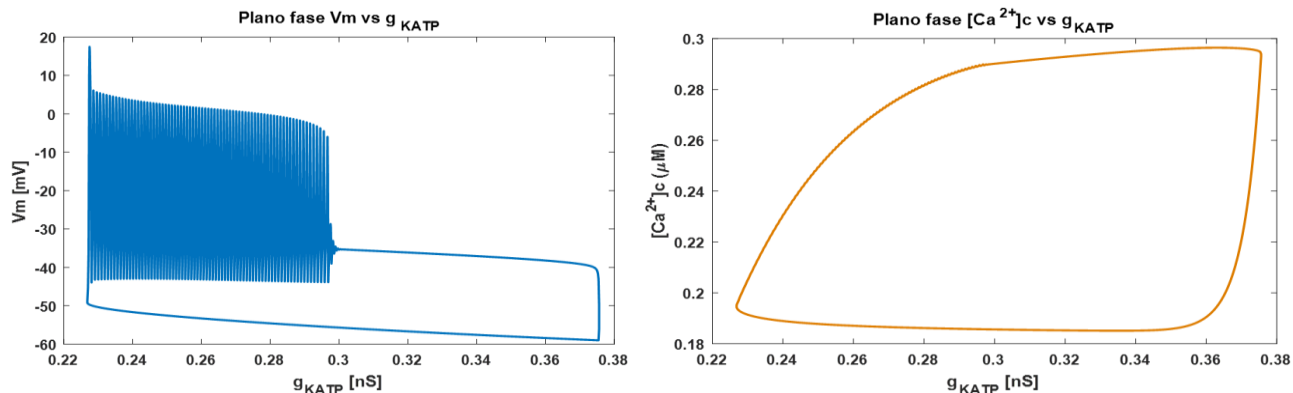


Figura 9.2. Plano fase del potencial de membrana y Ca^{2+} citosólico con \tilde{g}_{KATP} como variable

En la figura 9.2 se puede apreciar la trayectoria correspondiente a la condición inicial dada, donde en el caso del potencial de membrana se puede apreciar la región oscilatoria debida a la ráfaga de actividad eléctrica así como la estabilidad del sistema. Nótese que ahora \tilde{g}_{KATP} es una variable y no un parámetro.

En virtud de que el modelo es capaz de reproducir los comportamientos reportados, tal como se discute en esta sección, el siguiente objetivo fue predecir las dinámicas de Ca^{2+} y ATP ante diferentes niveles de estimulación. Como se muestra en el esquema de la figura 8.9, nuestro modelo de célula alfa incluye como posibles rutas efectoras de la glucosa a la glucólisis y a la fosforilación oxidativa, por lo que simular diferentes niveles de estimulación requirió definir las variables de control de la actividad eléctrica y metabólica del modelo. Se tienen dos posibilidades: variar K_{gly} (velocidad de la glucólisis) o variar A_c^{TOT} (cantidad total de nucleótidos de adenina en el citosol). Ambas posibilidades fueron exploradas dando los resultados que se describen a continuación.

9.1 Parámetro K_{gly}

El parámetro K_{gly} representa la ruta glucolítica y se encuentra en el flujo de la enzima piruvato deshidrogenasa (J_{PDH}). La enzima es activada a través de la fosforilación reversible sensible a Ca^{2+} , este flujo también toma en cuenta al ciclo de Krebs en el cual se reduce NAD^+ en NADH [39]. El flujo J_{PDH} se muestra en la expresión 9.1.

$$J_{PDH} = K_{gly} \frac{1}{q_1 + \frac{[NADH]}{[NAD^+]}} \frac{Ca_m}{q_2 + Ca_m} \quad (9.1)$$

La expresión 9.1 fue tomada como referencia de [2] donde modelan el flujo J_{PDH} como se muestra en la expresión 9.2.

$$J_{PDH} = p_1 J_{GPDH} \left(\frac{1}{p_2 + \frac{[NADH_m]}{[NAD_m]}} \right) \left(\frac{Ca_m}{p_3 + Ca_m} \right) \quad (9.2)$$

Donde p_1 es un parámetro adimensional y J_{GPDH} es el flujo que describe la actividad del gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), donde estos parámetros (p_1 y J_{GPDH}) representan al parámetro K_{gly} en el modelo del metabolismo mitocondrial [39]. La enzima GPDH cataliza la reacción de la etapa 6 de la glucólisis donde comienza la fase de generación de energía, por lo tanto la velocidad de reacción de GPDH refleja el flujo a través de la ruta glucolítica. Se ha argumentado [37] que se puede describir J_{GPDH} aproximadamente mediante una función algebraica del sustrato fructuosa 1,6- bifosfato (FBP) tal y como se muestra en la expresión 9.3.

$$J_{GPDH} = k_{GPDH} \sqrt{\frac{FBP}{1 \mu M}} \quad (9.3)$$

k_{GPDH} es un parámetro que representa la velocidad de reacción de la enzima GPDH y FBP es la cantidad de fructuosa 1.6 bifosfato, que es el producto obtenido en la tercer etapa de la glucólisis. Un aumento en la concentración de glucosa aumenta el flujo glucolítico lo que lleva a un aumento en la concentración de FBP, además se ha demostrado que la glucólisis es oscilatoria en algunos casos [28, 37] lo que resulta en pulsos periódicos de FBP. Por lo tanto el parámetro K_{gly} es proporcional al nivel de glucosa extracelular. Al realizar las simulaciones de metabolismo y actividad eléctrica variando el parámetro K_{gly} , se esperaba que al aumentar su valor (aumento de glucosa) se tuviera una disminución en Ca^{2+} intracelular, ya que ha sido reportado que cuando la glucosa aumenta el Ca^{2+} disminuye en la célula alfa [32]. La tabla 9.1 muestra los valores probados de K_{gly} y el promedio de Ca^{2+} intracelular que predice el modelo.

Tabla 9.1. Variación del parámetro K_{gly}

Variación del parámetro K_{gly} [$\mu M/s$]	Promedio de Ca^{2+} en la membrana [μM]	Promedio de Ca^{2+} en el citosol [μM]
448	0.1995	0.1983
450	0.2005	0.1992
460	0.2030	0.2014
470	0.2056	0.2038
480	0.2085	0.2064
490	0.2105	0.2081
500	0.2134	0.2104

550	0.2222	0.2185
600	0.2298	0.2253
700	0.2408	0.2351
800	0.2491	0.2423

Como se puede apreciar en la tabla 9.1, usando como variable de control a K_{gly} , el modelo predice que al haber un incremento de la velocidad glicolítica se tiene un incremento en el Ca^{2+} intracelular, lo que contradice las observaciones experimentales reportadas tanto para islotes como para células aisladas. Es posible que esto ocurra porque este parámetro fue diseñado para la representación de la ruta glicolítica en células beta, donde la forma de regulación de la glucosa sobre la secreción es completamente diferente a la reportada para células alfa [32].

9.2 Parámetro A_c^{TOT}

Se investigó el comportamiento predictivo del modelo propuesto ante las variaciones de los nucleótidos de adenina total en el citosol (A_c^{TOT}) en un rango de valores entre 0 y 10 mM dado que ha sido reportado en trabajos experimentales sobre islotes de ratón, que cuando se tienen valores muy grandes de glucosa extracelular reaparecen oscilaciones [19]. Sin embargo este no fue el caso. El valor basal de este parámetro fue tomado como 2.5 mM dado que fue reportado en un estudio acerca del contenido de nucleótidos de adenina en el musculo de animales invertebrados y vertebrados [39]. A partir de ahí su incremento corresponde a un aumento en los niveles de glucosa. Para identificar el comportamiento que predice el modelo se obtuvo el promedio de Ca^{2+} y ATP en el citosol usando la regla del trapecio 1/3 (ver apéndice IV). La tabla 9.2 muestra los resultados obtenidos en un tiempo de simulación de 10 min. Los valores del promedio de Ca^{2+} en el citosol se encuentran entre 0.18 y 0.30 μ M, que coinciden con lo que ha sido reportado en trabajos experimentales [13]. Respecto a los valores del ATP citosólico, a 1 mM de glucosa se ha medido \sim 6.5 mM de ATP citosólico [6]; este valor está por arriba de lo que obtuvimos en las simulaciones (0.1 mM a \sim 2 mM), probablemente porque sólo hemos considerado los procesos más relevantes de producción de ATP.

Tabla 9.2. Variación del parámetro A_c^{TOT}

Variación del parámetro A_c^{TOT} [μ M]	Promedio Ca^{2+} en el citosol [μ M]	Ca^{2+} total en el citosol [μ M]	ATP total en el citosol [mM]	Promedio ATP en el citosol [mM]
0	0.18	110.33	1081.87	1.80
200	0.29	176.94	70.47	0.11
300	0.28	173.00	94.82	0.15
400 (oscilaciones)	0.27	167.51	141.12	0.23
500	0.27	163.21	177.95	0.29
1000	0.24	146.95	361.86	0.60
1500	0.22	135.62	547.85	0.91
1700	0.22	132.17	623.75	1.03
1800	0.21	130.58	661.47	1.10

1900	0.21	128.85	699.15	1.16
2000	0.21	126.95	738.17	1.23
2100	0.21	126.18	776.95	1.29
2200	0.20	124.22	815.96	1.35
Continúa				
Variación del parámetro A_c^{TOT} [μM]	Promedio Ca^{2+} en el citosol [μM]	Ca^{2+} total en el citosol [μM]	ATP total en el citosol [mM]	Promedio ATP en el citosol [mM]
2300	0.20	123.35	855.15	1.42
2400	0.20	121.57	898.89	1.49
2500 (oscilaciones)	0.20	120.40	938.92	1.56
2600	0.19	116.29	1065.87	1.77
10000	0.19	117.49	2564.18	4.27

Se observa que al aumentar el valor de A_c^{TOT} las oscilaciones de Ca^{2+} se inhiben, es decir, esta variable se comporta como un parámetro de bifurcación, como se muestra en la figura 9.3. La región oscilatoria se encuentra entre los valores de 400 μM a 2500 μM , fuera de este rango no se tendrán oscilaciones. Al variar el parámetro A_c^{TOT} se tiene el comportamiento esperado ya que cuando la concentración de glucosa va incrementando el Ca^{2+} decrece lo cual ha sido reportado en trabajos experimentales [32].

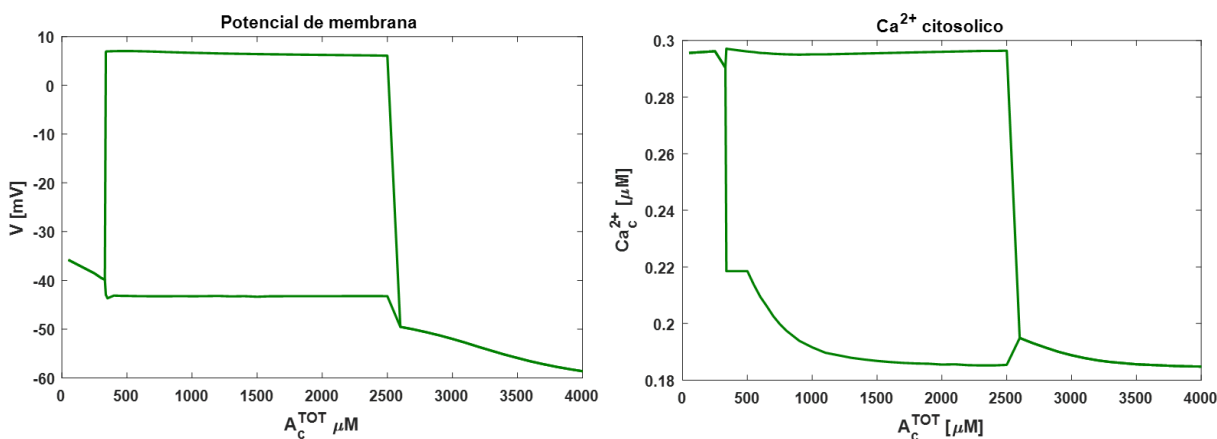


Figura 9.3. Diagramas de bifurcación

Al decrecer A_c^{TOT} , el Ca^{2+} aumenta y también hay un aumento en el número de oscilaciones del potencial de membrana, Ca^{2+} en el citosol y sub membrana así como ATP citosólico. La figura 9.4 muestra las dinámicas de Ca^{2+} citosólico y ATP con un valor de $A_c^{TOT} = 400 \mu\text{M}$ y $A_c^{TOT} = 2500 \mu\text{M}$, respectivamente.

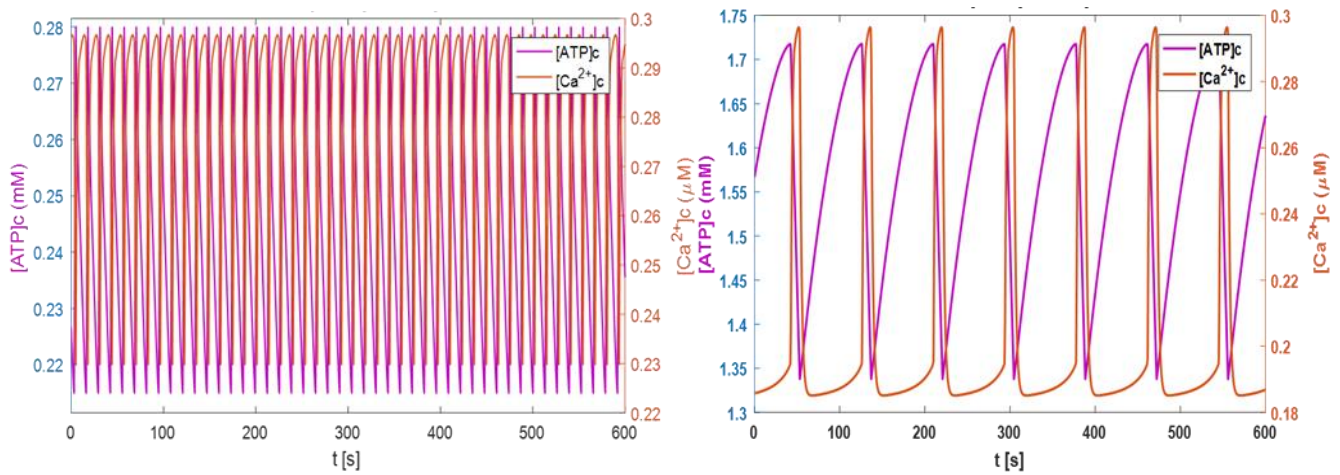


Figura 9.4. Comportamiento en contra fase de Ca^{2+} y ATP citosólico a diferentes valores de A_c^{TOT}

Una de las principales funciones del ATP es proveer de energía a la célula con la finalidad de transportar Ca^{2+} y así poder regular a la célula, de igual forma se ha observado que el ATP está vinculado con los canales de K^+ sensibles al ATP y por lo tanto está relacionado con la actividad eléctrica y con Ca^{2+} el cual es el principal señalizador para llevar a cabo la secreción de glucagón en la célula pancreática alfa. También ha sido observado que el Ca^{2+} mitocondrial estimula la producción de ATP por la ATPasa [39].

Los resultados obtenidos muestran que el ATP oscila en fase opuesta al Ca^{2+} tal y como ha sido reportado experimentalmente [19] lo cual sucede dado la energía requerida para el transporte de Ca^{2+} . Se obtuvo una oscilación de Ca^{2+} citosólico por minuto lo cual está de acuerdo con trabajos experimentales con un rango de valores de $\sim 0.19 \mu\text{M}$ a $0.3 \mu\text{M}$ el cual se encuentra dentro de los rangos fisiológicos [14, 32]. Respecto al potencial de membrana fue posible obtener ráfagas en un rango de $\sim 0 \text{ mV}$ a $\sim -40 \text{ mV}$, lo cual está de acuerdo con los valores reportados en [31, 32].

En mediciones estáticas de nucleótidos de adenina en el citosol han indicado que la concentración de ATP total es 2.2 veces mayor en células alfa que en células beta cuando la concentración de glucosa es 1 mM [6, 18]. Con base en lo anterior, en el nuevo modelo matemático eléctrico metabólico se puede tener control sobre la concentración de glucosa por medio del parámetro de nucleótidos de adenina total en el citosol (A_c^{TOT}), ya que la célula alfa al ser estimulada con una baja concentración de glucosa se metaboliza mediante la ruta de glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, por lo tanto se obtendrá una baja concentración de nucleótidos de adenina, es decir, ATP y ADP en el citosol entonces el cociente ATP/ADP citosólico será bajo y este a su vez moderará la actividad del canal de K^+ sensible al ATP ya que es muy sensible a baja glucosa y provocará una despolarización de la membrana celular hasta activar los canales de Na^+ y canales de Ca^{2+} generando potenciales de acción y secreción de glucagón [31, 38]. La figura 9.5 muestra la participación del parámetro A_c^{TOT} como parte de la regulación de glucosa cuando esta es baja.

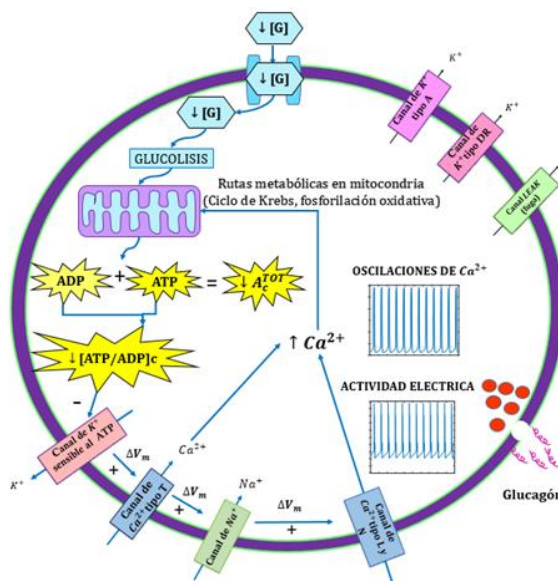


Figura 9.5. Esquema propuesto del control de glucosa con el parámetro A_c^{TOT} cuando es baja

Cuando la concentración de glucosa va en aumento, hay un incremento en la concentración de adenina nucleótidos (ATP, ADP), por lo tanto hay un incremento en la concentración del cociente ATP/ADP lo cual lleva al bloqueo de canales de K^+ sensible al ATP y a su vez a la despolarización de la membrana de tal forma que inactivan los canales de Na^+ y Ca^{2+} , por lo tanto no se generan potenciales de acción y hay inhibición de glucagón [30]. La figura 9.6 muestra la participación del parámetro A_c^{TOT} como parte de la regulación de glucosa cuando ésta es alta.

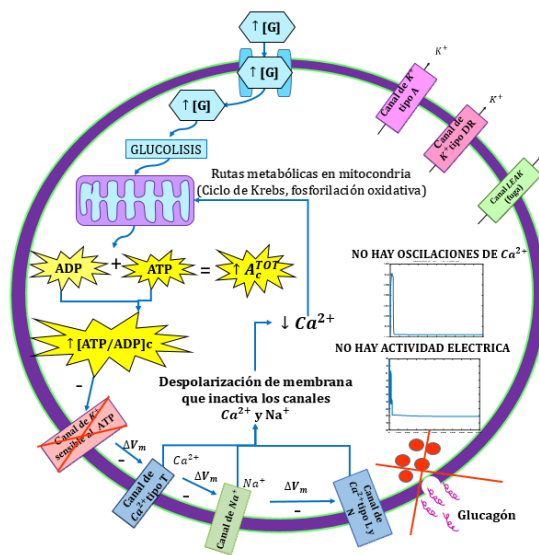


Figura 9.6 Esquema propuesto del control de glucosa con el parámetro A_c^{TOT} cuando es alta

Con base en lo obtenido, el modelo eléctrico metabólico es capaz de reproducir comportamientos específicos en una célula pancreática alfa.

10 Conclusiones y perspectivas

Se propuso un modelo eléctrico-metabólico que permitió estudiar el vínculo entre el ATP, metabolismo mitocondrial, la actividad eléctrica y el Ca^{2+} para la célula alfa pancreática. Al implementar el modelo eléctrico-metabólico se obtuvieron las dinámicas del potencial de membrana, Ca^{2+} citosólico, Ca^{2+} en la submembrana y ATP citosólico que reproducen el comportamiento observado en experimentos en células aisladas y en islotes estimulados a baja glucosa; en especial se reprodujeron las dinámicas en contrafase del Ca^{2+} y ATP, lo que indican un rol clave de estos mensajeros en la autorregulación de la célula.

Este trabajo predice que el Ca^{2+} estimulado por el metabolismo mitocondrial puede modular la actividad eléctrica y que la presencia de oscilaciones de Ca^{2+} está respaldada por el disparo intermitente de potenciales de acción. Nuestros resultados también indican que los nucleótidos de adenosina actúan como moduladores de esta actividad intermitente.

Como trabajo a futuro sería interesante estudiar el papel de los receptores activados por adenosina y sus rutas de señalización. Así mismo, prestar atención a la enzima glucoquinasa como reguladora de la entrada de glucosa libre a la ruta de la glucólisis.

Referencias

- [1] Antonioli L., Blandizzi C., Csóka B., Pacher P., Haskó G., (2015). Adenosine signalling in diabetes mellitus-pathophysiology and therapeutic consideration, *Nature Reviews Endocrinology*, pp. 1-14.
- [2] Bertram R., Pedersen G. M., Luciani D., Sherman A., (2006). A simplified model for mitochondrial ATP production, *Journal of Theoretical Biology*, 243, pp. 575-586.
- [3] Briant L., Salehi A., Vergari E., Zhang Q., Rorsman P., (2016). Glucagon secretion from pancreatic α -cells, *Upsala Journal of Medical Sciences*, 121, pp. 113-119.
- [4] Chay T., Keizer R., (1983). Minimal Model for Membrane Oscillations in the Pancreatic Beta-Cell, *Biophysical Journal*, 42, pp. 181-190.
- [5] Clapham D., (1995). Review: Calcium Signaling, *Cell Press*, 80, pp. 259-268.
- [6] Detimary P., Dejonghe S., Ling Z., Pipeleers D., Schuit F., Henquin J., (1998). The Changes in Adenine Nucleotides Measured in Glucose-stimulated Rodent Islets Occur in β -cells but Not in α -cells and Are Also Observed in Human Islets, *The Journal of biological chemistry*, 273, pp. 33905-33908.
- [7] Diderichsen P., Göpel S., (2006). Modelling the Electrical Activity of Pancreatic α -cells Based on Experimental Data from Intact Mouse Islets, *J Biol Phys.*, 32, pp. 209-229.
- [8] Dunne J., et al., (1988). The Gating of Nucleotide-Sensitive K^+ Channels in Insulin-Secreting Cells Can Be Modulated by Changes in the Ratio ATP^4-/ADP^3- and by Nonhydrolyzable Derivatives of Both ATP and ADP, *Springer, Journal Membrane Biology*, 104, pp. 165-177.
- [9] Fridlyand L., Philipson L., (2012). A computational systems analysis of factors regulating α cell glucagon secretion, *Islets*, 4, pp. 262-283.
- [10] Gandini M., Sandoval A., Felix R., (2017). Patch-Clamp Recording of Voltage-Sensitive Ca^{2+} Channels, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp. 1-8.
- [11] Graupner M., Erler F., Meyer-Hermann M., (2005). A Theory of Plasma Membrane Calcium Pump Stimulation and Activity, *Journal of Biological Physics*, 31, pp. 183-206.
- [12] Galvis J., (2010). Aplicación de la teoría de bifurcaciones al análisis de estabilidad de un sistema de potencia, *Universidad Tecnológica de Pereira*, documento para obtener el grado de Ingeniería.
- [13] González V., Gil A., Quesada I., (2010). Minimal State Models for Ionic Channels Involved in Glucagon Secretion, *Mathematical Biosciences and Engineering*, 7, pp. 793-807.
- [14] González V., Dupont G., Gil A., González A., Quesada I., (2012). Model for Glucagon Secretion by Pancreatic α -cells, *Plos One Computational Biology*, 7, pp. 1-10.
- [15] Gonze D., Kaufman M., (2012). Theory of non-linear dynamical systems, *Master en Bioinformatique et Modélisation*, Belgium.
- [16] Hodgkin L., Huxley F., (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *University of Cambridge, Journal Physiology*, 117, pp. 500-544.
- [17] Liangyi C., Duk-Su K., Bertil H., (2003). Dynamics of Calcium Clearance in Mouse Pancreatic β -Cells, *Diabetes*, 52.

- [18] Li J., et al., (2015). Submembrane ATP and Ca^{2+} kinetics in α -cells: unexpected signaling for glucagon secretion, *The FASEB Journal*, 29, pp. 3379-3388.
- [19] Li.J., (2014). ATP Dynamics in Pancreatic α - and β -cells, *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine*, 1044, pp. 53.
- [20] Nelson L., Cox M., (2008), *Principios de Bioquímica*, cuarta edición, editorial Omega.
- [21] Khan academic (2018). ATP and reaction coupling [En línea], disponible en: <https://www.khanacademy.org/science/biology/energy-and-enzymes/atp-reaction-coupling/a/atp-and-reaction-coupling> (consultado 20 de Julio 2018).
- [22] Macdonald P., et al., (2007). A K_{ATP} Channel-Dependent Pathway within a Cells Regulates Glucagon Release from Both Rodent and Human Islets of Langerhans, *Plos Biology*, 5, pp. 1236-1247.
- [23] Marheineke N., Cibis M., Schiessl S., Pielmeier U., (2014). Optimal control of glucose balance in ICU patients based on GlucoSafe model, *Journal of Mathematics in Industry*, Springer Open Journal, pp. 1-13.
- [24] Matlab Tutorial [En línea], Disponible en: <http://www.cfm.brown.edu/people/dobrush/am33/Matlab/RK3.html> (consultado 22 de Julio 2018).
- [25] Mathews J., Fink K., (2000). *Métodos Numéricos con Matlab*, tercera edición, Prentice Hall.
- [26] Merrins J., Fendler B., Zhang M., Sherman A., Bertram R., Satin L., (2010). Metabolic Oscillations in Pancreatic Islets Depend on the Intracellular Ca^{2+} Level but Not Ca^{2+} Oscillations, *Biophysical Journal*, 99, pp. 76-84.
- [27] Montefusco F., Pedersen M., (2015). Mathematical modelling of local calcium and regulated exocytosis during inhibition and stimulation of glucagon secretion from pancreatic α -cells, *The Journal of Physiology*, 593.20, pp. 4519-4530.
- [28] Murray D., (2001). *Mathematical Biology: I an Introduction*, Estados Unidos de América, Springer.
- [29] Olivos E., (2017). Estudio teórico de oscilaciones de Ca^{2+} de células alfa. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ingeniería de Procesos. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Azcapotzalco, México.
- [30] Organización Mundial de la Salud (2016). Diabetes [En línea], Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/> (Consultado el 18 de Marzo 2017).
- [31] Quesada I., Tudurí E., Ripoll C., Nadal A., (2008). Physiology of the pancreatic α -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes, *Journal of endocrinology*, 199, pp. 5-19.
- [32] Quoix N. et al., (2009). Glucose and Pharmacological Modulators of ATP-Sensitive K^+ Channels Control $[\text{Ca}^{2+}]_c$ by Different Mechanisms in Isolated Mouse α -Cells, *Diabetes*, 58, pp. 412-421.
- [33] Randall J., (2007). *Finite Difference Methods for Ordinary and Partial Differential Equations*, University of Washington Seattle, Washington.
- [34] Ríos J.; Parra J., Cano J., (2014). Principio del todo o nada: ¿un concepto mal interpretado o un dogma equivocado?, *Archivos de Medicina*, Universidad de Manizales, Colombia, 14, pp. 144-149

- [35] Romero H., (2018). Simulation of the Spatial Ca^{2+} dynamics in Cardiac Cells, Master in Process Engineering. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Azcapotzalco, México.
- [36] Rorsman P., Ramracheya R., Rorsman G., Zhang Q., (2014). ATP-regulated potassium channels and voltage-gated calcium channels in pancreatic α and β cells: similar functions but reciprocal effects on secretion, *Diabetologia*, 57, pp. 1749–1761.
- [37] Tornheim, K., Lowenstein, J.M., (1974). The purine nucleotide cycle. IV. Interactions with oscillations of the glycolytic pathway in muscle extracts, *Journal of Theoretical Biology*, 249, pp. 3241–3247.
- [38] Tudurí E., (2009). Regulación de la secreción de glucagón por ATP extracelular y Leptina en célula α pancreática. Tesis para obtener el grado de doctorado. Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, España.
- [39] Wacquier B., Combettes L., Van Nhieu G., Dupont G., (2016). Interplay between Intracellular Ca^{2+} Oscillations and Ca^{2+} -stimulated Mitochondrial Metabolism, *Scientific Reports*, pp. 1-16.
- [40] Watts M., Sherman A., (2014). Modeling the Pancreatic α -cell: Dual Mechanisms of Glucose Suppression of Glucagon Secretion, *Biophysical Journal*, 106, pp. 741–751.
- [41] Wolkenhauer O., (2014). Why model?, *Frontiers in Psychology*, pp. 1-5.
- [42] Yang G., et al., (2012). Glucose decreases extracellular adenosine levels in isolated mouse and rat pancreatic islets, *Landes Bioscience*, 4, pp. 64-70.
- [43] Zhang Q., et al., (2013). Role of K_{ATP} Channels in Glucose-Regulated Glucagon Secretion and Impaired Counterregulation in Type 2 Diabetes, *Cell Metabolism*, pp. 871–882.

11 Apéndice I: Sistemas rígidos y diagramas de bifurcación

La rigidez en un sistema de ecuaciones diferenciales se debe a que hay variables que cambian lento, junto con variables que cambian rápidamente y tienden a ser transitorios, desaparecen y la solución es dominada por las variables lentas. Aunque estas variables rápidas tiendan a desaparecer, pueden definir el tamaño de paso en el método numérico.

La rigidez causa dificultades numéricas dado que en los métodos numéricos continuamente se introducen errores. Estos errores actúan como una perturbación en el sistema que aleja de una solución uniforme que se está calculando. Las dificultades surgen del hecho de que incluso métodos numéricos explícitos, son inestables a menos que el tamaño de paso de tiempo sea tan pequeño así como el proceso más rápido descrito por el sistema para hacerlo de manera estable [33]. En las simulaciones realizadas en el presente trabajo, el tamaño de paso fue adaptado al momento de resolver el sistema de ecuaciones ya que al usar la rutina ode23 el software Matlab hace el cálculo del tamaño de paso para una mejor aproximación a la solución sin mantenerlo fijo.

Un sistema dinámico es un sistema complejo que presenta una evolución de su estado en un lapso de tiempo. El comportamiento de este estado se puede caracterizar a través de modelos que tratan de representar al sistema. Al cambio en las condiciones del funcionamiento que tiene un sistema no lineal se le conoce como bifurcación ya que un parámetro es variado y este cambia la estabilidad del sistema. Este parámetro es conocido como parámetro de bifurcación y en el sistema dinámico no lineal puede haber varios parámetros de bifurcación [12].

Un diagrama de bifurcación muestra como un estado estable y su comportamiento del sistema cambia de acuerdo al control de varios parámetros. Existen diferentes tipos de bifurcación, las cuales se muestran a continuación [15].

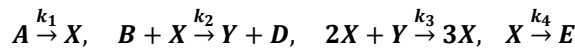
- Bifurcación transcrita. Se caracteriza por el paso de un estado estacionario estable a un estado estacionario inestable. En el mismo punto, otro estado estacionario estable, cambia a inestable.
- Bifurcación del nodo silla. Se caracteriza porque el estado estacionario estable en función de cierto parámetro muestra una forma de S, delimitada por dos puntos límite. Entre estos dos valores, tres estados estacionarios están presentes siendo dos estables y uno es inestable. Este es un caso típico de biestabilidad.
- Bifurcación Pitchfork. Se caracteriza por el paso de un estado estacionario estable a un estado estacionario inestable y la aparición simultánea de dos estados estacionarios estables. Por lo

general, este tipo de bifurcación se encuentra en sistemas particulares como dos subsistemas acoplados.

- Bifurcación de Hopf. Se caracteriza por el paso de la parte real de los valores propios complejos conjugados de negativos a positivos. Es la bifurcación más común que conduce a las oscilaciones y a un ciclo límite.

A continuación se presenta un ejercicio tomado del capítulo 7 del libro *Mathematical Biology: I an Introducton* [28], con la finalidad de ejemplificar lo mencionado anteriormente.

Ejercicio. El mecanismo de reacción “Brusselator” propuesto por Prigogene y Lefever (1968) es



donde las ks son las constantes de velocidad, y las concentraciones de reactivo de A y B se mantienen constante. Escriba el sistema de ecuaciones diferenciales gobernante para las concentraciones de X y Y, adimensionalizar las ecuaciones para que se conviertan en:

$$\frac{du}{d\tau} = 1 - (b + 1)u + au^2v, \quad \frac{dv}{d\tau} = bu - au^2v$$

donde u y v corresponden a X y Y, $\tau = k_4 t$, $a = \frac{k_3(k_1A)^2}{k_4^3}$ y $b = \frac{k_2B}{k_4}$. Determine el estado estacionario positivo y muestre que hay una bifurcación en el valor $b = b_c = 1 + a$ en el cual el estado estacionario se vuelve inestable en una forma de bifuración de Hopf.

Solución.

Aplicando ley de acción de masas se obtienen las siguientes ecuaciones

$$\frac{dX}{dt} = k_1A - k_2BX + k_3YX^2 - k_4X \tag{11.1}$$

$$\frac{dY}{dt} = k_2BX - k_3X^2Y \tag{11.2}$$

Adimensionalización en ecuación 11.1 y 11.2, respectivamente.

$$\left(\frac{1}{k_4}\right)\left(\frac{k_4}{k_1A}\right)\frac{dX}{dt} = \left(\frac{k_4}{k_1A}\right)\left(\frac{k_1A}{k_4}\right) - \left(\frac{k_2B}{k_4} + \frac{k_4}{k_4}\right)\left(\frac{k_4}{k_1A}X\right) + \left(\frac{k_3(k_1A)^2}{k_4^3}\right)\left(\frac{k_4}{k_1A}X\right)^2\left(\frac{k_4}{k_1A}Y\right)$$

$$\left(\frac{1}{k_4}\right)\left(\frac{k_4}{k_1A}\right)\frac{dY}{dt} = \left(\frac{k_4}{k_1A}\right)\left(\frac{k_2B}{k_4}\right) - \left(\frac{k_3(k_1A)^2}{k_4^3}\right)\left(\frac{k_4}{k_1A}X\right)^2\left(\frac{k_4}{k_1A}Y\right)$$

donde $u = \frac{k_4}{k_1A}X$, $v = \frac{k_4}{k_1A}Y$, $\tau = k_4 t$, $a = \frac{k_3(k_1A)^2}{k_4^3}$, $b = \frac{k_2B}{k_4}$, sustituyendo tenemos

$$\frac{du}{d\tau} = 1 - (b + 1)u + au^2v$$

$$\frac{dv}{d\tau} = bu - au^2v$$

Una vez obtenidas las ecuaciones adimensionalizadas, es necesario linealizar el sistema de ecuaciones diferenciales no lineales para obtener el estado estacionario.

$$P(u, v) = 1 - (b + 1)u + au^2v = 0 \quad (11.3)$$

$$Q(u, v) = bu - au^2v = 0 \quad (11.4)$$

De ecuación 4 se despeja u y se sustituye en ecuación 3.

$$u(b - auv) = 0, \text{ por lo tanto, } u = \frac{b}{av}$$

$$1 - (b + 1)\left(\frac{b}{av}\right) + a\left(\frac{b}{av}\right)^2 v = 0, \text{ despejando } v = \frac{b}{a}$$

Sustituyendo $v = \frac{b}{a}$ en $u = \frac{b}{av}$ se tiene el estado estacionario:

$$P_{cr} = \left(1, \frac{b}{a}\right) \quad (11.5)$$

Calculando la matriz Jacobiana se tiene lo siguiente.

$$J(u, v) = \begin{bmatrix} \frac{\partial P}{\partial u} & \frac{\partial P}{\partial v} \\ \frac{\partial Q}{\partial u} & \frac{\partial Q}{\partial v} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -(b + 1) + 2avu & au^2 \\ b - 2auv & -au^2 \end{bmatrix}$$

Evaluando en el estado estacionario $P_{cr} = \left(1, \frac{b}{a}\right)$.

$$A_{P_{cr}} = \begin{bmatrix} b - 1 & a \\ -b & -a \end{bmatrix}$$

donde la traza $\tau = b - a - 1$ y el determinante $\Delta = a$.

Para demostrar la bifurcación de Hopf se debe cumplir que los valores propios son conjugados, entonces $\lambda_{1,2} = \alpha \pm i\beta$ donde $\alpha=0$ (imaginarios) en $b = b_c$. Para ello se debe cumplir que $\tau^2 - 4\Delta < 0$. Entonces sustituyendo τ^2 y Δ tenemos:

$$(b - a - 1)^2 - 4a = b^2 + a^2 - 2ab - 2b - 2a + 1$$

sustituyendo $b = b_c = 1 + a$ en la expresión anterior tenemos:

$$(b - a - 1)^2 - 4a = -4a$$

por lo tanto $-4a < 0$.

De igual forma se debe cumplir que la tasa de cambio de la parte real de los $\lambda_{1,2}$ en b_c debe ser diferente de cero.

$$\frac{\partial (Re(\lambda))}{\partial b} \Big|_{b=b_c} = \frac{1}{2} \frac{\partial \tau}{\partial b} \Big|_{b=b_c} = \frac{1}{2} \frac{\partial (b - a - 1)}{\partial b} \Big|_{b=b_c} = \frac{1}{2} \neq 0$$

Por lo tanto se tiene una bifurcación de Hopf en $b = b_c = 1 + a$ en el cual el estado estacionario se vuelve inestable.

12 Apéndice II: Modelo del metabolismo mitocondrial

El modelo metabólico propuesto por Wacquier et al. [39] describe procesos involucrados en el metabolismo mitocondrial relacionados con Ca^{2+} , utilizando un enfoque de balances compartamentales entre el citosol, retículo endoplasmático (RE) y mitocondria, permitiendo un análisis en el comportamiento de diferentes variables mitocondriales. Originalmente fue propuesto para células no excitables (célula HeLa); sin embargo ha resultado adecuado también para células excitables [35]. Este modelo está conformado por siete ecuaciones diferenciales (12.1-12.7) así como cuatro ecuaciones de conservación (12.8-12.11) las cuales se muestran a continuación.

Ecuaciones diferenciales

- Concentración de Ca^{2+} en el citosol: $\frac{dC_c}{dt} = f_c (\alpha J_{IP_3} - J_{SERCA} - \delta J_{MCU} + \delta J_{NCX} - \delta J_x)$
(12.1)

- Concentración de Ca^{2+} en la mitocondria: $\frac{dC_m}{dt} = f_m (J_{MCU} - J_{NCX} + J_x)$
(12.2)

- Fracción de inactividad de receptores IP_3 : $\frac{dR_i}{dt} = k_+ C_c^{ni} \left(\frac{1-R_i}{1 + \left(\frac{C_c}{K_a}\right)^{na}} \right) - k_- R_i$
(12.3)

- Concentración de NADH mitocondrial: $\frac{d[\text{NADH}]}{dt} = J_{PDH} - J_0 + J_{AGC}$
(12.4)

- Concentración de ADP mitocondrial: $\frac{d[\text{ADP}_m]}{dt} = J_{ANT} - \delta J_{F_1F_0}$
(12.5)

- Concentración de ADP en el citosol: $\frac{d[\text{ADP}_c]}{dt} = J_{HYD} - \delta J_{ANT}$
(12.6)

- Diferencia de voltaje a través de la membrana mitocondrial interna:

$$\frac{d\Delta\Psi}{dt} = (a_1 J_0 - a_2 J_{F_1F_0} - J_{ANT} - J_{leak} - J_{NCX} - 2J_{MCU} - 2J_x - J_{AGC}) / C_P \quad (12.7)$$

Ecuaciones de conservación

- Conservación de Ca^{2+} citosólico (intracelular): $\frac{C_c}{f_c} + \frac{\alpha C_{ER}}{f_r} + \frac{\delta C_m}{f_m} = C_T$
(12.8)

- Conservación total de NADH: $[NADH] + [NAD^+] = [NAD_m^{TOT}]$ (12.9)

- Conservación total de nucleótidos de adenina di y trifosforilados en la mitocondria: $[ADP_m] + [ATP_m] = [A_m^{TOT}]$ (12.10)

- Conservación total de nucleótidos de adenina di y trifosforilados en el citosol: $[ADP_c] + [ATP_c] = [A_c^{TOT}]$ (12.11)

El modelo descrito por las ecuaciones anteriores se implementó en Matlab y se resolvió con la rutina ode23. La figura 12.1 muestra la dinámica de Ca^{2+} en el RE, citosol y mitocondria con un valor del receptor inositol 1, 4, 5-trifosfato $IP_3 = 1 \mu M$ y $IP_3 = 0.1 \mu M$, respectivamente, dado que el sistema es estimulado por el receptor IP_3 con un tiempo de simulación de 500 s.

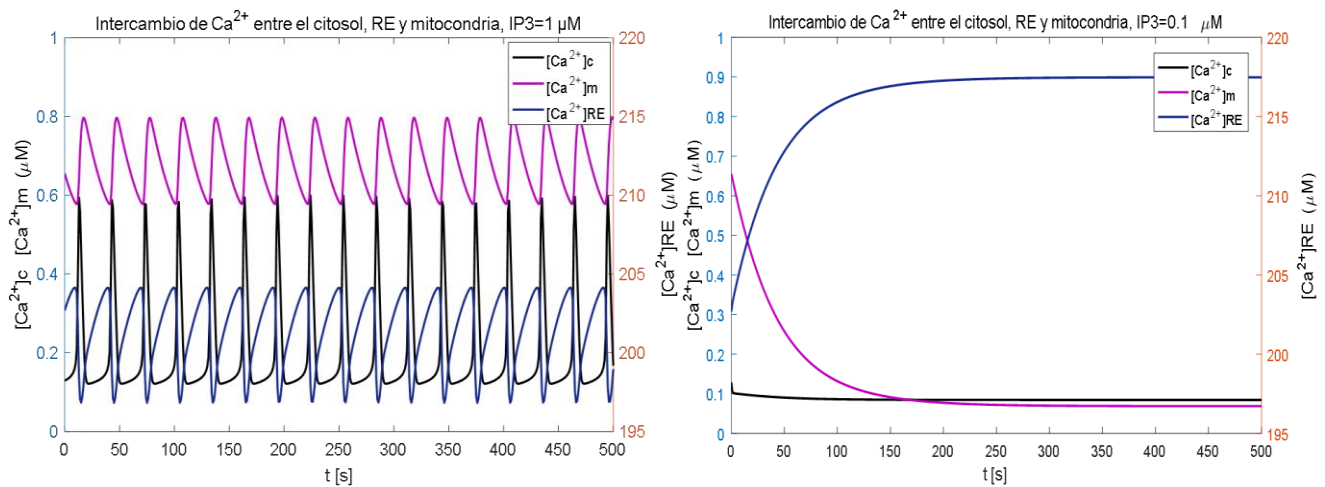


Figura.12.1. Dinámica del intercambio de Ca^{2+} entre el citosol, RE y mitocondria con $IP_3=1 \mu M$ y $0.1 \mu M$

La figura 12.2 muestra la región donde se compara un pico de Ca^{2+} en los tres compartimentos. En el tiempo 0 se considera la mínima concentración de Ca^{2+} en el citosol durante las oscilaciones sostenidas, a este tiempo, el Ca^{2+} comienza a incrementar tanto en el citosol como en el RE mientras que el Ca^{2+} mitocondrial va disminuyendo, por lo tanto la liberación de Ca^{2+} mitocondrial es el responsable de incrementar el Ca^{2+} citosólico lo que a su vez permite la reposición de Ca^{2+} en el RE, entonces el aumento de Ca^{2+} citosólico estimula al receptor IP_3 y el Ca^{2+} en el RE disminuye rápidamente. El Ca^{2+} mitocondrial disminuye a una región donde se presente un nuevo pico de Ca^{2+} en el citosol [39].

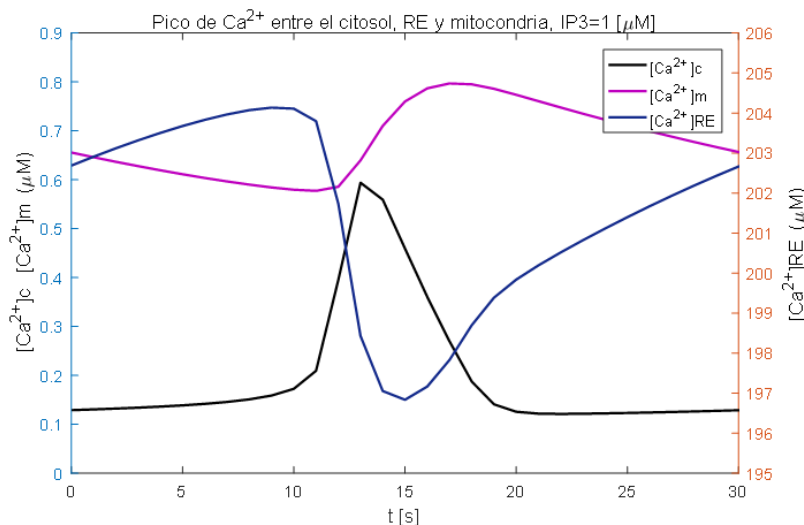


Figura.12.2. Región de un pico de Ca^{2+} en los tres compartimentos

A continuación se obtuvieron dinámicas de ATP mitocondrial y citosólico en respuesta a un pulso cuadrado de Ca^{2+} citosólico simulado de acuerdo a las observaciones experimentales con una amplitud de $1.5 \mu M$ por 10 s comparando cada una de ellas con la concentración de Ca^{2+} mitocondrial. La figura 12.3 muestra las dinámicas del ATP. Como se observa en las gráficas, el ATP mitocondrial y citosólico decrece cuando aparece el pulso de Ca^{2+} . Nótese que la dinámica del ATP está en contrafase al Ca^{2+} debido a que las bombas del transporte de Ca^{2+} necesitan energía para funcionar y esta energía es proveída por la hidrólisis del ATP, entonces hay un consumo de energía por parte de las bombas transportadoras de Ca^{2+} .

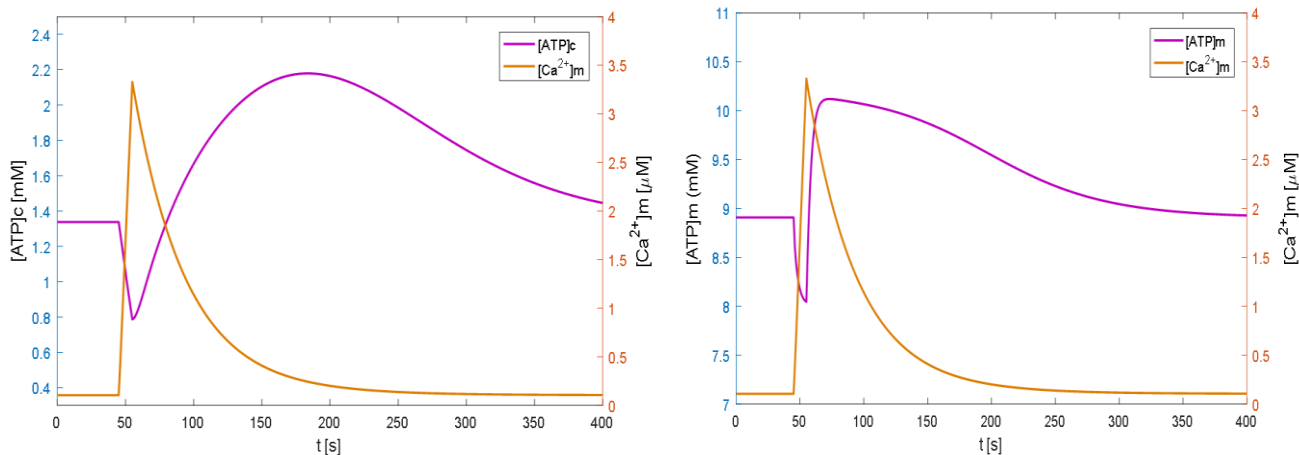


Figura.12.3. Dinámica del ATP mitocondrial y citosólico frente a un pico de Ca^{2+} citosólico

Estas dinámicas en contrafase han sido observadas en células alfa [19], por lo que el modelo propuesto en esta tesis describe adecuadamente el metabolismo mitocondrial de estas células.

13 Apéndice III: Implementación de modelos

Una ecuación diferencial es cualquier ecuación que contiene las derivadas de una o más variables dependientes con respecto a una o más variables independientes. Si una ecuación diferencial contiene únicamente derivadas ordinarias de una o más variables dependientes con respecto a una sola variable se dice que es una ecuación diferencial ordinaria (ODE por sus siglas en inglés, *ordinary differential equations*).

Para la implementación de los modelos antes descritos así como el modelo eléctrico-metabólico propuesto, se usó la rutina ode23 la cual resuelve ecuaciones diferenciales ordinarias con rigidez media. La rutina ode23 de Matlab es una implementación del método de Runge-Kutta explícito usando la aproximación propuesta por Bogacki y Shampine [24].

El algoritmo de Bogacki y Shampine es un método de Runge-Kutta de orden tres con cuatro etapas, por lo que utiliza tres evaluaciones de funciones por paso. Tiene un método de segundo orden incrustado que se puede usar para implementar un tamaño de paso adaptativo. Debido a su simplicidad, el ode23 elige el tamaño de paso adecuado. El "23" en el nombre de la rutina indica que están involucrados dos fórmulas simultáneas de un solo paso, una de segundo orden y otra de tercer orden [24].

Para el problema de valor inicial $\mathbf{y}' = \mathbf{f}(\mathbf{x}, \mathbf{y}), \mathbf{y}(\mathbf{x}_0) = \mathbf{y}_0$, el algoritmo de Bogacki y Shampine determina los valores aproximados de \mathbf{y}_k de la solución real en los puntos $\mathbf{x}_n = \mathbf{x}_0 + n\mathbf{h}, n = 0, 1, 2, \dots$; como se muestra a continuación.

$$\begin{aligned}
 k_1 &= f(x_n, y_n), \\
 k_2 &= f\left(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{h}{2}k_1\right), \\
 k_3 &= f\left(x_n + \frac{3h}{4}, y_n + \frac{3h}{4}k_2\right), \\
 y_{n+1} &= y_n + \frac{2}{9}hk_1 + \frac{1}{3}hk_2 + \frac{4}{9}hk_3, \\
 k_4 &= f(x_n + h, y_{n+1}), \\
 z_{n+1} &= y_n + \frac{7}{24}hk_1 + \frac{1}{4}hk_2 + \frac{1}{3}hk_3 + \frac{1}{8}hk_4
 \end{aligned}$$

donde z_{n+1} es una aproximación de segundo orden de la solución exacta.

En la figura 13.1 se muestra un algoritmo de la implementación del modelo eléctrico-metabólico, usando la rutina ode23 en Matlab.

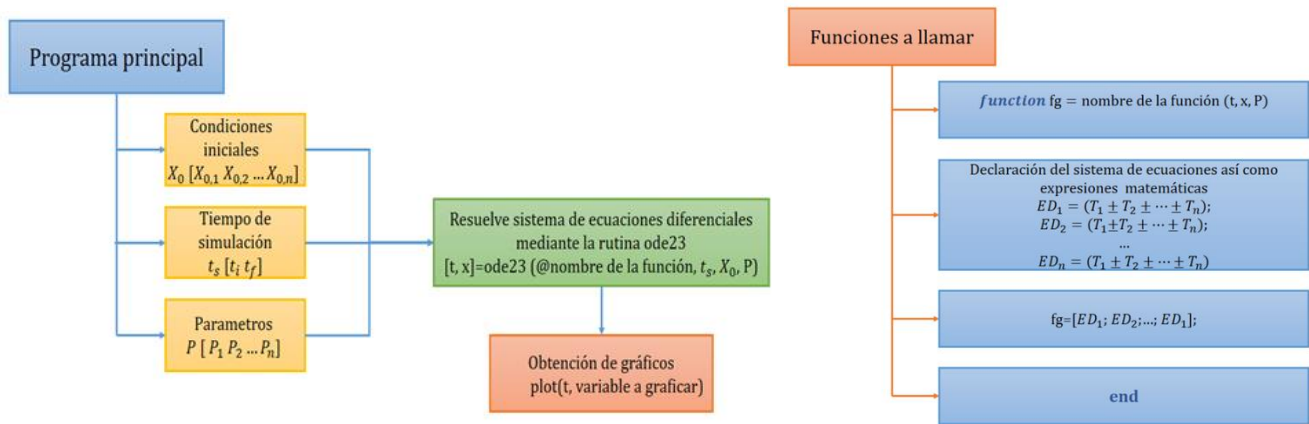


Figura 13.1. Diagrama de flujo que muestra la implementación del modelo matemático

14 Apéndice IV. Regla de Simpson 1/3 [25]

La regla de Simpson 1/3 es una técnica numérica que se utiliza para aproximar una integral definida (área bajo la curva) que no puede obtenerse analíticamente en un intervalo $[a, b]$

Suponiendo que $a = x_0 < x_1 < \dots < x_M = b$. Una ecuación del tipo

$$Q[f] = \sum_{k=0}^M \omega_k f(x_k) = \omega_0 f(x_0) + \omega_1 f(x_1) + \dots + \omega_M f(x_M) \quad (14.1)$$

de manera que se obtiene una integral conocida como integración numérica o de cuadratura, donde el término $E[f]$ es el error de truncamiento, los valores $\{x_k\}_{k=0}^M$ son los nodos de integración o nodos de cuadratura y los valores $\{\omega_k\}_{k=0}^M$ se llaman pesos. Los nodos $\{x_k\}$ se eligen de diferentes maneras, para la regla de Simpson 1/3 los nodos se toman equiespaciados.

$$\int_a^b f(x) dx = Q[f] + E[f] \quad (14.2)$$

La integración numérica o de cuadratura puede deducirse a partir de la interpolación polinomial, donde existe un único polinomio $P_M(x)$ de grado menor o igual que M que pasa por $M + 1$ puntos dados $\{(x_k, y_k)\}_{k=0}^M$ cuyas abscisas están equiespaciadas. Cuando se usa este polinomio para aproximar la función

$f(x)$ en $[a, b]$, de manera que $y_k = f(x_k)$, y luego aproximando a la integral $f(x)$ por la integral $P_M(x)$ se obtiene la fórmula de cuadratura de Newton-Cotes, donde será cerrada si el primer nodo $x_0 = a$ y el último nodo $x_M = b$. Si el polinomio de aproximación de grado $M = 2$, se obtendrá la regla de Simpson 1/3. Suponiendo que $x_k = x_0 + kh$ ($k = 0, 1, \dots, M$) son nodos equiespaciados y sea $f_k = f(x_k)$ para cada $k=0,1,\dots,M$, se tiene la siguiente expresión.

$$\int_{x_0}^{x_2} f(x) dx \approx \frac{h}{3} (f_0 + 4f_1 + f_2) \quad (14.3)$$

La expresión 14.3 es conocida como la regla de Simpson.