



Ittalo dos Santos Silva

**Avaliação de Estruturas de Transporte
Iônico na Sinalização de Ca^{2+} e Na^{+} em
um Sistema de Comunicação Molecular
entre Astrócitos**

João Pessoa – PB

Dezembro/2021



Ittalo dos Santos Silva

Avaliação de Estruturas de Transporte Iônico na Sinalização de Ca^{2+} e Na^{+} em um Sistema de Comunicação Molecular entre Astrócitos

Versão apresentada à banca examinadora para a Defesa da Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica do Instituto Federal da Paraíba, como requisito necessário à obtenção do grau de Mestre em Ciências no Domínio da Engenharia Elétrica.

Área de Concentração: Processamento de Sinais.

Carlos Danilo Miranda Regis, Prof. Dr.

Orientador

Michael Taynnan Barros, Ph.D.

Coorientador

João Pessoa - PB, 21 de Dezembro de 2021

© Ittalo dos Santos Silva – ittalosantoss@gmail.com

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba
Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica

**Avaliação de Estruturas de Transporte Iônico na Sinalização
de Ca^{2+} e Na^{+} em um Sistema de Comunicação Molecular
entre Astrócitos**

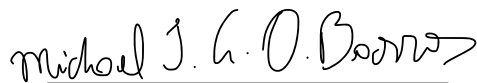
Ittalo dos Santos Silva

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 21 / 12 / 2021 .

Banca examinadora:

Prof. Carlos Danilo Miranda Regis, D.Sc.

Orientador (IFPB)



Michael Taynman Barros, D.Sc.

Coorientador (Universidade de Essex)

Professor Luiz Guedes Caldeira, D.Sc.

Membro da Banca (IFPB)



Prof. Waslon Terllizzie Araújo Lopes, D.Sc.

Membro da Banca (UFPB)

João Pessoa, Paraíba, Brasil

21 de Dezembro de 2021

©Ittalo dos Santos Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação – CIP
Biblioteca Nilo Peçanha – IFPB, *Campus* João Pessoa

A162a Silva, Ittalo dos Santos.
Avaliação de estruturas de transporte iônico na sinalização de Ca^{2+} e Na^{+} em um sistema de comunicação molecular / Ittalo dos Santos Silva. – 2021.
89 f. : il.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Instituto Federal da Paraíba – IFPB / Coordenação de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, 2021.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Danilo Miranda Regis.
Coorientador: Ph.D. Michael Taynnan Barros.
1. Engenharia elétrica. 2. Processamento de sinais. 3. Sistema de comunicação molecular. 4. Propagação de sinais moleculares. 5. Sinalização de cálcio. 6. Estruturas de Transporte. I. Título.
CDU 621.391

Ivanise Andrade M. de Almeida
Bibliotecária-Documentalista
CRB-15/0096

Resumo

Modelos computacionais que simulam a comunicação molecular entre células vivas são uma ferramenta de investigação valiosa, visto que a possibilidade de caracterizar a propagação de moléculas como sinais de informações tem viabilizado o desenvolvimento de novas soluções principalmente na área da biomedicina, como por exemplo, no tratamento de doenças do tecido nervoso. Nesse contexto, a propagação intracelular de moléculas de Ca^{2+} , conhecida como sinalização de Ca^{2+} , representa um mecanismo crucial na manutenção das atividades dos astrócitos, que são células que atuam no processamento de informações da região sináptica. Existem numerosos modelos na literatura que simulam a sinalização do Ca^{2+} em um tecido de astrócitos, no entanto, moléculas como o Na^+ e o K^+ desenvolvem um papel importante na homeostase dessas células através de estruturas de transporte iônico presentes na membrana plasmática, agregando maior robustez aos modelos computacionais. Diante disso, este trabalho desenvolveu um modelo computacional que simula um sistema de comunicação molecular em um tecido de astrócitos, considerando as reações das sinalizações do Ca^{2+} e do Na^+ , bem como algumas estruturas de transporte, como o canal trocador de Na^+ e Ca^{2+} , a bomba de Na^+ e K^+ e a bomba de Ca^{2+} , a fim de avaliar os efeitos destas na propagação intracelular do Ca^{2+} por meio de 4 métricas: capacidade do canal, taxa de erro de bit (BER), ganho de comunicação e relação sinal-ruído. Os novos modelos permitiram um aumento médio de cerca de 30% na concentração de Ca^{2+} no tecido, além de proporcionarem uma nova perspectiva para a análise da capacidade do canal, que se tornou inversamente proporcional à frequência em parte da banda analisada. O Na^+ e o K^+ interferiram indiretamente no sinal do sistema, contribuindo para um aumento de cerca de 0,05 para cerca de 0,35 no valor máximo da BER. Tais resultados mostram o impacto de diferentes modelos de reações nos algoritmos de simulação de sistemas moleculares e evidenciam a necessidade de levá-los em consideração.

Palavras-Chave: Sistema de Comunicação Molecular; Sinalização de Cálcio; Estruturas de Transporte Iônico; Propagação de Sinais Moleculares.

Abstract

Computational models that are able to simulate the molecular communication between living cells are a helpful tool for scientific research, since they create the possibility of representing molecular propagation as information signals, which allows the development of novel solutions mainly in the biomedicine field, for example, in the treatment of nervous tissue diseases. In this context, the propagation of Ca^{2+} molecules in the intracellular mean, known as Ca^{2+} signaling, represents the crucial mechanism to keep the activity of astrocytes, which are cells involved in the information processing at synaptic region. There are many models described in the literature that can simulate calcium signaling in the tissue of an astrocyte. However, molecules as sodium and potassium play an important role to these cells homeostasis through some ion transport structures inside plasma membrane, which brings more accuracy to the computational models. Therefore, this thesis developed a computational model able to simulate a molecular communication system in an astrocytic tissue, taking into account reactions from Ca^{2+} and Na^{+} signaling, as well as, from some ion transport structures, such as Sodium-Calcium Exchanger, Sodium-Potassium Pump and Calcium Pump, in order to evaluate the effects of these structures at the intracellular propagation of Ca^{2+} by analysing 4 metrics: channel capacity, bit error rate (BER), communication gain and signal-to-noise ratio. The new models increased the Ca^{2+} concentration in about 30%, in average, and also granted a new perspective for channel capacity analysis, which became inversely proportional to the frequency in part of the assessed frequency band. The Na^{+} and the K^{+} indirectly influenced the main signal of the system, increasing the maximum value of the BER from about 0,05 to about 0,35. Such results show the impact of different reaction models at the simulation algorithms for molecular systems and point out to the necessity of taking such models into account.

Keywords: Molecular Communication System; Calcium Signaling; Ion Transport Structures; Molecular Signals Propagation.

Lista de Siglas e Abreviaturas

- NCX – Canal Trocador de Sódio e Cálcio; do inglês, *Sodium/Calcium Exchanger*
- NKP – Bomba de Sódio e Potássio; do inglês, *Sodium Potassium Pump*
- CP – Bomba de Cálcio; do inglês, *Calcium pump*
- SNC – Sistema Nervoso Central
- GJ – Junções Comunicantes; do inglês, *Gap Junctions*
- HH – Estado Alto-Alto; do inglês, *High-High state*
- HL – Estado Alto-Baixo; do inglês, *High-Low state*
- LH – Estado Baixo-Alto; do inglês, *Low-High state*
- LL – Estado Baixo-Baixo; do inglês, *Low-Low state*
- Cx43 – *Connexin 43*
- Cx30 – *Connexin 30*
- Cx26 – *Connexin 26*
- GABA – Ácido γ -aminobutírico
- RE – Retículo Endoplasmático
- LB – Linha de Base
- BCSK – Modulação por Chaveamento de Concentração Binária; do inglês, *Binary Concentration Shift Keying Modulation*
- ATP – Adenosina trifosfato; do inglês, *adenosine triphosphate*
- ADP – Adenosina difosfato; do inglês, *adenosine diphosphate*
- SNR – Relação Sinal-Ruído; do inglês, *Signal-to-Noise Ratio*
- BER – Taxa de Erro de *Bit*; do inglês, *Bit Error Rate*
- RLC – Resistivo, capacitivo e indutivo

Lista de Símbolos

mM – Milimol

μM – Micromol

nM – Nanomol

Ca^{2+} – Cálcio

Na^+ – Sódio

K^+ – Potássio

Cl^- – Cloro

Pi – Grupo de fosfato presente no canal da bomba de Sódio e Potássio

p_{HH} – Probabilidade do estado aberto-aberto dos canais GJ

p_{LH} – Probabilidade do estado fechado-aberto dos canais GJ

p_{HL} – Probabilidade do estado aberto-fechado dos canais GJ

p_{LL} – Probabilidade do estado fechado-fechado dos canais GJ

IP_3 – Inositol trifosfato; do inglês, *Inositol trisphosphate* ou *inositol 1,4,5-trisphosphate*

$[Ca^{2+}]_i$ – Concentração intracelular de Cálcio ou concentração de Cálcio no citosol

$[Ca^{2+}]_o$ – Concentração extracelular de Cálcio

$[Na^+]_i$ – Concentração intracelular de Sódio ou concentração de Sódio no citosol

$[Na^+]_o$ – Concentração extracelular de Sódio

$[K^+]_i$ – Concentração intracelular de Potássio ou concentração de Potássio no citosol

$[K^+]_o$ – Concentração extracelular de Potássio

Tx – Transmissor

Rx – Receptor

τ – Tempo da reação

p_r – Probabilidade de ocorrência da reação

δ – Delta de Dirac que simboliza a função de impulso

σ_0 – Limiar de concentração de cálcio para a modulação e demodulação

Υ_{TxRx} – Resposta ao impulso do sistema para um canal definido como uma distribuição *Gamma*

H_{TxRx} – Variável aleatória referente à probabilidade da propagação de um *bit*

Lista de Figuras

2.1	Classificação dos astrócitos quanto à morfologia e à localização.	10
2.2	Dinâmica dos astrócitos nas comunicações intercelulares de um SNC saudável.	11
2.3	Localização dos canais GJ.	12
2.4	Estruturas e estados dos canais GJ.	13
2.5	Sistema de comunicação baseado em Sinalização de Ca^{2+}	16
2.6	Plano de um tecido tridimensional de astrócitos, com suas reações internas e o processo de difusão pelos canais GJ.	18
2.7	Aumento de $[\text{Na}^+]_i$ após estímulo com glutamato.	20
2.8	Aumento de $[\text{Na}^+]_i$ após estímulo com GABA. Imagem aproximada de astrócito com concentração de Na^+ (branco) à esquerda.	21
2.9	Mecanismos que atuam na homeostase do Na^+ nos astrócitos.	23
3.1	Princípio básico de operação do NCX, da NKP e da CP em uma célula hipotética de formato cilíndrico.	25
3.2	Funcionamento da Bomba de Na^+/K^+	28
3.3	Esquema do ciclo de reação da CP.	31
4.1	Fluxograma básico do modelo computacional.	33
4.2	Diagrama de blocos da análise do sistema de comunicação.	34
4.3	Sistema de comunicação molecular desenvolvido.	36
4.4	Plano de propagação e modulação do sinal.	40
5.1	Comportamento do sinal e do ruído ao longo do tempo de simulação.	48
5.2	Análise da SNR por número de reações do NCX.	49
5.3	Ganho de comunicação médio por número de reações do NCX.	50

5.4	Relação Sinal-Ruído por T_b para as composições do canal que consideram as estruturas de transporte iônico.	51
5.5	Taxa de Erro de Bit por T_b para cada combinação dos modelos de reações. . . .	53
5.6	Capacidade do canal por T_b para cada combinação dos modelos de reações. . .	55
5.7	Ganho de comunicação por T_b para cada combinação dos modelos de reações. .	56
5.8	Comparação dos resultados por composição do canal para cada métrica de avaliação.	58

Lista de Tabelas

2.1	Valores dos parâmetros envolvidos no modelo de sinalização de Ca^{2+} extraídos do trabalho de Barros <i>et al.</i> (2015a).	19
3.1	Parâmetros para o cálculo do fluxo iônico do NCX (Koenigsberger <i>et al.</i> , 2004a)	27
3.2	Constantes utilizadas para o modelo de reações da bomba de Na^+/K^+ (Clarke <i>et al.</i> , 1989).	30
4.1	Reações por modelo que podem ocorrer em cada astrócito.	38
4.2	Parâmetros de entrada e algumas variáveis de destaque do modelo.	45
5.1	Descrição do sistema de chaves para representação da composição do canal escolhida.	47

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Motivação	3
1.2	Estado da Arte	4
1.3	Objetivo Geral	6
1.3.1	Objetivos Específicos	7
1.4	Estrutura do Texto	7
2	Sistema de Comunicação Molecular baseado em Sinalização de Cálcio e Sódio	9
2.1	Astrócitos	9
2.1.1	Excitabilidade dos astrócitos	11
2.1.2	Junções comunicantes (<i>Gap Junctions</i>)	12
2.2	Modelo de Sinalização de Ca^{2+}	15
2.2.1	Modelagem matemática da sinalização de Ca^{2+}	16
2.3	Modelo de Sinalização de Na^+	19
2.3.1	Sinais de sódio na rede de astrócitos	21
2.3.2	Homeostase do sódio	22
3	Modelagem das Estruturas de Transporte Iônico da Membrana Plasmática	24
3.1	Canal Trocador de Na^+ e Ca^{2+}	24
3.1.1	Fluxo Iônico do NCX	26
3.2	Bomba de Na^+ e K^+	27
3.3	Bomba de Ca^{2+}	30
4	Metodologia	32
4.1	Metodologia do algoritmo proposto	32
4.2	Algoritmo de simulação estocástica	37

4.3	Modulação e detecção	39
4.4	Cálculo das métricas de avaliação	42
5	Resultados e Discussões	46
5.1	Determinação do número de reações do NCX	47
5.2	Análise da relação sinal-ruído	51
5.3	Análise da taxa de erro de Bit	52
5.4	Análise da capacidade do canal	54
5.5	Análise do ganho de comunicação	56
5.6	Comparação entre composições dos canais	57
6	Conclusões	60
6.1	Trabalhos Futuros	61
	Referências Bibliográficas	77

Na última década, devido ao crescente interesse na Internet das Bionanocoisas, que é um paradigma no qual bionanodispositivos são usados para carregar informações, atuando no controle da homeostase de sistemas biológicos (Akyildiz *et al.*, 2012; Büther *et al.*, 2017), muitos trabalhos foram desenvolvidos a fim de entender os sistemas de comunicação em tecidos vivos e proporcionar um modelo de análise com diferentes moléculas portadoras de informação (Borges *et al.*, 2020), tais como o DNA (Bilgin *et al.*, 2018), o cálcio (Barros & Dey, 2017a), as células do sangue (Chahibi *et al.*, 2013) e bactérias (Egan *et al.*, 2018). Tais estudos apresentam o objetivo final de promover base técnica para, por exemplo, o desenvolvimento de sensores biomoleculares e o mapeamento detalhado e até o controle da propagação de drogas nesses sistemas (Nakano *et al.*, 2018; Palop *et al.*, 2010).

Nesse contexto, a propagação intercelular de moléculas de cálcio, conhecida como sinalização de Ca^{2+} , possui um importante papel na excitabilidade elétrica das células do sistema nervoso central, tais como os astrócitos (Lallouette *et al.*, 2019), que atuam nas transmissões sinápticas e no processamento de informações pelos circuitos neurais, mas não são capazes de gerar potenciais de ação por si mesmos (Verkhratsky & Kettenmann, 1996). Nos tecidos de astrócitos, os sinais de cálcio gerados nas células se propagam por difusão em forma de ondas intercelulares, que fazem com que as atividades sinápticas causadas pelo Ca^{2+} aconteçam não apenas em diferentes regiões da mesma célula, mas também em células vizinhas, resultando na potencialização dessa propagação (Lallouette *et al.*, 2019). Desse modo, o Ca^{2+} pode ser apontado como um dos íons mais importantes dentre os presentes nos tecidos neurais.

No entanto, também é importante levar em consideração a presença de outro íon que possui um número significativo de transientes que influenciam as atividades neurais: o sódio (Rose & Chatton, 2016). Nos astrócitos, comparado ao Ca^{2+} , o Na^+ tem maiores valores de concentrações intracelulares e extracelulares, na ordem de *mM* (milimol), enquanto os valores do primeiro não excedem a ordem de *nM* (nanomol), diferindo também nos padrões

espaciais e temporais característicos de suas sinalizações (Kirischuk *et al.*, 2012). A dinâmica das variações na concentração de Na^+ no citosol (sinal de Na^+) afeta consideravelmente o comportamento das demais moléculas, desencadeando um processo definitivo para a homeostase das células da astroglia, processo pelo qual os astrócitos tendem a se manter em equilíbrio iônico (Parpura & Verkhratsky, 2012b). Assim, a consideração da contribuição das sinalizações de Ca^{2+} e de Na^+ nos modelos computacionais de comunicação molecular permite aumentar a precisão do processo de transporte iônico entre os astrócitos durante a simulação, uma vez que também possibilita a implementação de estruturas reguladoras que fomentam o controle das concentrações dessas moléculas através da membrana (Brazhe *et al.*, 2018).

A composição iônica interna da célula é preservada devido ao fato de que a membrana plasmática possui uma permeabilidade seletiva de pequenas moléculas (Lodish *et al.*, 2000). Muitas dessas moléculas não são capazes de transpassar a dupla camada fosfolipídica da membrana, visto que esta forma uma barreira que bloqueia a livre troca de moléculas entre o citoplasma - meio intracelular - e o ambiente externo da célula, ou meio extracelular (Cooper, 2000). Desse modo, proteínas específicas atuam como mediadoras no transporte seletivo desses íons através da membrana, permitindo que a célula controle o nível de concentração dessas moléculas no citosol (Alberts *et al.*, 2002).

Dentre as proteínas presentes na membrana plasmática, destacam-se o canal trocador de sódio e cálcio (NCX), a bomba de sódio e potássio (NKP) e a bomba de cálcio (CP), que juntos correspondem a três dos principais reguladores eletroquímicos das células (Shattock *et al.*, 2015; Blaustein *et al.*, 2002). O primeiro é um canal proteico que transmite íons de Ca^{2+} para dentro ou para fora da célula, trocando por moléculas de Na^+ (Brazhe *et al.*, 2018) e, portanto, possui um importante papel no controle dos níveis de concentração extracelular e intracelular desses íons, de modo que múltiplos processos que dependem diretamente da sinalização dessas moléculas não sejam ativados aleatoriamente e simultaneamente (Blaustein & Lederer, 1999).

O segundo é responsável pelo transporte ativo transmembranal de Na^+ e K^+ , utilizando a Adenosina Trifosfato (ATP) como fonte de energia primária para a permutação dessas moléculas (Pivovarov *et al.*, 2019). Além disso, a bomba de Na^+/K^+ assume uma operação fundamental no balanço osmótico, no controle do volume da célula e no estabelecimento dos potenciais que formam a tensão de membrana (Castillo *et al.*, 2015). O K^+ , por sua vez, é um mineral essencial para o funcionamento elétrico da célula e, junto com o Na^+ , mantém o equilíbrio da água e do ácido-base no sangue e nos tecidos (Kowey, 2002).

Finalmente, a bomba de Ca^{2+} é outra proteína presente na membrana plasmática responsável pela remoção do Ca^{2+} do citosol para o meio extracelular, sendo considerado uma estrutura vital para a regulação da concentração desse íon nas células eucarióticas (Jensen *et al.*, 2004). A CP também recorre à hidrólise do ATP como principal fonte energética (Brady *et al.*, 2011) e funciona juntamente com o NCX na manutenção do gradiente eletroquímico do Ca^{2+} ao longo da membrana, sendo o NCX de alta capacidade de transporte iônico, porém de baixa afinidade com o Ca^{2+} , enquanto a bomba de Ca^{2+} possui baixa capacidade de transporte e alta afinidade (Brini & Carafoli, 2011).

Este trabalho realizou um estudo sobre os principais processos biológicos e físicos que compõem as sinalizações de Ca^{2+} e de Na^+ , o qual permitiu desenvolver um modelo computacional de um sistema de comunicação molecular entre astrócitos. Tal modelo levou em consideração a variabilidade dos processos baseados em difusão por intermédio de um algoritmo estocástico desenvolvido a partir do trabalho de Barros *et al.* (2018), que também possibilitou a implementação das reações das três principais estruturas de transporte iônico presentes na membrana plasmática: o canal trocador de sódio e cálcio (NCX), a bomba de sódio e potássio (NKP) e a bomba de cálcio (CP), fundamentais para o processo da homeostase dos astrócitos, a fim de garantir maior precisão na transmissão de informações entre as células da glia (Zhong *et al.*, 2001; Regehr, 1997).

1.1 – Motivação

A investigação desenvolvida por este trabalho permite ampliar os estudos presentes na literatura sobre modelos computacionais de sistemas de comunicação molecular baseados unicamente em sinalização de Ca^{2+} , tornando-os mais robustos à medida em que considera a influência de outras moléculas e estruturas iônicas essenciais para o processo da propagação de informações entre os astrócitos, bem como proporciona uma análise relevante a respeito da comunicação celular em sistemas biológicos neurais, a fim de proporcionar uma base teórica incipiente para o entendimento sobre a propagação de substâncias entre células, além de fomentar o desenvolvimento da pesquisa dentro do campo da bionanotecnologia.

As principais contribuições do trabalho são:

- ▣ Desenvolvimento de um **sistema de comunicação molecular entre astrócitos** baseado em **sinalização de Ca^{2+}** e em **sinalização de Na^+** ;

- ▣ Avaliação dos **efeitos das estruturas de transporte iônico (NCX, NKP e CP)** sobre o modelo de comunicação molecular;
- ▣ Análise do modelo computacional de um sistema de comunicação molecular em termos de **ganho de comunicação, capacidade do canal, taxa de erro de bit (BER) e relação sinal-ruído (SNR)**.

1.2 – Estado da Arte

Os estudos sobre o papel do cálcio na comunicação entre células da astroglia foram intensificados a partir de 1994, quando as técnicas de imagem permitiram a detecção dos sinais de Ca^{2+} que atuam nos neurotransmissores (Nedergaard, 1994). Desde então, esse íon vem sendo entendido como o principal agente na comunicação entre astrócitos e nos demais tecidos (Verkhratsky & Kettenmann, 1996; Lallouette *et al.*, 2019; Robb-Gaspers & Thomas, 1995; Halidi *et al.*, 2011).

Barros *et al.* (2015b) realizaram um estudo comparativo dos processos difusivos do Ca^{2+} nos tecidos epitelial e muscular liso, tomando como base a metodologia descrita nos trabalhos de Koenigsberger *et al.* (2004b) e Parthimos *et al.* (1999), mas a principal contribuição de Barros *et al.* (2015b) nesta dissertação foi a análise da comunicação entre astrócitos baseada na difusão através de *gap junctions* (Kumar & Gilula, 1996; Bukaukas *et al.*, 2013), na qual, foi observada a influência da dinâmica espacial-temporal da concentração de Ca^{2+} no processo de sinalização intracelular, no atraso da difusão molecular, no ganho de comunicação e na capacidade do canal. Embora a rede de comunicação entre os astrócitos tenha apresentado uma distribuição mais uniforme da concentração de Ca^{2+} nas células em relação aos demais tecidos, também retornou menor ganho de comunicação, entre -65 dB a -88 dB, menor capacidade do canal para as menores distâncias entre Tx e Rx ($< 0,025$ bits).

Barros *et al.* (2018) implementaram um modelo computacional com o propósito de entender como uma rede de astrócitos baseada em sinalização de Ca^{2+} regula seus níveis de concentração em um tecido saudável e em um tecido afetado pela doença de Alzheimer, a fim de avaliar, em termos de ganho de comunicação, atraso molecular e alcance de propagação, os efeitos da dinâmica de propagação das placas de β -amiloide¹ em diferentes topologias da rede (Lallouette *et al.*, 2014). Os valores do ganho do canal obtidos para a topologia de grau

¹Principal peptídeo presente nas placas de amiloide observadas no cérebro de pacientes com Alzheimer (Hardy & Selkoe, 2002)

regular variaram de cerca de -22 dB para cerca de -35 dB, no tecido saudável, enquanto que houve uma variação de -25 dB para -50 dB no tecido patológico. No entanto, ambos decresceram exponencialmente ao longo do canal de comunicação.

Nenhum desses trabalhos considerou a influência da sinalização de Na^+ , cujas reações homeostáticas possuem um papel fundamental no desenvolvimento de diversas funções das células do sistema nervoso central (Parpura & Verkhratsky, 2012b; Rose & Karus, 2013; Chatton *et al.*, 2016). Segundo Kirischuk *et al.* (2016), nos neurônios, a geração dos potenciais de ação² requer uma grande concentração iônica de Na^+ , enquanto que o estímulo dos astrócitos oriundos dos neurotransmissores aumenta consideravelmente a concentração desse íon no citosol ($[\text{Na}^+]_i$). Além disso, os transientes de $[\text{Na}^+]_i$ também sofrem influência dos receptores ionotrópicos de glutamato, das células da glia de Bergmann e dos astrócitos do hipocampo, fomentando a propagação e o transporte de moléculas entre as células e através da membrana (Kirischuk *et al.*, 2012; Deitmer & Rose, 2010; Rose & Ransom, 1996; Kirischuk *et al.*, 2007, 1997).

As concentrações de sódio e de cálcio no citosol dos astrócitos são reguladas, fundamentalmente, por difusão através dos canais de transporte iônico presentes na membrana plasmática, como o Canal Trocador de Sódio e Cálcio (NCX), a Bomba de Sódio e Potássio (NKP) e a Bomba de Cálcio (CP) (Parpura & Verkhratsky, 2012b; Kirischuk *et al.*, 2012). Brazhe *et al.* (2018) investigaram a atuação da sinalização de sódio nos processos perisinápticos dos astrócitos (Ghézali *et al.*, 2016) mediados pela sinalização de cálcio através da operação do NCX. Esse trabalho indicou que a ação de um pulso de $[\text{Na}^+]_i$ de curta duração no sistema de comunicação, através do NCX, pode prolongar e amplificar o sinal intercelular de Ca^{2+} (variações na concentração intracelular de Ca^{2+}) de forma não-linear em até $0,1 \mu\text{M}$ (micromol), aproximadamente, dependendo da amplitude dos transientes de Na^+ (15 mM - 35 mM).

A bomba de Na^+/K^+ foi investigada por Castillo *et al.* (2015), que realizaram uma análise sobre seu princípio de funcionamento com o propósito de caracterizar as correntes iônicas oriundas dos transientes de K^+ (Alle *et al.*, 2009; Carter & Bean, 2009), bem como as propriedades das reações químicas e da cinética associadas à passagem desse íon por entre as paredes da bomba, em comparação com o íon de Na^+ . Usando um circuito grampo de tensão de alta velocidade e axônios de lulas gigantes, os autores foram capazes de caracterizar as ligações

²Pulsos elétricos responsáveis por inverter o potencial elétrico da membrana plasmática.

iônicas envolvendo o transporte de 1 mM de K^+ extracelular, observando o comportamento da carga de relaxação³ e descobriram que, de fato, os sinais elétricos causados pelo movimento ordenado dos íons de K^+ através da bomba são menores em amplitude (cerca de 5 vezes) e mais rápidos (≈ 10 vezes).

Já Reyes *et al.* (2012) avaliaram o controle de $[Na^+]_i$ e $[Ca^{2+}]_i$ (concentrações intracelulares de sódio e cálcio, respectivamente) mediante a atuação do NCX, da NKP e da Bomba de Ca^{2+} em astrócitos do córtex de ratos em dois estados: repouso e estimulado, a fim de entender a influência primária desses sinais na transmissão de glutamato e no controle da sinalização metabólica das células da glia (Paluzzi *et al.*, 2007). Os autores chegaram à conclusão de que as três estruturas de transporte são agentes elementares na homeostase dos íons de Na^+ e Ca^{2+} em ambos os estados, sendo a CP o principal emissor de Ca^{2+} para o meio extracelular, enquanto que o NCX é o mais relevante na introdução desse íon no citosol e a NKP assumindo a predominância na elevação do sinal extracelular de Na^+ ($[Na^+]_o$).

Este trabalho propõe levar em consideração as vantagens da adição da sinalização de Na^+ ao sistema de comunicação entre astrócitos desenvolvido por Barros *et al.* (2015b), bem como, das reações oriundas do NCX, da NKP e da CP, aumentando a complexidade dos modelos computacionais de comunicação molecular baseados unicamente em sinalização de Ca^{2+} presentes na literatura. Além disso, os desafios e as implicações da implementação dessas estruturas e a avaliação do desempenho geral do sistema, em termos de ganho de comunicação, taxa de erro de bit, capacidade do canal e relação sinal-ruído, também constituem o propósito do presente trabalho, cujas seções estão divididas conforme descrito na Seção 1.4.

1.3 – Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é desenvolver um algoritmo que permita a simulação de um sistema de comunicação molecular entre astrócitos baseado nas sinalizações de Cálcio e de Sódio, considerando a influência do Canal Trocador de Na^+ e Ca^{2+} (NCX), da Bomba de Na^+ e K^+ (NKP) e da Bomba de Ca^{2+} (CP) sobre a propagação do sinal de Ca^{2+} pelo meio, a fim de agregar maior robustez aos modelos computacionais presentes na literatura, ao mesmo tempo em que aumenta a complexidade, apropriando-se de estruturas e conceitos biológicos reais.

³Carga iônica necessária para um sistema voltar ao estado de equilíbrio (Robinson, 2002).

1.3.1 – Objetivos Específicos

- ▣ Promover um estudo sobre os modelos computacionais de comunicação molecular entre astrócitos baseados nas sinalizações de Ca^{2+} e Na^+ presentes na literatura;
- ▣ Esclarecer as principais diferenças entre o sistema a ser implementado e o sistema de comunicação baseado unicamente em sinalização de Ca^{2+} ;
- ▣ Apresentar as implicações biológicas e as metodologias matemáticas que envolvem a sinalização de Na^+ e as reações do NCX, da NKP e da CP, bem como o princípio de funcionamento dessas estruturas;
- ▣ Implementar o modelo computacional para o sistema de comunicação molecular proposto, incluindo os processos de modulação, transmissão, propagação, detecção e recepção do sinal entre os astrócitos;
- ▣ Implementar os modelos matemáticos para as reações das sinalizações de Na^+ e Ca^{2+} , que constituem o sistema de comunicação;
- ▣ Implementar os modelos matemáticos para as reações do Canal Trocador de Na^+ e Ca^{2+} , da Bomba de Na^+ e K^+ e Bomba de Ca^{2+} , que constituem o sistema de comunicação;
- ▣ Avaliar o sistema de comunicação implementado após a simulação da propagação de Na^+ e Ca^{2+} no tecido de astrócitos com base nas métricas: ganho de comunicação, taxa de erro de bit (BER), capacidade do canal e relação sinal-ruído (SNR).

1.4 – Estrutura do Texto

Esta dissertação de mestrado está dividida em seis capítulos, que compreendem a exposição dos conceitos e princípios relativos à fundamentação teórica do trabalho, a metodologia aplicada para o desenvolvimento do mesmo, os resultados obtidos, suas respectivas discussões e as conclusões finais do trabalho.

Além do capítulo introdutório, o segundo capítulo abrange a descrição das principais características dos astrócitos e as particularidades físicas e biológicas das sinalizações de sódio e cálcio. O Capítulo 3, por sua vez, apresenta a modelagem e o princípio de funcionamento das estruturas de transporte iônico, bem como as implicações mais relevantes no sistema de comunicação.

O quarto capítulo elucidada o raciocínio e os métodos matemáticos empregados na implementação do sistema de comunicação molecular proposto, como o algoritmo estocástico de Gillespie (1977), o processo de modulação e demodulação do sinal e o cálculo das métricas de avaliação.

Finalmente, o Capítulo 5 descreve os resultados obtidos para o modelo computacional desenvolvido, além de apresentar as discussões de acordo com os objetivos propostos. No Capítulo 6, são apontadas, então, as conclusões do trabalho, bem como algumas propostas para trabalhos futuros.

Sistema de Comunicação Molecular baseado em Sinalização de Cálcio e Sódio

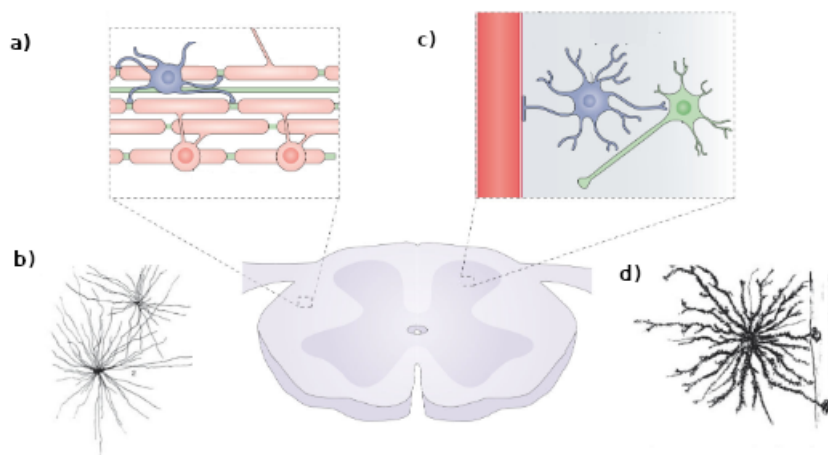
Neste capítulo, são apresentados os conceitos e as interações dos sistemas biológicos nos astrócitos (Seção 2.1) e na comunicação molecular baseada em sinalização de Ca^{2+} (Seção 2.2) e em sinalização de Na^+ (Seção 2.3), bem como a modelagem e as implicações matemáticas dessas sinalizações sobre o modelo computacional proposto.

2.1 – Astrócitos

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes e mais diversificadas que compõem o sistema nervoso central (SNC). Como unidades integrantes do tecido neural, eles exercem uma variedade de funções complexas essenciais à saúde do SNC, incluindo sua participação na manutenção da homeostase energética, na sinaptogênese (processo de formação das sinapses) e na plasticidade sináptica (Allaman *et al.*, 2011; Hamilton & Attwell, 2010; Allen, 2014). Essas células possuem um corpo arredondado e numerosas ramificações e são classificadas quanto à morfologia e à localização em dois subgrupos: astrócitos protoplasmáticos e astrócitos fibrosos (Haim & Rowitch, 2017), ilustrados na Figura 2.1.

As Figuras 2.1 **a)** e 2.1 **b)** mostram a localização no tecido e a morfologia dos astrócitos protoplasmáticos, respectivamente, que estão presentes em toda a substância cinzenta do cérebro e suas extensões curtas dão origem a ramificações finas distribuídas em uma configuração globoide uniforme, que os permitem se envolver nos processos sinápticos (Sofroniew & Vinters, 2010). Já os astrócitos fibrosos, cuja localização e morfologia estão ilustrados nas Figuras 2.1 **c)** e 2.1 **d)**, respectivamente, predominam na substância branca do cérebro e possuem extensões radiais longas e delgadas, orientadas longitudinalmente no plano dos feixes de axônios, com os quais fazem contato através dos nós de Ranvier, que são

Figura 2.1 – Classificação dos astrócitos quanto à morfologia e à localização. **a)** Localização dos astrócitos protoplasmáticos. **b)** Morfologia dos astrócitos protoplasmáticos. **c)** Localização dos astrócitos fibrosos. **d)** Morfologia dos astrócitos fibrosos.



Fonte: Adaptada de Haim & Rowitch (2017)

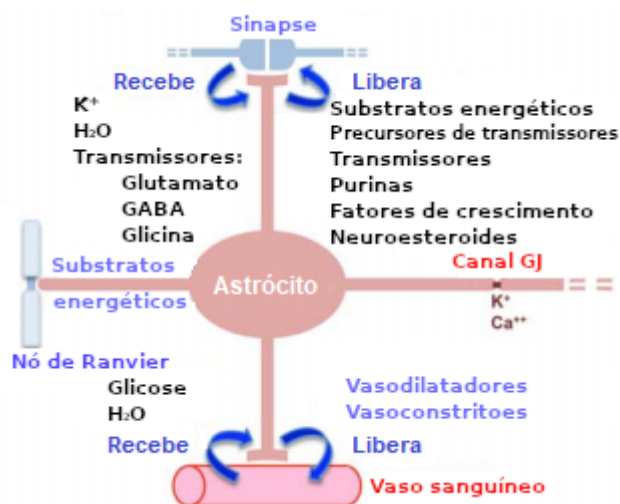
os pontos de descontinuidade (estrangulamento) da bainha de mielina (Sofroniew & Vinters, 2010). Apesar das discrepâncias, os dois subtipos de astrócitos estão extensivamente conectados aos vasos sanguíneos, onde ocorre uma transferência de moléculas e íons do sangue para os neurônios, assim como ambos são capazes de se comunicar através de canais operados por tensão em processos distais de astrócitos vizinhos (Peters, 1991).

De forma geral, os astrócitos podem ser vistos como nanomáquinas-chave do SNC que interagem com outros elementos e processos em um sistema de comunicação bidirecional. Estima-se que um astrócito possa estar simultaneamente conectado com oito corpos celulares de neurônios, cinco vasos sanguíneos e mais de 100.000 sinapses (Bushong *et al.*, 2002; Ogata & Kosaka, 2002). A Figura 2.2 esquematiza a atuação dos astrócitos em um SNC saudável.

Entre as principais funções dos astrócitos estão (Parpura & Verkhratsky, 2012c; Parpura *et al.*, 2012; Parpura & Verkhratsky, 2012a):

- ▀ A definição da microanatomia cerebral. Os astrócitos dão suporte estrutural a outros elementos do SNC, atuando ainda no desenvolvimento das substâncias branca e cinza;
- ▀ A produção e estocagem de substratos metabólicos, como o glicogênio e a lactase, provendo sustento para uma atividade neural intensa ou durante uma hipoglicemia;
- ▀ O controle da homeostase e do *turnover* (taxa de renovação) de neurotransmissores e neuromoduladores, como o glutamato e a adenosina;

Figura 2.2 – Dinâmica dos astrócitos nas comunicações intercelulares de um SNC saudável.



Fonte: Adaptada de Sofroniew & Vinters (2010)

- ▣ A regulação da conectividade sináptica a partir de sinais moleculares, desde sua formação e manutenção até a marcação para sua eliminação;
- ▣ A modulação do fluxo sanguíneo em função do nível de atividade neural.

2.1.1 – Excitabilidade dos astrócitos

Os astrócitos pertencem à astrogliia, um grupo de células neurais não excitáveis, ou seja, que não conseguem produzir potenciais de ação, devido, principalmente, às baixas densidades dos canais iônicos operados por tensão (Verkhratsky & Kettenmann, 1996). Por esse motivo, essas células se utilizam das sinalizações intercelulares, de forma que os gradientes iônicos interagem com os mecanismos de transporte, desencadeando as reações químicas que atuam primariamente como elementos homeostáticos controlados por variações na concentração citoplasmática de dois principais íons: o Ca²⁺ e o Na⁺ (Parpura & Verkhratsky, 2012b).

As células da glia, especialmente os astrócitos, são fisicamente conectados entre si por intermédio de canais intercelulares conhecidos como junções comunicantes, por onde as moléculas de Ca²⁺ e Na⁺ são difundidas (Houades *et al.*, 2008). Essas junções, que são explicadas mais detalhadamente na Subseção 2.1.2, promovem um caminho bem definido para as sinalizações de longa distância, que se manifestam em ondas iônicas ou metabólicas propagadas por difusão (Parpura & Verkhratsky, 2012b).

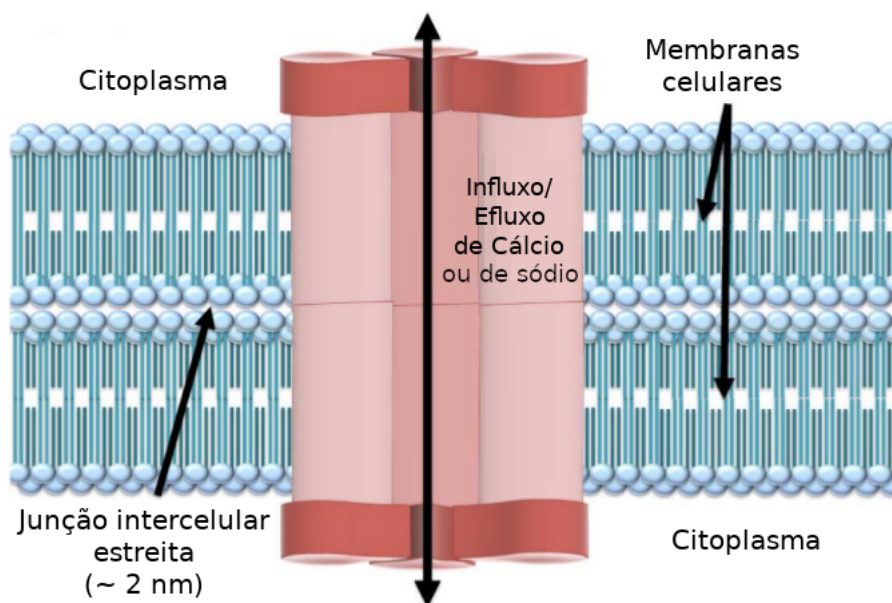
É verdade que esse tipo de comunicação é mais lenta em relação à difusão causada por potenciais de ação, visto que a transmissão de moléculas de Ca²⁺ nesses canais de junção,

por exemplo, é de cerca de 20–40 $\mu\text{m/s}$, mas, por outro lado, a propagação se torna mais diversificada, uma vez que se integra à sinalização entre células (Guthrie *et al.*, 1991). No entanto, embora a comunicação baseada em junções comunicantes contribua para a sinalização dessas moléculas, são as reações que as liberam para o meio extracelular dos astrócitos, como as baseadas em ATP (Adenosina Trifosfato), que dão o suporte majoritário para a disseminação iônica em todo o tecido (Stout *et al.*, 2002).

2.1.2 – Junções comunicantes (*Gap Junctions*)

As junções comunicantes, ou canais GJ, são uma espécie de válvulas físicas que conectam os meios intracelulares de duas células adjacentes, cruzando suas membranas plasmáticas com um canal estreito (na ordem de 2 a 2,5 nm), por onde são transportados os íons nas sinalizações moleculares, estabelecendo a comunicação entre as células (Kumar & Gilula, 1997; Kilinc & Akan, 2013a), como pode ser observado na Figura 2.3.

Figura 2.3 – Localização dos canais GJ.



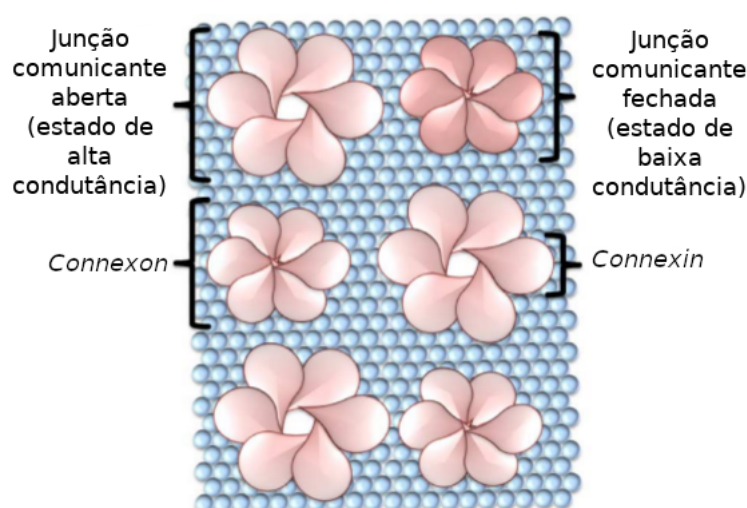
Fonte: Adaptada de Barros *et al.* (2015b).

As junções comunicantes são formadas por duas estruturas tubulares alinhadas, uma em cada membrana, e integralmente conectadas entre si, chamadas de *connexons* (Dermietzel, 1998). Cada *connexon* possui, em sua extremidade que faz contato com o citosol da célula, cerca de seis elementos menores responsáveis pela permissão ou não da passagem do fluido, conhecidas como *connexins* (Baigent *et al.*, 1997a). Os canais GJ são encontrados nos tecidos

de células animais com diferentes configurações, de modo que a distribuição dos *connexins* possui um impacto fundamental no comportamento da difusão molecular (Kumar & Gilula, 1996).

As sinalizações de Ca^{2+} e Na^{2+} influenciam diretamente a ativação das junções comunicantes, visto que estas são canais controlados por tensão, pois as oscilações frequentes das concentrações desses íons e o fluxo iônico gerado na difusão dessas moléculas entre as células provocam essa influência (Barros *et al.*, 2015b). Desse modo, esse tipo de difusão só ocorre quando ambos os *connexons* estão abertos, ou seja, dependendo dos estados de seus *connexins*, que podem assumir dois estados de condutância cada um: aberto, com alta condutância e fechado, com baixa condutância (Kilinc & Akan, 2013a; Baigent *et al.*, 1997a), como ilustrado na Figura 2.4.

Figura 2.4 – Estruturas e estados dos canais GJ.



Fonte: Adaptada de Barros *et al.* (2015b).

Os astrócitos possuem 3 principais tipos de *connexins*: Cx43 (*connexin* 43), Cx30 e Cx26 (Bukaukas *et al.*, 2013). Utilizando Cx43 para os astrócitos, Baigent *et al.* (1997b) e Kilinc & Akan (2013a) sugeriram um modelo estocástico para os canais GJ baseado em quatro combinações básicas dos possíveis estados de cada *connexin* dos *connexons*. Considerando duas células vizinhas (1 e 2), tem-se:

- ▣ Estado HH: quando ambos os *connexins* estão abertos, ou seja, em alta condutância, expressando uma probabilidade p_{HH} ;
- ▣ Estado HL: quando o *connexin* da célula 1 está em alta condutância e o *connexin* da célula 2 está em baixa condutância, expressando uma probabilidade p_{HL} ;

- ▣ Estado LH: quando o *connexin* da célula 1 está em baixa condutância e o *connexin* da célula 2 está em alta condutância, expressando uma probabilidade p_{LH} ;
- ▣ Estado LL: quando ambos os *connexins* estão fechados, ou seja, em baixa condutância, expressando uma probabilidade p_{LL} .

A validação empírica do modelo indicou que o estado LL apresenta uma probabilidade de ocorrência aproximadamente nula, sendo possível desconsiderar seu efeito (Bukaukas *et al.*, 2013). Desse modo, a Equação 2.1 expressa a relação entre as probabilidades dos estados para o modelo estocástico dos canais GJ.

$$p_{HH} + p_{HL} + p_{LH} = 1. \quad (2.1)$$

Os valores de p_{HH} , p_{HL} e p_{LH} são estimados a partir da solução das equações diferenciais descritas pelas Eqs. 2.2 e 2.2.

$$\frac{dp_{HL}}{dt} = \beta_1(\vartheta_j) \times p_{HH} - \alpha_1(\vartheta_j) \times p_{LH} \quad (2.2)$$

$$\frac{dp_{LH}}{dt} = \beta_2(\vartheta_j) \times p_{HH} - \alpha_2(\vartheta_j) \times p_{HL} \quad (2.3)$$

De modo que o controle da permeabilidade dos canais é realizado por intermédio da diferença de potencial entre as membranas de duas células adjacentes (ϑ_j), sendo α a taxa de abertura da estrutura e β , a taxa de fechamento da estrutura. Os termos $\alpha_1(\vartheta_j)$, $\alpha_2(\vartheta_j)$, $\beta_1(\vartheta_j)$ e $\beta_2(\vartheta_j)$ são definidos como:

$$\alpha_1(\vartheta_j) = \lambda e^{-A_\alpha(\vartheta_j - \vartheta_0)}, \quad (2.4)$$

$$\alpha_2(\vartheta_j) = \lambda e^{A_\alpha(\vartheta_j + \vartheta_0)}, \quad (2.5)$$

$$\beta_1(\vartheta_j) = \lambda e^{A_\beta(\vartheta_j - \vartheta_0)}, \quad (2.6)$$

$$\beta_2(\vartheta_j) = \lambda e^{-A_\beta(\vartheta_j + \vartheta_0)}, \quad (2.7)$$

em que ϑ_0 é a tensão de junção, considerando que as taxas de abertura e de fechamento dos canais GJ têm o mesmo valor comum: λ . A_α e A_β são constantes que indicam a sensibilidade da junção comunicante à tensão de junção (Barros *et al.*, 2015a).

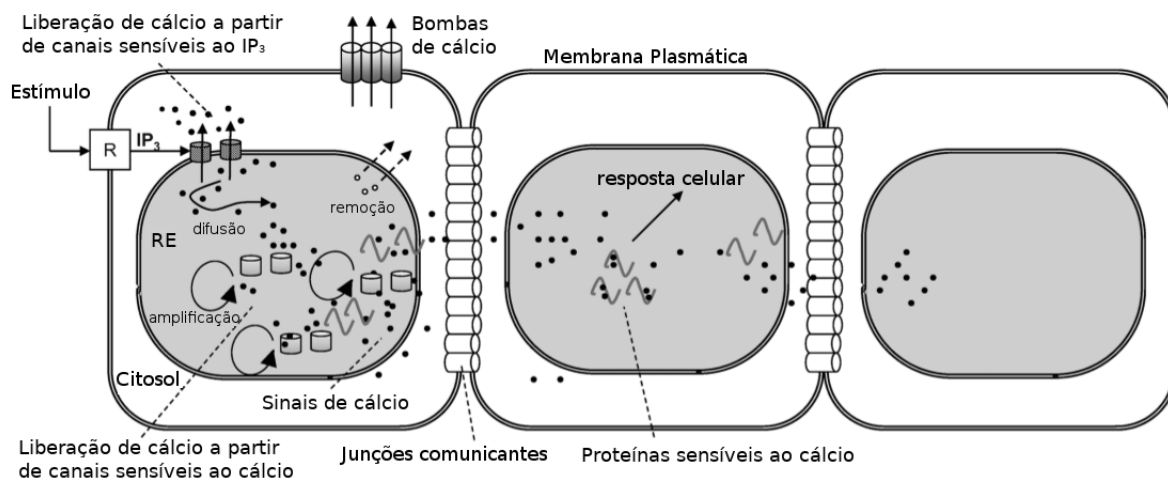
2.2 – Modelo de Sinalização de Ca^{2+}

A sinalização de cálcio é o mecanismo natural pelo qual os íons de Ca^{2+} são transmitidos em pequenas distâncias entre as células interconectadas de um tecido. Esse processo pode ser entendido como uma comunicação entre as células (comunicação intercelular) e está presente em uma variedade delas, desenvolvendo diferentes funções fisiológicas e regulatórias, como por exemplo, o crescimento celular, proliferação e fertilização, contração muscular, comunicação neuronal, motilidade celular, dentre outros (Barros, 2017). A sinalização de Ca^{2+} pode se disseminar por cerca de centenas de micrômetros por meio da difusão molecular, se propagando através dos canais GJ para todo o tecido, se tornando um dos recursos biológicos de maior interesse dos pesquisadores da área de nanorredes e comunicações moleculares (Keener & Sneyd, 2008; Berridge *et al.*, 2003; Hofer & Brown, 2003).

A sinalização de Ca^{2+} acontece de forma intracelular, que consiste no comportamento e na propagação das moléculas de Ca^{2+} pelo interior das células, a qual será o foco do presente trabalho, e de forma extracelular, que analogamente descreve a propagação de Ca^{2+} pelo exterior da célula. A Figura 2.5 ilustra a primeira em um sistema de comunicação simplificado, demonstrando que a sinalização intracelular de cálcio descreve um processo regulatório natural dentro das células humanas que influenciam numerosas outras ações fisiológicas de controle (Barros, 2017).

As diversas reações químicas e a quantidade de Ca^{2+} movimentada frequentemente por elas são responsáveis por regular a concentração desse íon no citosol, assim como produzir os efeitos da oscilação e da propagação das ondas internas (Foskett *et al.*, 2007). A sinalização de Ca^{2+} é dependente do Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que é uma molécula de mensagem secundária que atravessa o citosol a fim de estimular a liberação de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático, de modo que as reações que envolvem esse processo são intrinsecamente importantes para o estabelecimento da comunicação (Barros & Dey, 2017b).

A comunicação intercelular de Ca^{2+} , por sua vez, também é fundamental para o desenvolvimento do tecido e para a regulação da célula (crescimento, proliferação, fertilização,

Figura 2.5 – Sistema de comunicação baseado em Sinalização de Ca^{2+} .

Fonte: Adaptada de Nakano & Liu (2010a).

contração muscular, transmissões neuronais, etc.), além de poder ser iniciada pelo estímulo do IP_3 , pela sinalização hormonal ou por neurotransmissores (Barros, 2017). Esse tipo de sinalização ocorre em uma variedade de células, incluindo os astrócitos, que se comunicam entre si por meio de sinapses químicas e dependem de estruturas que conectam o citosol das mesmas, os canais GJ, que permitem o fluxo iônico intenso para todo o tecido, como pode ser visualizado na Figura 2.5 (Scemes & Giaume, 2006; Scemes *et al.*, 2007).

2.2.1 – Modelagem matemática da sinalização de Ca^{2+}

O modelo da sinalização de Ca^{2+} em astrócitos utilizado no presente trabalho foi desenvolvido a partir dos estudos de Lavrentovich & Hemkin (2008), que estabeleceram equações diferenciais em conformidade com os testes empíricos, empregadas no sistema de comunicação molecular desenvolvido por Barros *et al.* (2015b).

As reações químicas da sinalização começa a partir do estímulo com IP_3 , que libera os sinais de Ca^{2+} ao mesmo tempo em que controla indiretamente a entrada desses íons no retículo endoplasmático, bem como os armazena no citosol. Além do processo de estímulo, alguns componentes celulares também são capazes de produzir íons de Ca^{2+} por si mesmos, mediante reações químicas internas - processo conhecido como amplificação. Por fim, as difusões de Ca^{2+} se manifestam por meio da comunicação entre células e pela troca com o meio extracelular (Goldbeter *et al.*, 1990).

Desse modo, as equações a seguir descrevem os principais processos do modelo de sinalização discutido, de modo que a variação resultante da concentração intracelular de Ca^{2+} ,

ou o sinal de Ca^{2+} (variações em $[\text{Ca}^{2+}]_i$), é representada pela Equação 2.8, o fluxo da concentração de Ca^{2+} no retículo endoplasmático (E_a), pela Equação 2.9 e a variação de concentração de IP_3 (I_a) pode ser obtida a partir da Equação 2.10.

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_i}{dt} = \sigma_0 - \kappa_o[\text{Ca}^{2+}]_i + \sigma_1 - \sigma_2 + \kappa_f(E_a - [\text{Ca}^{2+}]_i) \quad (2.8)$$

$$\frac{dE_a}{dt} = \sigma_2 - \sigma_1 - \kappa_f(E_a - [\text{Ca}^{2+}]_i) \quad (2.9)$$

$$\frac{dI_a}{dt} = \sigma_3 - \kappa_d I_a \quad (2.10)$$

O σ_0 representa o fluxo de Ca^{2+} do meio extracelular para o citosol, $k_o C_a$ é a taxa de saída de Ca^{2+} do citosol para o meio extracelular, $\kappa_f(E_a - [\text{Ca}^{2+}]_i)$ é o fluxo líquido do retículo endoplasmático para o meio intracelular, e $\kappa_d I_a$ é a degradação de IP_3 (Barros *et al.*, 2015b). A variável σ_1 descreve o fluxo de Ca^{2+} do retículo endoplasmático para o citosol por intermédio do estímulo de IP_3 , e pode ser obtida pela Equação 2.11.

$$\sigma_1 = 4v_{M3} \frac{\kappa_{C1}^n [\text{Ca}^{2+}]_i^n}{([\text{Ca}^{2+}]_i^n + \kappa_{C1}^n)([\text{Ca}^{2+}]_i^n + \kappa_{C2}^n)} \cdot \frac{I_a^m}{\kappa_I^m + I_a^m} (E_a - [\text{Ca}^{2+}]_i) \quad (2.11)$$

O v_{M3} é o valor máximo de fluxo de Ca^{2+} no citosol, κ_{C1}^n e κ_{C2}^n são as variáveis de ativação e inibição de IP_3 , enquanto m e n são os coeficientes de Hill (Barros & Dey, 2017b). σ_2 representa a saída de Ca^{2+} do retículo sarco(endo)plasmático para o retículo endoplasmático, sendo caracterizado matematicamente pela Equação 2.12:

$$\sigma_2 = v_{M2} \frac{[\text{Ca}^{2+}]_i^2}{\kappa_2^2 + [\text{Ca}^{2+}]_i^2}, \quad (2.12)$$

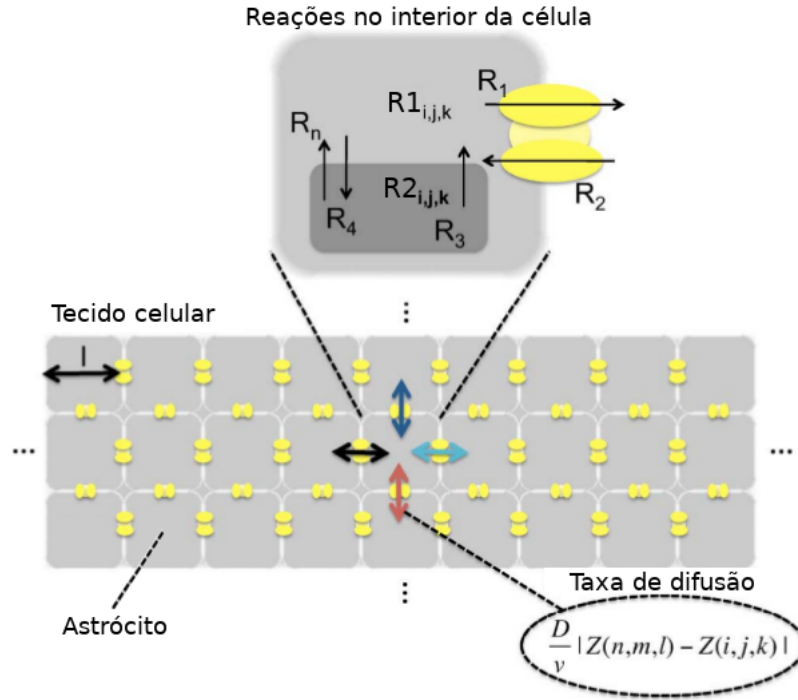
em que v_{M2} é o fluxo de Ca^{2+} máximo nesse processo.

O σ_3 , por sua vez, obtido pela Equação 2.13, descreve a geração de IP_3 pela proteína PLC (Fosfolipase C), que é uma classe de enzimas que fazem a quebra de fosfolipídios imediatamente antes do grupo fosfato (Grandgenett *et al.*, 2007).

$$\sigma_3 = v_p \frac{[\text{Ca}^{2+}]_i^2}{k_p^2 + [\text{Ca}^{2+}]_i^2}, \quad (2.13)$$

De modo que v_p é o fluxo de Ca^{2+} máximo nesse processo e p é o coeficiente de Hill (Barros *et al.*, 2015b).

Figura 2.6 – Plano de um tecido tridimensional de astrócitos, com suas reações internas e o processo de difusão pelos canais GJ.



Fonte: Adaptada de Barros *et al.* (2015b).

Finalmente, o processo de comunicação intercelular acontece mediante a difusão de Ca^{2+} baseada nos canais GJ, como ilustrados na Figura 2.6, na qual, as reações que acontecem no interior da célula são representadas por R_1 – R_n , enquanto $R_{1_{i,j,k}}$ e $R_{2_{i,j,k}}$ representam os locais armazenadores de Ca^{2+} (citosol e retículo endoplasmático, respectivamente) do astrócito que se encontra na posição i, j, k do tecido tridimensional. Desse modo, a difusão molecular pelos canais GJ para todo o tecido celular pode ser modelada por intermédio da Equação 2.14, sugerida por Nakano *et al.* (2014), que realizaram o estudo a fim de simular a dinâmica espacial-temporal com que acontece essa reação.

$$Z_{\Delta}(i, j, k, x, y, z) = \frac{D}{v} (|Z_{x,y,z} - Z_{i,j,k}|) \times p(\cdot) \quad (2.14)$$

Na qual, D é o coeficiente de difusão, v é o volume da célula, $Z_{x,y,z}$ e $Z_{i,j,k}$ são as concentrações moleculares no citosol de dois astrócitos adjacentes nas posições x, y, z e i, j, k do tecido tridimensional, $p(\cdot)$ é a probabilidade dos estados dos canais GJ (p_{HH} , p_{HL} e p_{LH}), descritos na Seção 2.1 e, por fim, Z_{Δ} é a diferença de concentração citosólica do íon

que está em difusão entre as duas células. A Equação 2.14 mostra, portanto, que um dos principais influenciadores para ocorrer a difusão entre dois astrócitos adjacentes é a diferença de concentração molecular intracelular entre eles (Barros & Dey, 2017a).

A Tabela 2.1 discrimina os valores utilizados para os parâmetros do modelo de sinalização de Ca^{2+} , bem como para as constantes das equações descritas no modelo estocástico dos canais GJ, na Seção 2.1.

Tabela 2.1 – Valores dos parâmetros envolvidos no modelo de sinalização de Ca^{2+} extraídos do trabalho de Barros *et al.* (2015a).

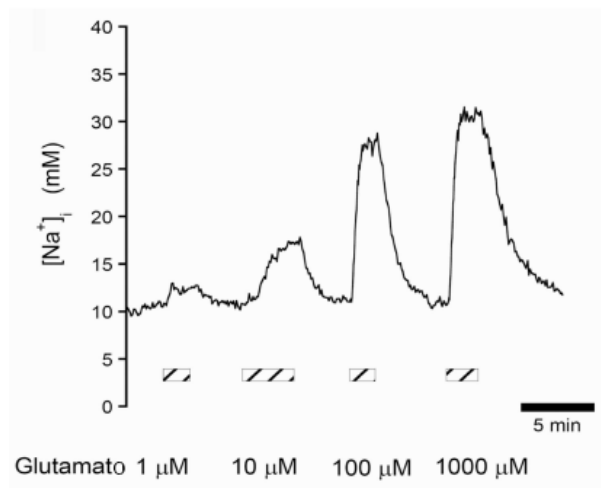
Parâmetro	Valor	Unidade
σ_0	0,05	μM
κ_o	0,5	s^{-1}
κ_f	0,5	s^{-1}
κ_d	0,08	s^{-1}
v_{M2}	15	$\mu\text{M/s}$
κ_2	0,1	μM
v_p	0,05	$\mu\text{M/s}$
κ_p	0,3	μM
n	2,02	
κ_{C1}	0,15	μM
κ_{C2}	0,15	μM
κ_I	0,1	μM
v_{M3}	40	s^{-1}
m	2,2	
D	350	$\mu\text{m}^2/\text{s}$
λ	0,37	
ϑ_j	90	mV
ϑ_0	60	mV
A_α	0,008	$(\text{mV})^{-1}$
A_β	0,67	$(\text{mV})^{-1}$

2.3 – Modelo de Sinalização de Na^+

Analogamente à sinalização de Ca^{2+} , a sinalização de Na^+ , que é o processo de comunicação intercelular através de moléculas de sódio, acontece de forma intracelular e extracelular. A linha de base para a concentração de Na^+ no citosol dos astrócitos, ou seja, o valor de $[\text{Na}^+]_i$ quando a célula está em repouso, se encontra em torno de 15 – 20 mM (15 – 20 mM, em astrócitos do hipocampo (Rose & Ransom, 1996); 17 mM, em astrócitos do córtex visual (Reyes *et al.*, 2012); e 17 – 20 mM, em astrócitos de outras partes do córtex (Unichenko *et al.*, 2012)), mas o estímulo elétrico em um único astrócito pode produzir

um volume de concentração desse íon com cerca de 10 – 25 mM acima dessa linha de base (Langer *et al.*, 2012; Chatton *et al.*, 2000).

Figura 2.7 – Aumento de $[Na^+]_i$ após estímulo com glutamato.



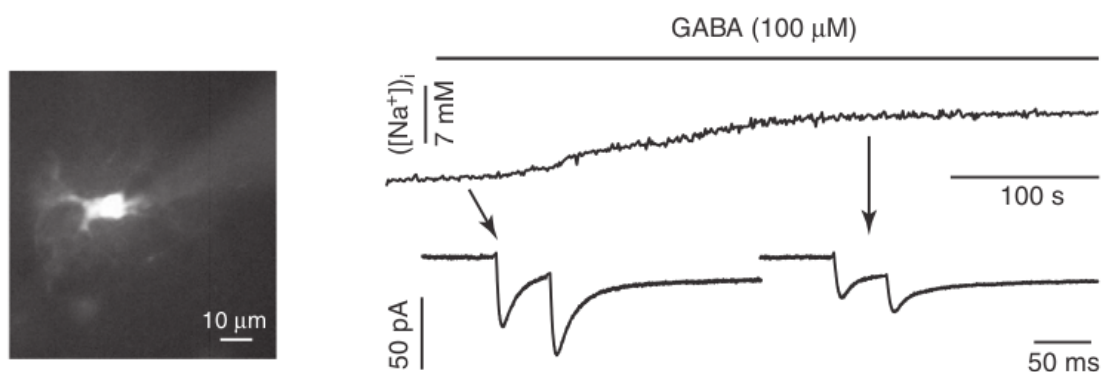
Fonte: (Rose & Karus, 2013)

Estudos mostram que células adjacentes ao astrócito que recebe o estímulo também sofrem o efeito, sugerindo ainda que a propagação dos sinais de sódio acontece de forma radial para todas as células circunvizinhas, seguindo o modelo dinâmico da difusão (Syková & Nicholson, 2008; Kadloor *et al.*, 2012), que favorece a dissipação da alta concentração de Na^+ , restabelecendo os níveis iniciais da linha de base. Por exemplo, Bernardinelli *et al.* (2004) e Rose & Ransom (1997) demonstraram que ao aplicar glutamato (principal aminoácido que age como neurotransmissor excitatório no SNC) em astrócitos *in vitro*, os íons de Na^+ formam ondas que se propagam ao longo do tecido, atingindo níveis de concentração conforme mostrados na Figura 2.7.

Nas células da glia de Bergmann, o estímulo de glutamato induziu um aumento de 15 – 25 mM em $[Na^+]_i$ acima da linha de base (Kirischuk *et al.*, 1997, 2007), enquanto que no hipocampo, o glutamato não só provocou o crescimento da concentração de Na^+ no citosol, mas também dos sinais de propagação desse íon pelo tecido de astrócitos. Por fim, Unichenko *et al.* (2012) mostraram a possibilidade do aumento de $[Na^+]_i$ em cerca de 7 mM após o estímulo com ácido γ -aminobutírico (GABA)¹, como observado na Figura 2.8, e, segundo Kirischuk *et al.* (2007) e Langer *et al.* (2012), esses picos de concentração de Na^+ também são estimulados pelos pulsos sinápticos detectados no hipocampo e no cerebelo.

¹Principal neurotransmissor inibidor do SNC dos mamíferos.

Figura 2.8 – Aumento de $[Na^+]_i$ após estímulo com GABA. Imagem aproximada de astrócito com concentração de Na^+ (branco) à esquerda.



Fonte: (Kirischuk *et al.*, 2012).

2.3.1 – Sinais de sódio na rede de astrócitos

Como discutido na Seção 2.1, os astrócitos são amplamente conectados por junções comunicantes (*gap junctions*), que os permite funcionar como um conjunto coordenado de células (Chatton *et al.*, 2016). Assim, de forma similar à sinalização de Ca^{2+} , a propagação dos íons de Na^+ ao longo da rede de astrócitos também acontece por difusão através dos canais GJ, constituídos principalmente pelos *connexins* Cx30 e Cx43, sendo modelada pela Equação 2.14 e descrita na Figura 2.6 (Langer *et al.*, 2012).

Estudos da década de 50 sugeriram por muito tempo que as atividades fisiológicas das células não influenciavam significativamente as mudanças na concentração intracelular de Na^+ (Hodgkin & Huxley, 1952). No entanto, essa afirmação foi invalidada posteriormente ao observar o comportamento de estruturas do citosol das células da glia e dos neurônios, visto que os dados obtidos a partir de substâncias fluorescentes detectoras de sódio demonstraram que os potenciais de ação - sinais elétricos que atuam diretamente na abertura e no fechamento das junções comunicantes - causam um aumento expressivo no $[Na^+]_i$ dos axônios, devido ao fluxo de Na^+ através dos canais GJ (Lasser-Ross & Ross, 1992; Fleidervish *et al.*, 2010; Baranauskas *et al.*, 2013).

Além disso, de acordo com Chatton *et al.* (2016), experimentos realizados com microeletrodos seletores de íons em cérebros de vertebrados *in vivo* demonstraram que as atividades relacionadas à abertura das junções comunicantes e o fluxo de Na^+ através desses canais também podem alterar a concentração desse íon no meio extracelular, em cerca de 15 mM. Desse modo, os astrócitos permitem a disseminação rápida de Na^+ para toda rede

em caminhos bem definidos e eficientes através das junções comunicantes. A difusão de Na^+ por meio desses canais também sofre influência da atividade sináptica local, fazendo com que os transientes de Na^+ possam auxiliar a diminuição da carga metabólica de algumas células (Rose & Chatton, 2016).

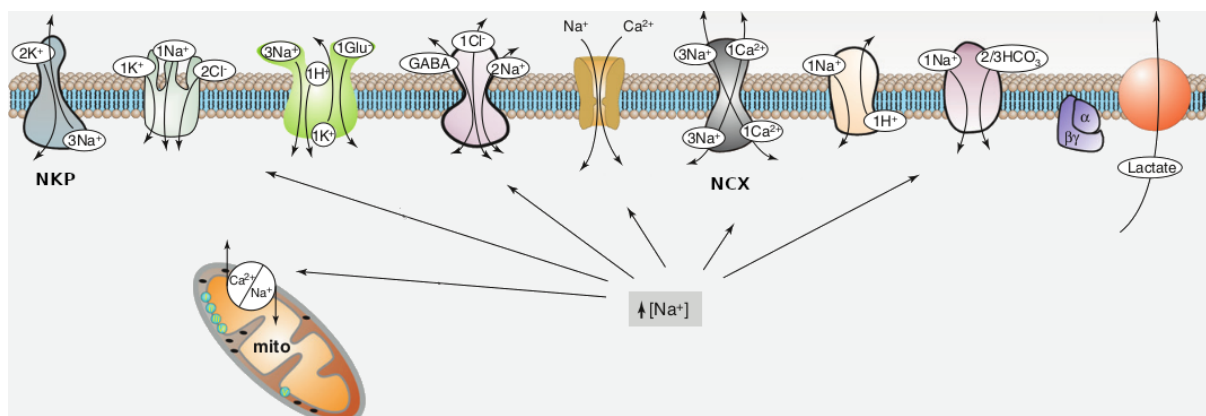
Em partes do hipocampo, os sinais de sódio gerados em uma célula são propagados ao longo do tecido por intermédio da contribuição individual de cada astrócito com uma velocidade inicial maior do que $60 \mu\text{m/s}$ (Langer *et al.*, 2012), que é bem acima da velocidade padrão das ondas de Ca^{2+} (Scemes & Giaume, 2006). Além do mais, esses sinais de Na^+ são transmitidos de forma radial a uma distância de cerca de $100 \mu\text{m}$. Um exemplo da ação dessa propagação foi demonstrada por Bernardinelli *et al.* (2004), que descreveram uma importante função para a transmissão de ondas regenerativas de sódio entre astrócitos de células transmissoras da glia.

2.3.2 – Homeostase do sódio

A homeostase intracelular do Na^+ é uma propriedade fundamental das células animais e um pré-requisito para o funcionamento celular. Enquanto o $[\text{Na}^+]_o$ (concentração extracelular de Na^+) possui uma faixa de $145 - 150 \text{ mM}$ (Somjen, 2004), o $[\text{Na}^+]_i$ é mantido em torno de 15 mM nos astrócitos em repouso (Deitmer & Rose, 2010). Com essa concentração e com o potencial de membrana em -80 mV , a força motriz direcionada para os íons de sódio se encontra em torno de 140 mV , de forma que, sob condições fisiológicas naturais, a difusão líquida de Na^+ é sempre para dentro, gastando energia para alterar o sentido, ou seja, a fim de direcionar para fora (Rose & Karus, 2013).

Assim, as concentrações de Na^+ nos astrócitos são reguladas por difusão através de canais transmembranais, ou estruturas de transporte iônico presentes na membrana plasmática, que atuam na transferência de moléculas de Na^+ , principalmente, por meio de bombas dependentes de ATP e trocas sucessivas de múltiplos íons (Parpura & Verkhratsky, 2012b), como observado na Figura 2.9, que ilustra algumas dessas estruturas e seus principais componentes iônicos. As principais movimentações de Na^+ através desses canais estão associadas com a presença de receptores ionotrópicos de glutamato e receptores purinérgicos, que são uma família de moléculas presentes na membrana principalmente encontrados em tecidos de mamíferos (North, 2002).

No entanto, dentre as estruturas a que os sinais de Na^+ na astroglia estão ligados, pode-se destacar, em particular, a bomba de sódio e potássio (NKP) e o canal transportador

Figura 2.9 – Mecanismos que atuam na homeostase do Na^+ nos astrócitos.

Fonte: Adaptada de Kirischuk *et al.* (2012).

de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, que também regulam o armazenamento de K^+ , e o canal trocador de sódio e cálcio (NCX), cujas atividades são controladas diretamente pelo $[\text{Na}^+]_i$ (Kirischuk *et al.*, 2012). A NKP é o principal transportador de Na^+ dependente de energia externa nos astrócitos, através da qual a elevação da atividade neuronal desencadeia a síntese do ácido láctico, enquanto que o NCX é o canal trocador de íons mais importante fisiologicamente, cuja atuação modula diretamente a sinalização de Ca^{2+} (Lytton, 2007). Ambos estão descritos mais detalhadamente no Capítulo 3.

Modelagem das Estruturas de Transporte Iônico da Membrana Plasmática

Neste capítulo, são descritas as características biológicas e as funções desempenhadas pelas estruturas de transporte iônico transmembranais, que possuem um papel fundamental na regulação dos níveis de concentração e na homeostase das células animais, bem como favorecem a propagação molecular pelo tecido, promovendo a comunicação entre as células da glia (Kirischuk *et al.*, 2012). Na Seção 3.1, são apresentadas as propriedades dos dois modos de operação do NCX, enquanto que na Seção 3.2, é discutido o modelo matemático para as reações da NKP e, finalmente, o princípio de funcionamento da CP é exposto na Seção 3.3.

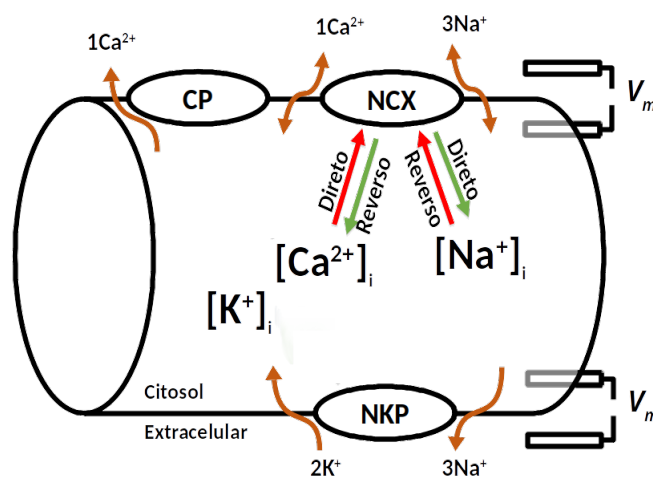
3.1 – Canal Trocador de Na^+ e Ca^{2+}

O Canal Trocador de Na^+ e Ca^{2+} (NCX) é uma proteína transportadora de íons de sódio e de cálcio presente na membrana plasmática das células animais (Blaustein & Lederer, 1999; Reyes *et al.*, 2012), sendo considerado um dos dois maiores mecanismos emissores de Ca^{2+} para fora da célula, com taxa de transporte de 2000 – 5000 moles por segundo, sendo responsável por aproximadamente 70% a 90% da emissão. Nos astrócitos e nos neurônios, o NCX está distribuído na membrana em um padrão reticular entrelaçado, localizado paralelamente à estrutura do retículo endoplasmático, com o qual também trabalha para manter os níveis do gradiente iônico da célula (Blaustein *et al.*, 2002).

Essa proteína realiza a troca de 3 moléculas de Na^+ por 1 molécula de Ca^{2+} entre o meio extracelular e o citosol, possuindo dois modos de operação: o modo direto, quando há entrada de sódio na célula e saída de cálcio para o meio extracelular, e o modo reverso, quando o oposto acontece (Noble & Herchuelz, 2007; Matsuoka *et al.*, 1996), como pode ser observado na Figura 3.1, que também ilustra o funcionamento da bomba de Na^+ e K^+ e da bomba de Ca^{2+} ,

as quais serão discutidas nas Seções 3.2 e 3.3, respectivamente. Na Figura 3.1, o sentido do fluxo de saída das moléculas da célula é representado pela seta vermelha, enquanto o fluxo de entrada no citosol é representado pela seta verde, a fim de identificar os dois modos de operação do NCX.

Figura 3.1 – Princípio básico de operação do NCX, da NKP e da CP em uma célula hipotética de formato cilíndrico.



Fonte: Adaptada de Brazhe *et al.* (2018).

O NCX é um mecanismo único, que permite a saída de Ca²⁺ contra seu próprio gradiente iônico sem consumir energia externa, mas obtendo energia por meio da alteração no gradiente eletromecânico da membrana com a entrada de Na⁺ (Noble & Herchuelz, 2007). Desse modo, os modos de operação do NCX podem ser alternados entre si através das mudanças nesses gradientes eletromecânicos de Na⁺ e de Ca²⁺ e no potencial de membrana (V_m), que também são consequência da operação das diferentes estruturas de transporte iônico presentes na membrana plasmática (Paluzzi *et al.*, 2007; Cooper, 2000). Nos astrócitos, o potencial de reversão do NCX, ou seja, o potencial em que ocorre a permutação dinâmica entre os modos de operação, é próximo do potencial de repouso da membrana, que é de aproximadamente -80 mV (Kirschuk *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 2007).

O modo reverso é dependente internamente de [Na⁺]_i para a entrada de Ca²⁺ e dependente externamente de [Ca²⁺]_o (concentração extracelular de Ca²⁺) para a saída de Na⁺, embora o NCX considere a concentração de Ca²⁺ no citosol como requisito crítico para a ativação de qualquer um dos dois modos de operação (Blaustein & Lederer, 1999). Para as células do axônio das lulas e para os cardiomiócitos, por exemplo, é necessário que [Ca²⁺]_i seja

na ordem de $1\mu\text{M}$, de modo que somente em uma pequena parte das células o NCX se encontra ativo no modo de repouso ($[\text{Ca}^{2+}]_i = 100\text{ nM}$) (DiPolo & Beauge, 1986; DiPolo *et al.*, 1989). A ativação também ocorre com baixa concentração externa de Na^+ , de modo que quando $[\text{Na}^+]_o$ aumenta, o fluxo de Ca^{2+} para o citosol diminui (Beaugé & DiPolo, 1991).

O modo direto, por sua vez, é dependente externamente de $[\text{Na}^+]_o$ para a saída de Ca^{2+} e dependente internamente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para a entrada de Na^+ . Esse modo também é ativado pela concentração intracelular de Ca^{2+} , fazendo com que o processo de troca do NCX seja considerado assimétrico, visto que o modo direto não depende de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ para a sua ativação (Blaustein & Lederer, 1999). A despolarização¹ e o aumento em $[\text{Na}^+]_i$ favorecem a mudança para o modo reverso, enquanto que o aumento em $[\text{Ca}^{2+}]_i$ favorece o modo direto (Kirischuk *et al.*, 2012; Brazhe *et al.*, 2018). Nos astrócitos do córtex cultivados, o NCX opera no modo reverso, mesmo em condições de repouso (Reyes *et al.*, 2012; Paluzzi *et al.*, 2007).

3.1.1 – Fluxo Iônico do NCX

A vazão das moléculas de Na^+ e de Ca^{2+} por entre a estrutura do NCX faz com que surja um transporte eletrogênico, ou seja, um movimento líquido de cargas (íons) através da membrana, que pode ser medido como uma corrente iônica, da qual é estimado o valor do fluxo (Ottolia *et al.*, 2013). Esse fluxo iônico do canal trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (J_{NCX}), então, descreve o tráfego dos transientes de Ca^{2+} sob influência dos componentes eletromecânicos da reação, mediante os efeitos do gradiente de Na^+ e da atuação do potencial de membrana, sendo conhecido como o fluxo do NCX mediado por Ca^{2+} (Brazhe *et al.*, 2018; Ginsburg *et al.*, 2013).

A Equação 3.1 expressa o J_{NCX} para ambos os modos de operação para um tempo discreto k , que corresponde à modelagem matemática utilizada por este trabalho para o controle das concentrações intracelular e extracelular de Na^+ e Ca^{2+} por intermédio do NCX na célula (Barros *et al.*, 2015b; Koenigsberger *et al.*, 2004a). k é definido passo de tempo escolhido para a simulação por esta dissertação de mestrado, melhor discutido no Capítulo 4.

$$J_{NCX}[k] = G_{NCX} \cdot \frac{[\text{Ca}^{2+}]_i[k]}{[\text{Ca}^{2+}]_i[k] + C_{NCX}} \cdot (v_m[k] - v_{NCX}) \quad (3.1)$$

¹ Saída do repouso da célula pela entrada de íons de Na^+ no citosol (Cooper, 2000).

De modo que G_{NCX} é a condutância total da célula, expressa em $\mu M m V^{-1} s^{-1}$, C_{NCX} é a concentração média de Ca^{2+} para a ativação do NCX (Parthimos *et al.*, 1999; Koenigsberger *et al.*, 2004a), v_{NCX} é o potencial de reversão do NCX (Kirischuk *et al.*, 2012) e, finalmente, v_m é o potencial de membrana, que pode ser calculado pela Equação de Nernst, observada na Equação 3.2 (Nicholls & Ferguson, 2013).

$$v_m[k] = 2,3 \cdot \frac{RT}{mF} \cdot \log_{10} \left\{ \frac{[Ca^{2+}]_o[k]}{[Ca^{2+}]_i[k]} \right\} \quad (3.2)$$

Na qual, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura ambiente, em Kelvin, m é carga iônica do Ca^{2+} . A Tabela 3.1 descreve os valores dos parâmetros utilizados para calcular o J_{NCX} .

Tabela 3.1 – Parâmetros para o cálculo do fluxo iônico do NCX (Koenigsberger *et al.*, 2004a)

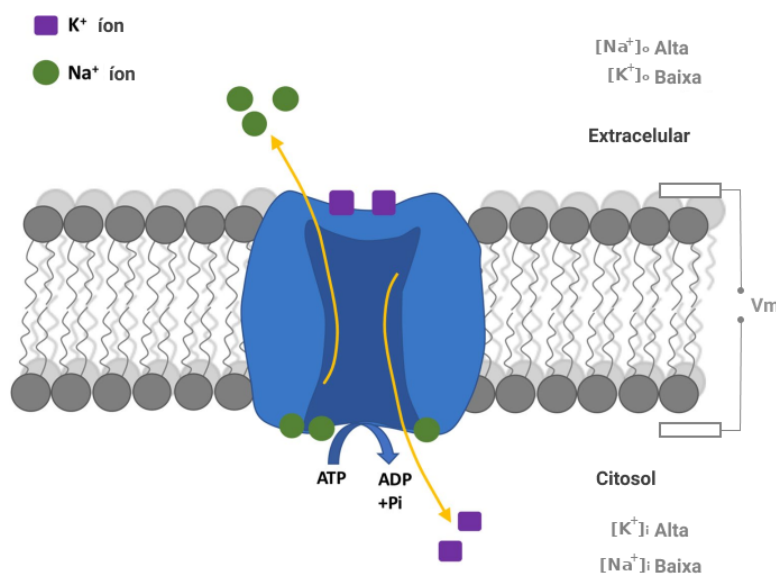
Parâmetro	Valor	Unidade
G_{NCX}	$3.160 \cdot 10^{-3}$	$\mu M m V^{-1} s^{-1}$
C_{NCX}	0.5	μM
v_{NCX}	-80	mV
R	8,314472	$N m g^{-1} mol^{-1} K^{-1}$
T	298,16	K
m	2	-

3.2 – Bomba de Na^+ e K^+

A bomba de Na^+/K^+ (NKP) é responsável pela geração e manutenção dos gradientes de Na^+ e K^+ na célula, realizando a troca de 3 moléculas do primeiro para o meio extracelular e 2 moléculas do segundo para o citosol através da membrana celular, em um processo que utiliza a energia derivada da hidrólise do ATP (Adenosina Trifosfato), a fim de vencer a força oposta do gradiente eletroquímico (Castillo *et al.*, 2015).

A Figura 3.2 ilustra o princípio de funcionamento da NKP. Primeiramente, os íons de Na^+ do citosol se ligam aos espaços livres de alta afinidade presentes no canal da bomba, estimulando a hidrólise do ATP, que se transforma em ADP (Adenosina Difosfato) e induz a exposição do Na^+ ao meio externo da célula, diminuindo a afinidade da ligação com a parede da bomba. Assim, os íons de Na^+ são liberados para o meio extracelular ao mesmo tempo em que os íons de K^+ presentes nesse meio são expostos aos espaços livres da bomba, ligando-se a eles. Essa ligação, então, estimula a hidrólise do grupo de fosfato (Pi) presente no canal

Figura 3.2 – Funcionamento da Bomba de Na⁺/K⁺.



Fonte: Adaptada de Pivovarov *et al.* (2019).

da bomba, que libera os íons de K⁺ para o citossol da célula, em um processo semelhante ao anterior (Cooper, 2000). Nesse trabalho, a contribuição do ATP foi considerada meramente como uma condição externa para permitir o funcionamento da bomba de Na⁺/K⁺ e das demais estruturas de transporte dependentes dessa fonte energética, não sendo implementadas as implicações de sua hidrólise nas demais partes do sistema e a sua formação, as quais são apresentadas e discutidas no trabalho de Castillo *et al.* (2015).

A concentração intracelular de K⁺ ([K⁺]_i) é alta, enquanto que a concentração intracelular de Na⁺ ([Na⁺]_i) é baixa em grande parte das células vivas, por outro lado, o oposto acontece no meio extracelular. Desse modo, entende-se que existe um gradiente de perda e outro de ganho para [K⁺]_i e [Na⁺]_i, respectivamente. Este gradiente é preservado através da atuação de diversos canais e carregadores iônicos, mas majoritariamente por intermédio da atividade da bomba de sódio e potássio (Na, 2010).

De acordo com Clarke *et al.* (1989), as taxas de variação em [Na⁺]_i e em [K⁺]_i podem ser obtidas a partir da Equação 3.3 e da Equação 3.4, respectivamente.

$$\frac{dN_i}{dt} = -(J_N + J_{N_{pass}}) \tag{3.3}$$

$$\frac{dK_i}{dt} = -(J_K + J_{K_{pass}}) \tag{3.4}$$

De modo que J_N e J_K são os fluxos das moléculas de Na^+ e K^+ , respectivamente, transmitidas do citosol para o meio extracelular através da bomba, enquanto que $J_{N_{pass}}$ e $J_{K_{pass}}$ são os fluxos passivos para as mesmas moléculas, conhecidos como vazamento (Clarke *et al.*, 1989).

Se a bomba tem n espaços livres para o transporte de Na^+ e k espaços livres para o transporte de K^+ , e se, quando a troca está sendo realizada, sempre ocorre a ocupação de todos esses espaços, então J_N e J_K podem ser obtidos por intermédio da Equação 3.5 e da Equação 3.6, respectivamente.

$$J_N = -n \cdot p \cdot v \quad (3.5)$$

$$J_K = k \cdot p \cdot v \quad (3.6)$$

Em que p é o número de moléculas orientadas para o lado externo da membrana plasmática e v é a taxa de renovação da bomba (Clarke *et al.*, 1989; Hertz *et al.*, 2013). Já $J_{N_{pass}}$ e $J_{K_{pass}}$ podem ser calculados como descritos na Equação 3.7 e na Equação 3.8, respectivamente.

$$J_{N_{pass}} = P_N \cdot A \cdot V_m \cdot \frac{c_{i_N} \cdot e^{V_m} - c_{o_N}}{e^{V_m} - 1} \quad (3.7)$$

$$J_{K_{pass}} = P_K \cdot A \cdot V_m \cdot \frac{c_{i_K} \cdot e^{V_m} - c_{o_K}}{e^{V_m} - 1} \quad (3.8)$$

O c_{i_N} e c_{i_K} são as concentrações molares de Na^+ e K^+ por unidade de volume intracelular (V_i), enquanto c_{o_N} e c_{o_K} são as concentrações por unidade de volume extracelular (V_o). A é a área da membrana plasmática, obtida em (Clarke *et al.*, 1989). P_N e P_K são os coeficientes de permeabilidade dos íons da bomba e podem ser calculados a partir das Eqs. 3.9 e 3.10.

$$P_N = a_N \cdot c_{val} + b_N \quad (3.9)$$

$$P_K = a_K \cdot c_{val} + b_K \quad (3.10)$$

O c_{val} é o valor da concentração aquosa de valinomicina, que é um ionóforo de cálcio responsável por carregar o potássio por entre as membranas biológicas com alta seletividade, oferecendo uma permeabilidade elevada ao íon (Jacobs, 2019). b_N e b_K são as constantes que

representam a permeabilidade do K^+ na membrana plasmática independente da valinomicina. A Tabela 3.2 mostra os valores das constantes utilizadas no modelo matemático apresentado para as reações da bomba de Na^+/K^+ , obtido a partir do trabalho desenvolvido por Clarke *et al.* (1989).

Tabela 3.2 – Constantes utilizadas para o modelo de reações da bomba de Na^+/K^+ (Clarke *et al.*, 1989).

Variáveis	Valores
n	3
k	2
p	5
v	$121 \cdot s^{-1}$
a_K	$60 \cdot M^{-1} \cdot cm \cdot s^{-1}$
a_N	$8 \cdot e^{-10} \cdot M^{-1} \cdot cm \cdot s^{-1}$
b_K	$1 \cdot e^{-9} \cdot M^{-1} \cdot cm \cdot s^{-1}$
a_N	$8 \cdot e^{-10} M^{-1} \cdot cm \cdot s^{-1}$
c_{i_K}	25000 μM
c_{o_K}	25000 μM
c_{i_N}	125000 μM
c_{o_N}	125000 μM

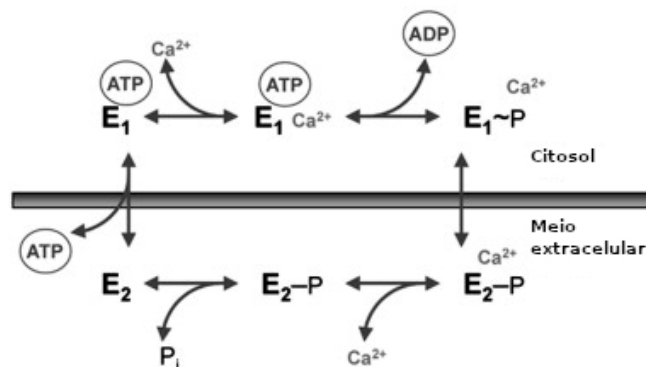
3.3 – Bomba de Ca^{2+}

A bomba de Ca^{2+} (CP) contribui de forma essencial na regulação da homeostase celular desse íon nas células eucarióticas. A CP lança o excesso de Ca^{2+} do citosol no meio extracelular, utilizando a energia oriunda da hidrólise de uma molécula de ATP para transportar uma molécula de Ca^{2+} , a fim de manter um alto gradiente iônico entre os dois meios, visto que a concentração média de Ca^{2+} no citosol é de 100 nM e no meio extracelular, é de 2 mM (Clapham, 2007; Padányi *et al.*, 2003).

Nas células não-excitáveis, como os astrócitos, a CP é, de forma geral, o principal emissor de Ca^{2+} para o meio extracelular (Zylińska & Soszyński, 2000), operando no controle da dinâmica iônica intracelular local à medida em que cria uma região de baixa concentração de Ca^{2+} com as células vizinhas, atraindo outras estruturas dependentes dessa molécula (como proteínas) para as caveolas, que são cavidades lipídicas na membrana plasmática onde ocorre trocas iônicas e transduções de sinais moleculares (Stafford *et al.*, 2017).

A CP pertence à família de bombas do tipo P, que é caracterizada pela produção de alta energia por intermédio da fosforilação (adição de um grupo de fosfato a uma proteína) durante

Figura 3.3 – Esquema do ciclo de reação da CP.



Fonte: Adaptada de Di Leva *et al.* (2008).

o ciclo da reação, que se refere ao processo químico desempenhado a partir da molécula de ATP (Palmgren & Axelsen, 1998). A Figura 3.3 ilustra o ciclo das reações da bomba de Ca²⁺. Pode-se visualizar dois estados conformacionais (mudanças no formato de uma macromolécula induzida por fatores externos) da fosforilação da bomba, descritos como E₁ e E₂ (Krebs *et al.*, 1987).

No primeiro, uma enzima é responsável por atrair a molécula de Ca²⁺ para uma região de alta afinidade no interior da membrana plasmática, conhecida como lacuna de ligação. A fosforilação, que acontece por meio da catalisação do ATP, promove uma mudança conformacional na enzima, causando a transição para o estado E₂ (E₁-P → E₂-P). Nesse estado, a enzima diminui a afinidade da região onde a molécula de Ca²⁺ está ligada, expondo-a ao meio extracelular e liberando o íon para fora da célula. Após a liberação da molécula de Ca²⁺, E₂-P é separado e a enzima retorna para o estado de conformação E₁ (Di Leva *et al.*, 2008).

O modelo matemático que caracteriza essas reações compõe o modelo das reações da sinalização de Ca²⁺, descrito na Seção 2.2, que simplificou a influência da dinâmica iônica da bomba como uma constante, na Equação 2.8. No entanto, de acordo com Mirzakhali *et al.* (2018), o fluxo de Ca²⁺ para o meio extracelular através da CP (J_{CP}) pode ser obtido a partir da Equação 3.11.

$$J_{CP} = G_{CP} \cdot \frac{[Ca^{2+}]_i^2}{[Ca^{2+}]_i^2 + K_{CP}} \quad (3.11)$$

De modo que G_{CP} é o fluxo máximo através da CP e K_{CP} é a constante que modela a afinidade de Ca²⁺ na reação da bomba.

Neste capítulo, é descrita a metodologia implementada para a obtenção dos resultados desta dissertação de mestrado, bem como são explicados os processos e as particularidades do modelo computacional que foi desenvolvido para a simulação do sistema de comunicação molecular. Na Seção 4.1, a estrutura do algoritmo do modelo é caracterizada, enquanto que o processo de modulação e detecção do sinal é explicado na Seção 4.3. A Seção 4.2 descreve o algoritmo estocástico utilizado para obtenção da variabilidade das reações e o cálculo das métricas de avaliação do sistema é, finalmente, demonstrado na Seção 4.4.

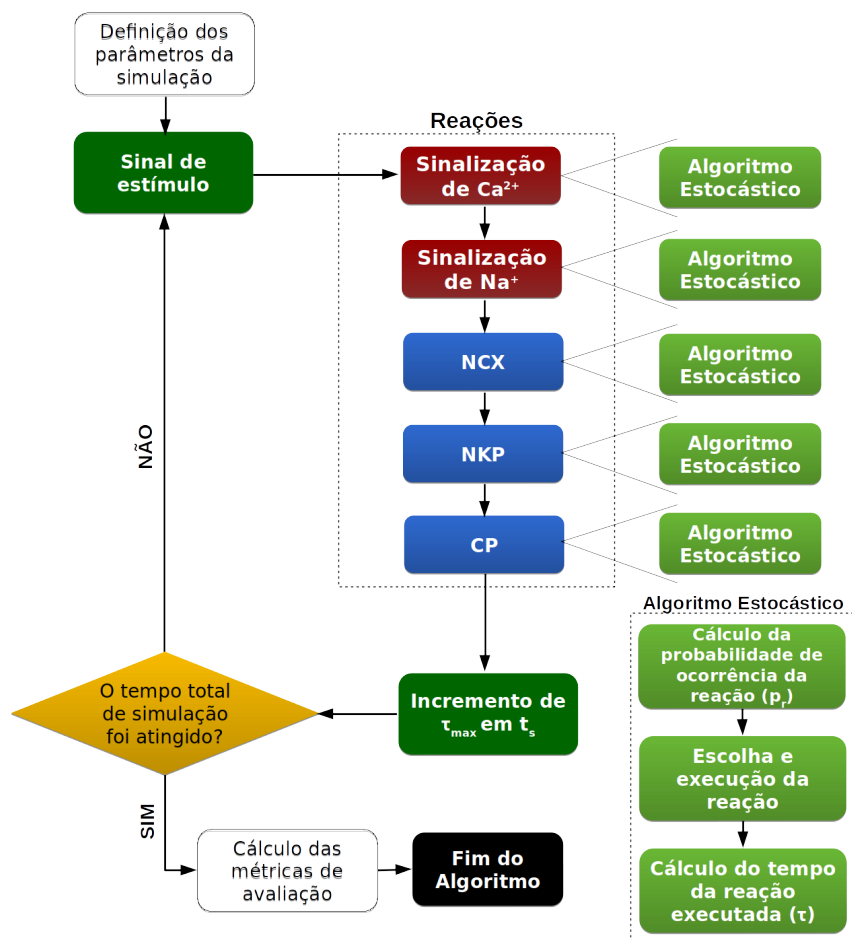
4.1 – Metodologia do algoritmo proposto

O modelo computacional proposto por este trabalho foi adaptado do sistema de comunicação idealizado por Barros *et al.* (2018), que simulou um tecido tridimensional de astrócitos onde são transmitidas moléculas de Ca^{2+} no meio intracelular (Barros & Dey, 2017a), caracterizando-se, portanto, como um sistema puramente de sinalização de Ca^{2+} , cujas reações acontecem por um processo de difusão baseado em junções comunicantes (canais GJ).

A Figura 4.1 descreve o fluxograma básico do algoritmo do sistema completo desenvolvido por este trabalho. Inicialmente, é realizado um estímulo no astrócito transmissor (Tx), que é um pulso quadrado de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de amplitude A e frequência f , necessário para excitar o processo de difusão no tecido. É importante salientar que o Ca^{2+} é a molécula considerada mais importante para o sistema de comunicação proposto por este trabalho e, portanto, a variação em $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é apontada como o sinal de referência, do qual partem as métricas de avaliação do modelo, a fim de analisar a influência das demais reações do sistema na sinalização de Ca^{2+} .

Como observado na Figura 4.1, o processo de comunicação se inicia com a sinalização de Ca^{2+} , realizando uma das reações descritas na Seção 2.2 em um determinado astrócito. Em

Figura 4.1 – Fluxograma básico do modelo computacional.



Fonte: Elaborada pelo autor.

seguida, o modelo da sinalização de Na^+ acontece por intermédio da difusão através dos canais GJ no meio intracelular, seguido pelo NCX e pelas bombas NKP e CP, que oferecem a troca de moléculas com o meio extracelular, ativando $[\text{Na}^+]_o$, $[\text{K}^+]_i$, $[\text{K}^+]_o$ (concentração extracelular de potássio) e $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Os modelos ocorrem nessa sequência, mas suas respectivas reações são selecionadas pseudoaleatoriamente por intermédio do algoritmo estocástico explicado na Seção 4.2, que também determina o astrócito (não necessariamente o mesmo) em que cada uma deve ocorrer naquele instante. Essa reação é escolhida com base em sua probabilidade de ocorrência (p_r) determinada pelo algoritmo, o qual também calcula o tempo de execução da respectiva reação (τ).

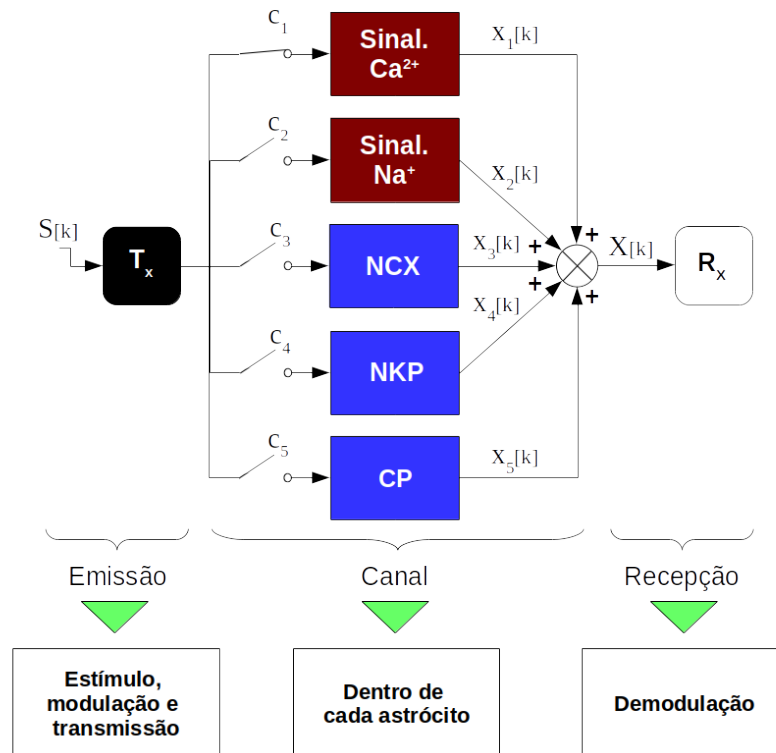
Desse modo, o próximo instante de tempo da simulação do sistema ($t_s[k+1]$) é definido como a soma do tempo de execução máximo (τ_{max}) escolhido entre as reações executadas na iteração k e o $t_s[k]$ atual, como observado na Equação 4.1. Assim, enquanto $t_s[k+1]$ não atingir o tempo de simulação total (T_t), o processo se repete a partir do estímulo de entrada no

T_x . Após T_t ser atingido, são calculadas as métricas de avaliação do modelo computacional, conforme descrito na Seção 4.4 e, então, a simulação é finalizada.

$$t_s[k+1] = t_s[k] + \tau_{max}[k] \quad (4.1)$$

Assim, a análise do sistema de comunicação desenvolvido é realizada considerando todos os modelos de reações discutidos nos Capítulos 2 e 3. A Figura 4.2 ilustra o diagrama de blocos que descreve essa análise, dividindo o processo em três partes: emissão, canal e recepção, cujas definições são necessárias para a compreensão do estudo proposto.

Figura 4.2 – Diagrama de blocos da análise do sistema de comunicação.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Emissão: Para simplificar, fazendo a largura do pulso de entrada do sistema tender a um valor infinitesimal, pode-se dizer que o T_x é estimulado por um trem de impulsos de $[Ca^{2+}]_i (S[k])$, de amplitude A e frequência f , descrito pela Equação 4.2, sendo $l \in \mathbb{N}$, $l = 1, 2, \dots, \lfloor \frac{T_t}{T} \rfloor$ ¹ e $T \in \mathbb{N}$, $T = \lfloor \frac{1}{f} \rfloor$. Após o estímulo, um sinal $X[k]$ é gatilhado a partir do T_x , mediante a definição dos modelos de reações que podem ocorrer no canal. Esse sinal é então modulado

¹O símbolo $\lfloor \frac{x}{y} \rfloor$ detona que foi considerado apenas a parte inteira da divisão entre os termos x e y .

conforme explicado na Seção 4.3 e transmitido para as demais células do tecido até chegar ao astrócito receptor (Rx).

$$S[k] = A \cdot \sum_{l=0}^{\lfloor \frac{T_k}{T} \rfloor} \delta[k - l \cdot T] \quad (4.2)$$

Canal: O canal abrange todos os astrócitos do tecido, incluindo o Tx e o Rx , que possuem o meio determinado previamente na simulação, ou seja, a seleção dos modelos de reações (sinalizações de Ca^{2+} e de Na^+ , NCX e as bombas), ou de combinações dos mesmos, que definirão como o sinal será propagado no sistema de comunicação. As chaves c_1 – c_5 da Figura 4.2 são meramente ilustrativas, a fim de representar a escolha da combinação dos modelos de reações que devem compor o canal, mediante a comutação dos estados aberto ou fechado.

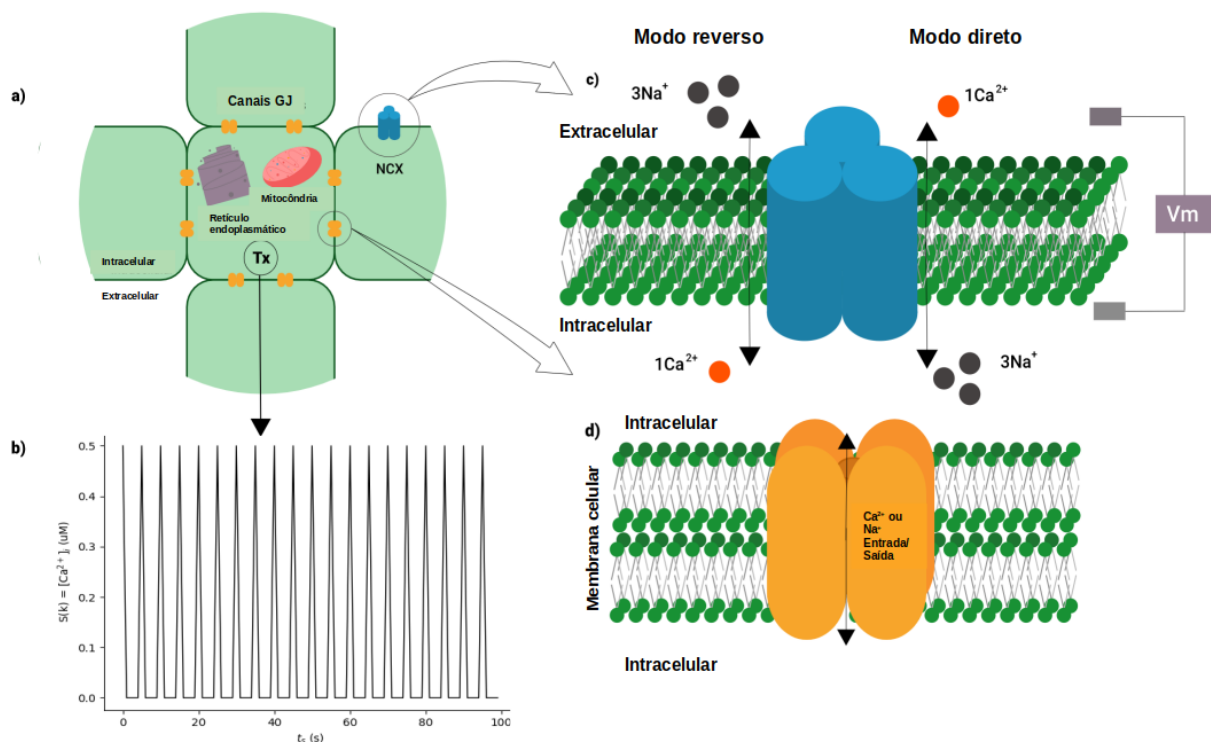
O tecido de astrócitos é composto por 225 células esféricas distribuídas de forma tridimensional, de modo que o eixo x possui 15 células, o eixo y , 5 células e o eixo z , 3 células. O Tx e o Rx estão posicionados no mesmo plano xy , espaçados por uma distância r (dada em células) no eixo x , e os astrócitos se comunicam entre si de acordo com suas adjacências em todas as direções, exceto nas diagonais, em uma topologia conhecida como grau regular (Lallouette *et al.*, 2014). A escolha da estrutura do tecido, da quantidade de células por eixo e da topologia de comunicação foi realizada de acordo com a pesquisa abordada por Barros *et al.* (2018), que é o modelo de referência assumido pelo presente trabalho.

Recepção: O sinal $X[k]$ é uma função de $[Ca^{2+}]_i$, que depende da escolha dos estados das chaves c_1 – c_5 , de acordo com a Equação 4.3, que mostra o sinal resultante a partir da configuração de modelos de reações que se pretende analisar no presente trabalho.

$$X[k] = \begin{cases} x_1[k], & \text{se } c_1 \text{ está fechado} \\ x_1[k] + x_3[k], & \text{se } c_1 \text{ e } c_3 \text{ estão fechados} \\ x_1[k] + x_2[k] + x_3[k], & \text{se } c_1, c_2 \text{ e } c_3 \text{ estão fechados} \\ x_1[k] + x_3[k] + x_4[k] + x_5[k], & \text{se } c_1, c_3, c_4 \text{ e } c_5 \text{ estão fechados} \\ x_1[k] + x_2[k] + x_3[k] + x_4[k] + x_5[k], & \text{se todas as chaves estão fechadas} \end{cases} \quad (4.3)$$

Lê-se o sinal $x_{\#}[k]$ como "contribuição do modelo de reações $\#$ em $[Ca^{2+}]_i$ ", cuja variação resultante representa o sinal de referência do sistema ($X[k]$). Ou seja, $x_1[k]$ é a contribuição, ou variação, causada pela sinalização de Ca^{2+} em $[Ca^{2+}]_i$, $x_2[k]$ é a contribuição da sinalização de Na^+ em $[Ca^{2+}]_i$ e assim, sucessivamente. Algumas reações contribuem diretamente, como as oriundas da sinalização de Ca^{2+} e da CP e outras contribuem indiretamente, ou seja, por intermédio da influência de outras moléculas, como é o caso dos demais modelos de reações, de modo que todos os sinais $x_{\#}[k]$ são definidos em função de $[Ca^{2+}]_i$.

Figura 4.3 – Sistema de comunicação molecular desenvolvido. **a)** Corte do tecido de astrócitos ao redor do Tx . **b)** Estímulo ($S[k]$) por pulsos de $[Ca^{2+}]_i$ no astrócito transmissor. **c)** O NCX e seus modos de operação. **d)** Comunicação por junções comunicantes para as sinalizações de Ca^{2+} e de Na^+ .



Fonte: Elaborada pelo autor.

O sinal $X[k]$ é propagado dentro de cada astrócito, sendo disseminado pelo tecido. O Rx , então, realiza a detecção e a posterior demodulação do sinal, a fim de finalizar o processo de recepção, conforme explicado na Seção 4.3. As combinações descritas na Equação 4.3 foram escolhidas por expressarem suficientemente o objetivo geral desta dissertação de mestrado, que é avaliar a influência dos modelos de reações propostos sobre a sinalização de Ca^{2+} . No processo de simulação, foi observado que as reações oriundas do NCX são curiosamente mais

rápidas do que as demais. Por este motivo, a combinação que descreve o canal composto pelas reações do NCX e pela sinalização de Ca^{2+} (c_1 e c_3 fechados) foi particularmente analisada, a fim de determinar a proporção entre as ocorrências das reações do primeiro em relação ao modelo de referência.

A Figura 4.3 ilustra o arranjo do canal composto pela estrutura do NCX (Figura 4.3 c) e pelos canais GJ (Figura 4.3 d), que permitem a sinalização de Ca^{2+} e Na^+ . Tal arranjo favorece a propagação do sinal $X[k]$ após o estímulo de entrada (Figura 4.3 b) no astrócito transmissor, mediante a ocorrência das reações ao longo do tecido (Figura 4.3 a). Além dessas estruturas, foram implementadas a bomba de Na^+/K^+ e a bomba de Ca^{2+} , constituindo o sistema de comunicação molecular desenvolvido por este trabalho.

4.2 – Algoritmo de simulação estocástica

Neste trabalho, a variabilidade das reações químicas do sistema foi produzida e gerenciada pelo algoritmo estocástico desenvolvido por Gillespie (1977), que oferece uma aproximação coerente da dinâmica usual dos sistemas biológicos existentes, a fim de simular a propagação dos íons de Na^+ , de Ca^{2+} e de K^+ pelo tecido de astrócitos.

A cada iteração, o algoritmo é executado em cada modelo de reações, a fim de escolher uma reação da sinalização de Ca^{2+} (dentre as 6 possibilidades existentes, como descrito na Tabela 4.1), uma reação da sinalização de Na^+ , outra do NCX, outra da NKP e outra da CP, selecionando um astrócito do tecido, que pode ser o mesmo ou não entre os modelos de reações. Exceto pela sinalização de Ca^{2+} , os demais modelos possuem uma única reação a ser escolhida (Tabela 4.1), bastando ao algoritmo estocástico escolher a célula em que essa reação deve ocorrer.

Quando uma reação acontece, seja a comunicação entre duas células (canais GJ), seja o transporte iônico entre os meios extracelular e intracelular (estruturas de transporte), há uma variação das concentrações moleculares de alguma região do tecido, visto que a saída de uma molécula de um meio, representa a entrada dessa mesma em outro meio. A Tabela 4.1 descreve a variação mínima de concentração molecular (α) que acontece em todas as reações de cada modelo de reações, seguindo os princípios biológicos descritos nos Capítulos 2 e 3.

O processo de execução de uma dada reação r_j em um determinado astrócito, dentro de um conjunto de R reações para cada modelo de reações, pode ser dividido em duas etapas:

Tabela 4.1 – Reações por modelo que podem ocorrer em cada astrócito.

Modelo	Reação	Variação de concentração
¹ Sinalização de Ca ²⁺	Estímulo de Ca ²⁺ no Tx	[Ca ²⁺] _i + α
	Escoamento de Ca ²⁺ do citosol para o RE	[Ca ²⁺] _i + α
	Transporte de Ca ²⁺ do citosol para o RE	[Ca ²⁺] _i - α C _{RE} + α
	Lançamento de Ca ²⁺ do RE para o citosol	[Ca ²⁺] _i + α C _{RE} - α
	Escoamento de Ca ²⁺ do RE para o citosol	[Ca ²⁺] _i + α C _{RE} - α
	Difusão de Ca ²⁺ via canais GJ	[Ca ²⁺] _i [*] - α [Ca ²⁺] _i ^{**} + α
² Sinalização de Na ⁺	Difusão de Na ⁺ via canais GJ	[Na ⁺] _i [*] - α [Na ⁺] _i ^{**} + α
³ NCX	Modo direto: entrada de Na ⁺ e saída de Ca ²⁺	[Ca ²⁺] _o + α; [Na ⁺] _i + 3α [Ca ²⁺] _i - α; [Na ⁺] _o - 3α
	Ou modo reverso: entrada de Ca ²⁺ e saída de Na ⁺	[Ca ²⁺] _i + α; [Na ⁺] _o + 3α [Ca ²⁺] _o - α; [Na ⁺] _i - 3α
⁴ NKP	Saída de Na ⁺ para o meio extracelular e entrada de K ⁺ para o citosol	[K ⁺] _o - 2α; [Na ⁺] _i - 3α [K ⁺] _i + 2α; [Na ⁺] _o + 3α
¹ CP	Transporte de Ca ²⁺ para o meio extracelular	[Ca ²⁺] _i - α [Ca ²⁺] _o + α

¹ (Barros *et al.*, 2015b), ² (Kirischuk *et al.*, 2012), ³ (Brazhe *et al.*, 2018), ⁴ (Castillo *et al.*, 2015).

a definição da reação, bem como da célula em que ocorre, e o cálculo do tempo de execução (τ) da mesma (Barros *et al.*, 2015b). Assim, se uma grandeza α_r , que depende diretamente do fluxo iônico da reação, ou seja, da quantidade de concentração movimentada naquele instante (Capítulos 2 e 3), for atribuída a cada reação e sendo α_0 o somatório de todos os α_r em R (Equação 4.4), a reação escolhida (r_u) em um dado modelo é definida maximizando a igualdade descrita pela Equação 4.5.

$$\alpha_0 = \sum_{j=1}^R \alpha_{r_j} \quad (4.4)$$

$$r_u = \max \left[\frac{\alpha_{r_j}}{\alpha_0} \right], u \in \mathbb{N}, u \in R \quad (4.5)$$

De modo que u deve satisfazer a restrição descrita na Equação 4.6, em um processo que seleciona os eventos com base em seus valores de probabilidade, conhecido como *roulette wheel selection* (Lipowski & Lipowska, 2012).

$$\sum_{j=1}^{u-1} \frac{\alpha_{r_j}}{\alpha_0} < \rho_2 \leq \sum_{j=1}^u \frac{\alpha_{r_j}}{\alpha_0}, \quad (4.6)$$

em que ρ_2 é uma variável aleatória uniforme com valores no intervalo (0,1). O τ é então estimado para cada reação de acordo com a Equação 4.7.

$$\tau = \frac{1}{\alpha_0} \times \ln\left(\frac{1}{\rho_1}\right), \quad (4.7)$$

sendo ρ_1 uma variável aleatória uniforme definida no intervalo (0,1]. Visto que existe um τ diferente para cada modelo de reações, o maior valor entre eles (τ_{max}) é selecionado para o cálculo do próximo tempo de simulação (t_s), de acordo com a Equação 4.1, e esse processo se repete até que t_s seja igual ao tempo total de simulação (T_t).

A probabilidade de uma determinada reação, ou um determinado astrócito, ser selecionada ($p_r(r_j, \tau_j)$), dentro do seu modelo de reações, é definida pela Equação 4.8. Assim, na comunicação entre duas células através dos canais GJ, definida pela Equação 2.14, $p_r(r_j, \tau_j)$ será maior para aquele astrócito que apresentar o maior valor de concentração intracelular, tornando-o mais propenso a ser escolhido pelo algoritmo estocástico, visto que α_r depende diretamente do fluxo iônico (ou variação da concentração molecular) da reação.

$$p_r(r_j, \tau_j) dt_s = \alpha_{r_j} e^{-\alpha_0 \cdot \tau_j} dt_s \quad (4.8)$$

Sendo assim, para a reação de difusão através dos canais GJ nas sinalizações, uma vez que esta é selecionada pelo algoritmo estocástico, a comunicação deve ocorrer entre a célula escolhida e todas as células adjacentes, exceto na diagonal (Lallouette *et al.*, 2014), conforme a topologia de grau regular definida na Seção 4.1, sendo aquela, a célula cedente e as demais, as células receptoras.

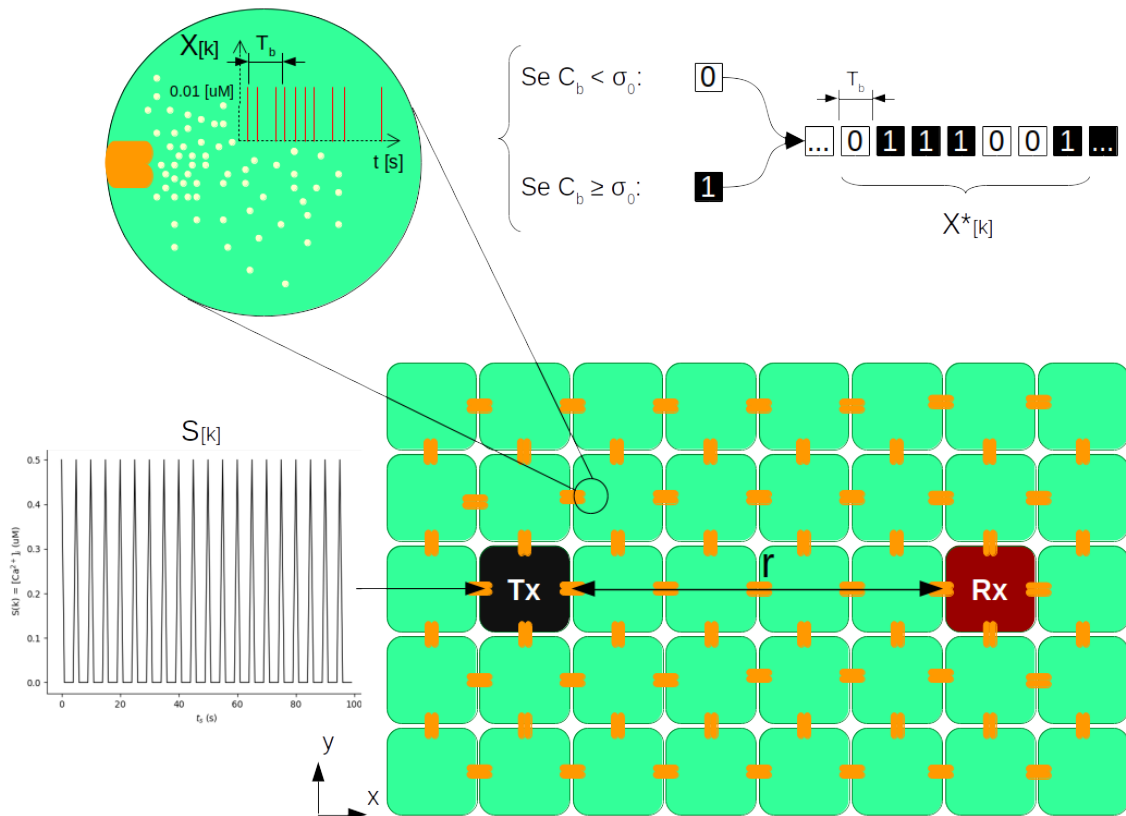
4.3 – Modulação e detecção

Após o estímulo de entrada induzir a propagação de Ca^{2+} através do Tx no sistema de comunicação proposto, o sinal $X[k]$, que é uma função de $[Ca^{2+}]_i$, passa por um processo

de modulação BCSK (*Binary Concentration Shift Keying*), a qual é análoga à modulação ASK (*Amplitude Shift Keying*). Nesse tipo de modulação, um símbolo deverá ser identificado como *bit* 1, se o volume de concentração intracelular de Ca^{2+} transmitido pela célula durante um determinado período de tempo, ou tempo de bit (T_b), ultrapassar um valor limiar de concentração pré-definido (σ_0), caso contrário, será considerado como *bit* 0 (Kuran *et al.*, 2011). Assim, um símbolo pode ser coordenado para representar b bits por vez, usando 2^b volumes de concentração diferentes com $2^b - 1$ valores de limiar. No presente trabalho, foi definido que $b = 1$.

A Figura 4.4 ilustra um corte no tecido de astrócitos do sistema no plano xy em que estão dispostos o Tx e o Rx , espaçados por uma distância r , em células. Após o estímulo de Ca^{2+} no Tx , a difusão se inicia, propagando $X[k]$ com amplitude máxima de α . O volume de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transmitido a cada T_b segundos (C_b) deve ser comparado ao limiar σ_0 , a fim de identificar se o *bit* enviado é 0 ou 1, conforme observado na Figura 4.4, retornando o sinal modulado $X^*[k]$, em *bits*.

Figura 4.4 – Plano de propagação e modulação do sinal.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao $X^*[k]$ se propagar, considerando que as moléculas não seguem um caminho definido, mas há um espalhamento difusivo pelo tecido devido à característica estocástica do sistema (Jamali *et al.*, 2016), é necessário realizar um processo de detecção do sinal, a fim de receber a informação propriamente dita no astrócito desejado. Desse modo, para a implementação do modelo, assumindo as coordenadas x , y e z para determinar a posição da célula receptora no tecido, foi definida uma variável estocástica (H_{TxRx}) que é diretamente proporcional à probabilidade de o algoritmo de Gillespie (1977) escolher as reações do Tx ($p_{Tx}(r_{Tx}, \tau_{Tx})$) e as reações de ao menos uma das células ao redor do Rx , conforme descreve a Equação 4.9. Assim, a Equação 4.9 estima a probabilidade acumulada de um volume de informação ($X^*[k]$) alcançar e ser detectado pelo Rx para que a comunicação seja estabelecida com sucesso. A probabilidade $p_{\#}$ é representada pela Equação 4.8 da Seção 4.2.

$$H_{TxRx} \propto (p_{x-1,y,z} + p_{x+1,y,z} + p_{x,y+1,z} + p_{x,y-1,z} + p_{x,y,z+1} + p_{x,y,z-1}) \cdot p_{Tx}(r_{Tx}, \tau_{Tx}) \quad (4.9)$$

Para simplificação, a soma das probabilidades na Equação 4.9 foi considerada constante e, quando multiplicada pela constante de proporcionalidade necessária para o estabelecimento da igualdade, obtém-se o termo β , conforme a Equação 4.10, considerado igual a 1 pelo presente trabalho.

$$H_{TxRx} = \beta \cdot p_{Tx}(r_{Tx}, \tau_{Tx}) \quad (4.10)$$

A grandeza que representa o canal do sistema é determinada, então, como uma variável aleatória Υ_{TxRx} (Equação 4.11), obtida a partir de uma distribuição *Gamma* $\Gamma(N_{\gamma}, p_{\gamma})$, com N_{γ} tentativas e probabilidade de sucesso p_{γ} , que simula as características da difusão de moléculas pelo tecido em uma comunicação intercelular, conforme os trabalhos de Thurley *et al.* (2018) e Shi & Yang (2017).

$$\Upsilon_{TxRx} \triangleq \Gamma\left(\frac{\max[C_b]}{\alpha}, H_{TxRx}\right) \quad (4.11)$$

Por fim, a Equação 4.12 demonstra a demodulação do sinal detectado ($Y[k]$), em *bits*, como uma multiplicação entre o sinal modulado e a variável aleatória que representa o canal, seguindo o método proposto por Koo *et al.* (2015), finalizando o processo de recepção.

$$Y[k] = \Upsilon_{TxRx} \cdot X^*[k] \quad (4.12)$$

4.4 – Cálculo das métricas de avaliação

Para a análise do modelo computacional, o transporte das moléculas de Ca^{2+} entre os meios extracelular e intracelular em qualquer sentido, ou seja, as variações em $[Ca^{2+}]_o$, é considerado como um ruído do sistema de comunicação, $g[k]$, pois essa variável influencia diretamente, seja positiva ou negativamente, o sinal intracelular de Ca^{2+} , $X[k]$, que é o sinal de referência do sistema. De modo que as variações em $g[k]$ representam a saída ou a entrada de Ca^{2+} do citosol de qualquer célula, oriundo ou destinado ao meio extracelular.

Assim, é calculada a SNR (*Signal-to-Noise Ratio*), Equação 4.13, definida como a relação entre a energia do sinal intracelular de Ca^{2+} (E_{C_i}) e a energia de $g[k]$ (E_{C_o}), que representa as variações em $[Ca^{2+}]_o$.

$$SNR = 10 \times \log_{10} \left(\frac{E_{C_i}}{E_{C_o}} \right) \quad (4.13)$$

De modo que E_{C_i} e E_{C_o} podem ser calculadas de acordo com a Equação 4.14 e a Equação 4.15, respectivamente.

$$E_{C_i} = \sum_{k=0}^{T_t} X^2[k] \quad (4.14)$$

$$E_{C_o} = \sum_{k=0}^{T_t} g^2[k] \quad (4.15)$$

Outra métrica utilizada para a avaliação do sistema foi o ganho de comunicação, definido como o ganho em $[Ca^{2+}]_i$ e calculado como a relação entre a concentração média de Ca^{2+} no citosol do Rx ($\bar{C}_{i_{Rx}}$) e do Tx ($\bar{C}_{i_{Tx}}$), de acordo com a Equação 4.16.

$$Ganho = 10 \times \log_{10} \left(\frac{\bar{C}_{i_{Rx}}}{\bar{C}_{i_{Tx}}} \right) \quad (4.16)$$

Para a observação da capacidade do canal, $X^*[k]$ e $Y[k]$ são investigados, a fim de avaliar a fidelidade entre os dois sinais e a probabilidade de os *bits* de informação enviados pelo Tx chegarem de fato ao Rx . Para isso, assume-se que o Tx e o Rx são totalmente sincronizados, que é uma consideração comum na literatura para altos valores de T_b (Barros *et al.*, 2015b; Nakano & Liu, 2010b). De modo que, para cada tempo de *bit* (T_b), ambos Tx e Rx estarão alertas sobre a transmissão do *bit* no meio, mesmo que este não chegue até o Rx devido ao espalhamento no canal (Kilinc & Akan, 2013b; Moore *et al.*, 2009).

A entropia de Shannon (Band & Avishai, 2013), $H(X)$, pode ser usada para representar o volume de informação (em *bits*) em vários processos dos sistemas biológicos (Abshire & Andreou, 2001). Sendo X e Y os conjuntos de estados possíveis para os *bits* do Tx e os *bits* do Rx , respectivamente ($X = \{0, 1\}$, $Y = \{0, 1\}$) e p , o conjunto de probabilidades para o Tx enviar o *bit* x ou o Rx receber o *bit* y , $H(X)$ pode ser calculado pela Equação 4.17.

$$H(X) = - \sum_{x \in X} p(x) \cdot \log_2 (p(x)) \quad (4.17)$$

Assim, a entropia condicional pode ser definida a partir da distribuição de probabilidade de junção e da distribuição de probabilidade condicional de x e y :

$$H(X|Y) = - \sum_{x \in X} \sum_{y \in Y} p(x, y) \cdot \log_2 (p(x|y)) \quad (4.18)$$

As demais probabilidades são obtidas por intermédio das Eqs. 4.19– 4.22.

$$p(x) = \begin{cases} p(x = 0), & \text{ou} \\ p(x = 1) \end{cases} \quad (4.19)$$

$$p(y) = \begin{cases} p(y = 0), & \text{ou} \\ p(y = 1) \end{cases} \quad (4.20)$$

$$p(y = 0|x = 0) = 1 - p(y = 1|x = 0) \quad (4.21)$$

$$p(y = 0|x = 1) = 1 - p(y = 1|x = 1) \quad (4.22)$$

A capacidade do canal é, então, determinada pela Equação 4.23, que descreve o máximo valor retornado pela informação mútua, obtida conforme a Equação 4.24, que determina a dependência mútua entre as duas variáveis x e y .

$$C(X; Y) = \max[I(X; Y)] \quad (4.23)$$

$$\begin{aligned} I(X; Y) &= H(X) - H(X|Y), \\ &= \sum_{y \in Y} \sum_{x \in X} p(x)p(y|x) \log_2 \left(\frac{p(y|x)}{p(y)} \right) \end{aligned} \quad (4.24)$$

Finalmente, a taxa de erro de *Bit* (BER - *Bit Error Rate*) é calculada a partir da comparação dos sinais $X^*[k]$ e $Y[k]$ de acordo com os *bits* enviados e recebidos. De modo que a BER é obtida pela relação entre a quantidade de *bits* recebidos não correspondentes aos enviados pelo Tx (B_{erro}) e a quantidade total de *bits* enviados (B_{total}), conforme a Equação 4.25.

$$BER = \frac{B_{erro}}{B_{total}} \quad (4.25)$$

Os parâmetros de entrada do sistema são definidos no começo da simulação, conforme ilustrado na Figura 4.1, e estão descritos na Tabela 4.2, assim como algumas variáveis de destaque do modelo. O valor ajustado para A foi de $0,5 \mu\text{M}$, que corresponde à amplitude média de oscilação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nos canais de IP_3 , segundo Barros & Dey (2017b). A linha de base (LB) das concentrações moleculares do sistema, ou seja, os valores iniciais para $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_o$, $[\text{Na}^+]_i$, $[\text{Na}^+]_o$, $[\text{K}^+]_i$ e $[\text{K}^+]_o$ foram definidos conforme observado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Parâmetros de entrada e algumas variáveis de destaque do modelo.

Parâmetros de Entrada		
Parâmetro	Valor	Referência
A	$0,5 \mu\text{M}$	Barros & Dey (2017b)
f	$0,1-1 \text{ Hz}$	Barros <i>et al.</i> (2018)
T_t	200 s	Barros <i>et al.</i> (2018)
LB $[\text{Ca}^{2+}]_i$	$0,1 \mu\text{M}$	Barros <i>et al.</i> (2015b)
LB $[\text{Ca}^{2+}]_o$	$10 \mu\text{M}$	Kirischuk <i>et al.</i> (1997)
LB $[\text{Na}^+]_i$	$15000 \mu\text{M}$	Chatton <i>et al.</i> (2016)
LB $[\text{Na}^+]_o$	$666 \mu\text{M}$	Chatton <i>et al.</i> (2016)
LB $[\text{K}^+]_i$	$140000 \mu\text{M}$	Vogt <i>et al.</i> (2019)
LB $[\text{K}^+]_o$	$4000 \mu\text{M}$	Wang <i>et al.</i> (2012)
α	$0,01 \mu\text{M}$	Barros <i>et al.</i> (2015b)
T_b	$0,01-0,1 \text{ s}$	Koo <i>et al.</i> (2015)
σ_0	$2 \times \alpha (\mu\text{M})$	-
β	1	-
Variáveis de destaque		
Variável	Descrição	
$x_1[k]$	Contribuição da sinalização de Ca^{2+} em $[\text{Ca}^{2+}]_i (\mu\text{M})$	
$x_2[k]$	Contribuição da sinalização de Na^+ em $[\text{Ca}^{2+}]_i (\mu\text{M})$	
$x_3[k]$	Contribuição do NCX em $[\text{Ca}^{2+}]_i (\mu\text{M})$	
$x_4[k]$	Contribuição da NKP em $[\text{Ca}^{2+}]_i (\mu\text{M})$	
$x_5[k]$	Contribuição da CP em $[\text{Ca}^{2+}]_i (\mu\text{M})$	
$X[k]$	Resultante da combinação dos modelos, em função de $[\text{Ca}^{2+}]_i$	
$X^*[k]$	$X[k]$ modulado (<i>bits</i>)	
C_b	Volume de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transmitido durante T_b segundos (μM)	
$Y[k]$	Sinal recebido após detecção (<i>bits</i>)	
$g[k]$	Variações de $[\text{Ca}^{2+}]_o (\mu\text{M})$	

Resultados e Discussões

Neste capítulo, são expostos os resultados obtidos para o modelo computacional desenvolvido, no qual, foram implementadas as sinalizações de Ca^{2+} e de Na^+ , as reações do canal trocador de Ca^{2+} e Na^+ (NCX), da bomba de Na^+ e K^+ (NKP) e, finalmente, da bomba de Ca^{2+} (CP), que representam modelos de estruturas de transporte iônico transmembranaral.

Desse modo, foi realizada uma análise do comportamento da propagação do sinal intracelular de Ca^{2+} ($X[k]$) sob influência da composição do canal, que consiste em um arranjo dos modelos de reações do NCX, da NKP, da CP e das sinalizações de Ca^{2+} e de Na^+ . Na Seção 5.1, o canal composto pelas reações do NCX e da sinalização de Ca^{2+} (chaves c_1 e c_3 fechadas) foi analisado a fim de determinar a proporção da ocorrência de reações do primeiro em relação ao segundo, devido à característica particular do fluxo iônico do NCX.

Os resultados foram discutidos de acordo com as métricas escolhidas para a avaliação do sistema de comunicação: capacidade do canal, taxa de erro de bit, ganho de comunicação e relação sinal-ruído. Como pode ser visto nas seções 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5, para cada métrica, foram analisadas as demais combinações dos modelos de reações definidos no Capítulo 4. Finalmente, na Seção 5.6, é realizada uma comparação entre os modelos de reações para os resultados que se destacaram em cada métrica de avaliação.

Para facilitar a menção das combinações entre os modelos de reações, foi definido um sistema simbólico de chaves, que representa a escolha de uma determinada reação para compor o canal do sistema de comunicação, conforme explicado na Seção 4.1 e descrito na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Descrição do sistema de chaves para representação da composição do canal escolhida.

Combinação de chaves	Composição do canal
Apenas c_1 fechada	Apenas sinalização de Ca^{2+}
c_1 e c_3 fechadas	Sinalização de Ca^{2+} e NCX
c_1 , c_2 e c_3 fechadas	Sinalizações de Ca^{2+} e de Na^+ e NCX
c_1 , c_3 , c_4 e c_5 fechadas	Sinalização de Ca^{2+} , NCX, NKP e CP
Todas as chaves fechadas	Sinalizações de Ca^{2+} e de Na^+ , NCX, NKP e CP

5.1 – Determinação do número de reações do NCX

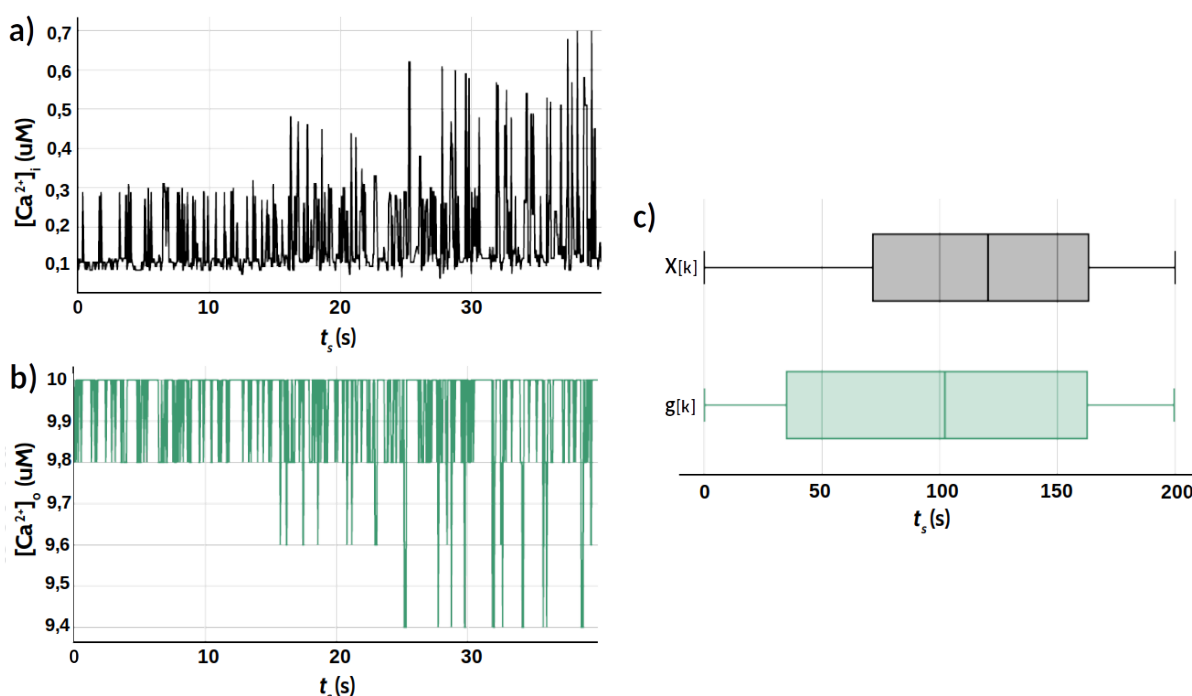
No processo de simulação, foi observado que as reações do NCX são mais rápidas do que as demais, possibilitando uma ocorrência na ordem de 10, 20, 30, 40 e até 50 vezes maior que a ocorrência das reações da sinalização de Ca^{2+} , que é o modelo de referência do presente trabalho. De acordo com o sugerido nos Capítulos 2 e 3, essa diferença pode ser entendida pela difusão do Ca^{2+} no tecido (reação mais recorrente desse modelo de sinalização) depender unicamente da diferença de concentração molecular entre as células como fator de estímulo da reação, enquanto que o NCX também é fortemente estimulado pela variação da tensão de membrana (V_m), como pode ser observado nas equações 2.14 e 3.1.

Além disso, segundo Kirischuk *et al.* (2012) e Brazhe *et al.* (2018), há uma elevada disposição do tecido para a troca dos íons de Ca^{2+} e Na^+ com o meio extracelular, considerando a alta densidade dessas moléculas, aumentando o fluxo iônico e favorecendo ainda mais a ocorrência das reações do NCX. Desse modo, o propósito desta seção é analisar o sistema composto pelo NCX e pela sinalização de Ca^{2+} (c_1 e c_3 fechadas) considerando a proporção da quantidade de reações dos modelos, a fim de determinar o número de reações de NCX (N_{NCX}) que possibilite a análise das demais combinações dos modelos de acordo com o objetivo geral desta dissertação. Os valores de 10 NCX, 20 NCX, 30 NCX, 40 NCX e 50 NCX (lê-se como 10 reações de NCX para cada reação da sinalização de Ca^{2+} , por exemplo) foram obtidos empiricamente na simulação do sistema.

O NCX promove a troca de Ca^{2+} e Na^+ com o meio extracelular, causando a variação na concentração molecular desse meio, que por sua vez, influencia no meio intracelular. A Figura 5.1 analisa o comportamento das variações das concentrações intracelulares e extracelulares de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ e $[\text{Ca}^{2+}]_o$), conhecidas como sinal ($X[k]$) e ruído do sistema ($g[k]$), respectivamente. As Figuras 5.1 a) e 5.1 b) mostram $X[k]$ e $g[k]$, respectivamente,

ao longo dos primeiros 35s de simulação e evidenciam a influência do ruído no sinal, visto que enquanto $g[k]$ diminui, $X[k]$ aumenta proporcionalmente ($0,6 \mu M$ de variação). Este comportamento indica que o NCX está funcionando no modo reverso (fluxo de Na^+ para fora e de Ca^{2+} para dentro da célula) e indica a influência do mesmo nas reações de difusão intracelular do cálcio, visto que estas são estimuladas pelas variações em $[\text{Ca}^{2+}]_i$, interferindo na propagação de $X[k]$.

Figura 5.1 – Comportamento do sinal e do ruído ao longo do tempo de simulação. **a)** Variação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para os primeiros 35 s de simulação. **b)** Variação de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ para os primeiros 35 s de simulação. **c)** Dispersão de $X[k]$ e $g[k]$ ao longo do tempo total de simulação.

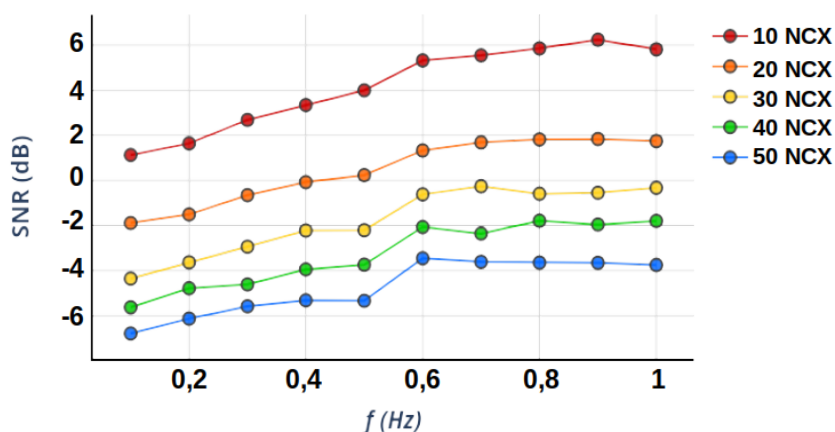


Fonte: Elaborada pelo autor.

Além disso, a Figura 5.1 c) mostra que cerca de 75% do sinal $X[k]$ e do ruído $g[k]$ se propagam antes de 160–165 s de simulação, embora $X[k]$ seja menos disperso ao longo do tempo em relação a $g[k]$, já que o primeiro está mais concentrado em um determinado período de t_s e o segundo alcança 25 % de sua propagação ainda no primeiro quarto de t_s . Isso pode ser explicado pois, de acordo com as Figuras 5.1 a) e 5.1 b), ainda que $X[k]$ e $g[k]$ apresentem a mesma variação em μM , percentualmente, a variação em $X[k]$ é muito maior (600%), devido à baixa linha de base de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($0,1 \mu M$), em comparação com a elevada linha de base de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ($10 \mu M$). Ou seja, uma variação considerada pequena em $[\text{Ca}^{2+}]_o$ causa uma grande variação em $[\text{Ca}^{2+}]_i$, justificando a alta interferência de $g[k]$ em $X[k]$ e a diferença em suas dispersões ao longo de t_s .

Observando as curvas da SNR traçadas alterando o valor de N_{NCX} , é possível analisar a influência direta das reações do NCX no sinal $X[k]$. A Figura 5.2 mostra o comportamento da SNR, calculada de acordo com a Equação 4.13 (Seção 4.4), para cada valor de N_{NCX} escolhido, ao longo da faixa de frequência (f) do estímulo de entrada ($S[k]$).

Figura 5.2 – Análise da SNR por número de reações do NCX.



Fonte: Elaborada pelo autor.

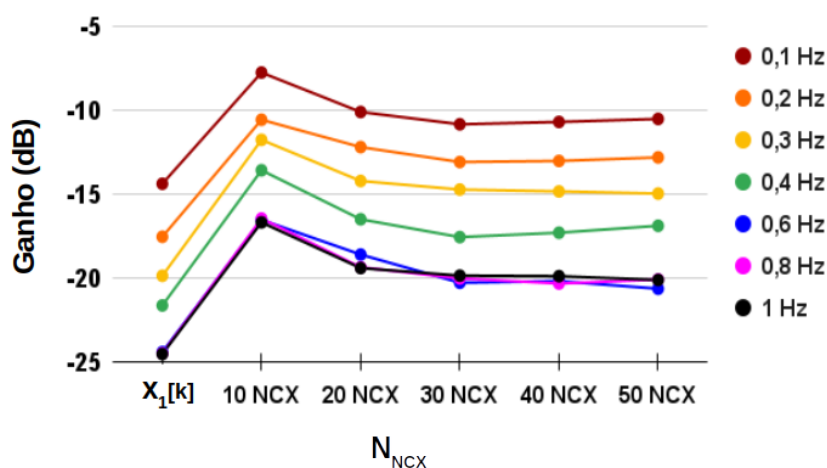
Primeiramente, pode-se observar que a SNR cresce à medida que a faixa de frequência aumenta, devido ao fato de que quanto maior o valor de f , mais moléculas de Ca^{2+} são introduzidas no sistema num mesmo período de tempo, aumentando $[Ca^{2+}]_i$ e, conseqüentemente, $X[k]$, que eleva a SNR (Equação 4.13). No entanto, a partir de 0,6 Hz, a inclinação das curvas diminui, com variações mais sutis à medida que f aumenta, tendendo a se tornar constante, para todos os valores de N_{NCX} . Esse comportamento sugere que, para maiores frequências, a energia de $g[k]$ se eleva proporcionalmente à energia do sinal, fazendo com que a curva logarítmica se aproxime da sua assíntota horizontal.

A partir da Figura 5.2, é possível perceber também que a SNR diminui com o aumento de N_{NCX} . Isso acontece, pois com o aumento das trocas com o meio extracelular devido à atuação do NCX, que está no modo reverso, $g[k]$ aumenta proporcionalmente. Contudo, também pode ser observado que as curvas da SNR se tornam menos espaçadas entre si para os maiores valores de N_{NCX} , para qualquer valor de f , surgindo uma espécie de *zona de saturação*, ou seja, a SNR tende a variar mais discretamente a partir de um determinado número de reações do NCX, fazendo com que a curva de $N_{NCX} = 10$ NCX possa ser considerada um *outlier*¹ do espaço amostral analisado.

¹Dados que se diferenciam do padrão de um determinado espaço amostral.

De forma semelhante, analisando o ganho de $[Ca^{2+}]_i$ médio (Equação 4.16) ilustrado na Figura 5.3, é possível perceber que este decresce com o aumento de f e de N_{NCX} . Esse comportamento acontece, pois a elevação da frequência de $S[k]$ implica em maior introdução de $[Ca^{2+}]_i$ no Tx , que se diferencia cada vez mais da concentração no Rx , aumentando a relação descrita na Equação 4.16. Analogamente, o aumento de N_{NCX} também provoca a elevação dos níveis de $[Ca^{2+}]_i$ no Rx , diminuindo a diferença em relação ao Tx . Além disso, é relevante apontar que o ganho obtido para o canal composto unicamente pela sinalização de Ca^{2+} ($X[k] = x_1[k]$, apenas c_1 fechada) apresentou o menor valor para seus respectivos valores de f .

Figura 5.3 – Ganho de comunicação médio por número de reações do NCX.



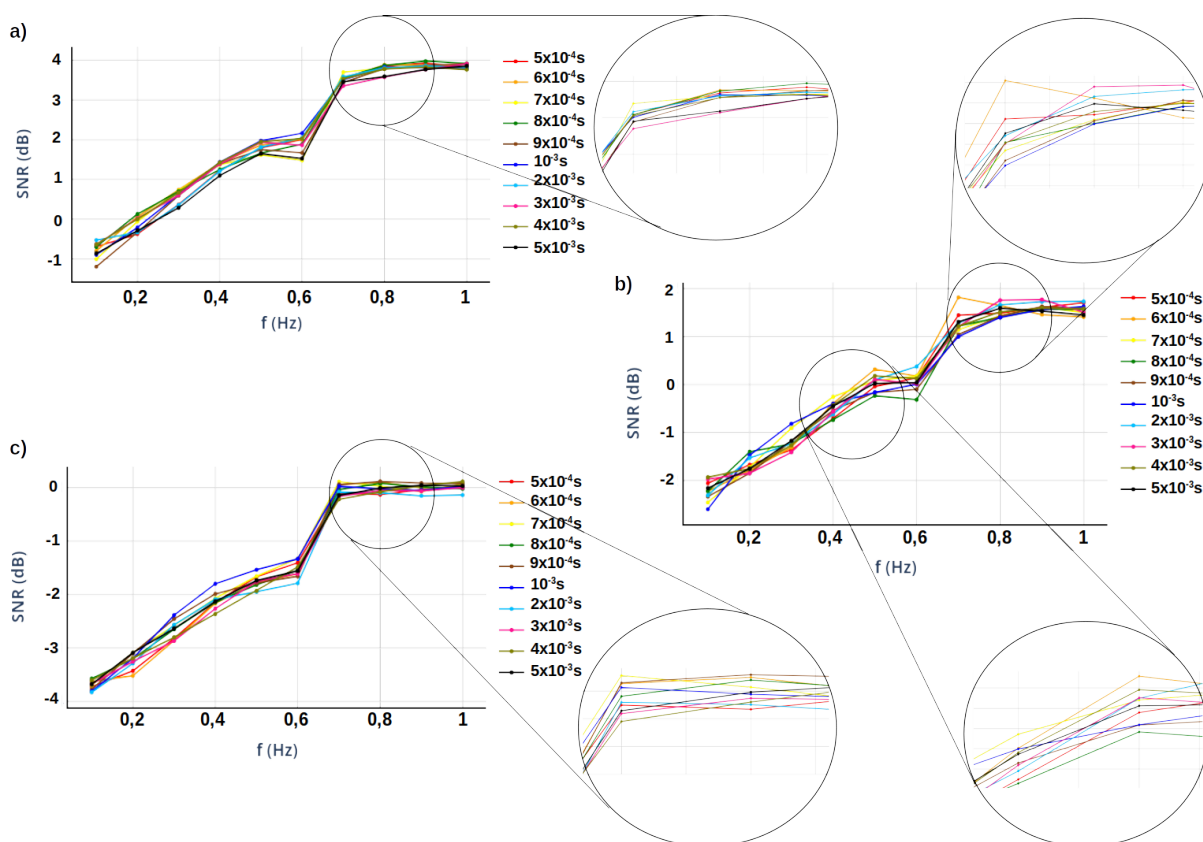
Fonte: Elaborada pelo autor.

A zona de saturação observada na Figura 5.2 também pode ser destacada no comportamento do ganho para ambas as variáveis independentes, f e N_{NCX} . Visto que as curvas são descritas como uma exponencial decrescente, para $N_{NCX} \geq 30 NCX$, o ganho é tendenciado a se manter constante para todos os valores de f . O mesmo acontece ao observar a variação do ganho na perspectiva da frequência, de modo que para $f > 0,4 Hz$, as curvas se coincidem. Novamente, $N_{NCX} = 10 NCX$ se destacou em relação aos demais, apresentando o maior ganho para todos os valores de f . Por este motivo, a fim de evitar a seleção de um *outlier*, o próximo valor de N_{NCX} (20 NCX) foi escolhido para a realização da análise do sistema de acordo com as métricas descritas nas próximas seções deste capítulo.

5.2 – Análise da relação sinal-ruído

A relação sinal-ruído (SNR) do sistema de comunicação molecular desenvolvido compara o nível de $X[k]$ em relação ao nível de $g[k]$, em dB, que é oriundo das reações moleculares decorrentes da atuação das estruturas de transporte iônico e, portanto, esta análise não se aplica ao canal composto puramente pela sinalização de Ca^{2+} . A Figura 5.4 esboça a SNR obtida para as composições do canal que incluem as estruturas de transporte.

Figura 5.4 – Relação Sinal-Ruído por T_b para as composições do canal que consideram as estruturas de transporte iônico. **a)** c_1, c_2 e c_3 fechadas. **b)** c_1, c_3, c_4 e c_5 fechadas. **c)** Todas as chaves fechadas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível perceber que o aumento da frequência de $S[k]$ diminui a interferência de $g[k]$ em $X[k]$, visto que a SNR aumenta para todas as composições de canal, ou seja, o nível de sinal propagado é maior do que a amplitude do ruído que trafega do meio extracelular para o meio intracelular. Isso acontece, pois o aumento de f estimula as reações de difusão intercelular (via canais GJ), propagando um maior volume de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à medida em que o Tx introduz mais moléculas no sistema em um mesmo período de tempo, elevando a transmissão de $X[k]$. Isso não significa dizer, porém, que as reações das estruturas diminuem, mas que as reações da

sinalização de Ca^{2+} aumentam. Além disso, a zona de saturação discutida na Seção 5.1 também pode ser observada no resultado descrito na Figura 5.4, de modo que a partir de 0,7 Hz, a SNR tende a ser constante, indicando que acima desse valor de f , o sinal e o ruído passam a crescer proporcionalmente. Analisando em relação ao T_b , pode-se dizer que a influência dessa grandeza no comportamento da SNR é baixa, já que não houve variação significativa entre as curvas para todos os modelos de reações discutidos.

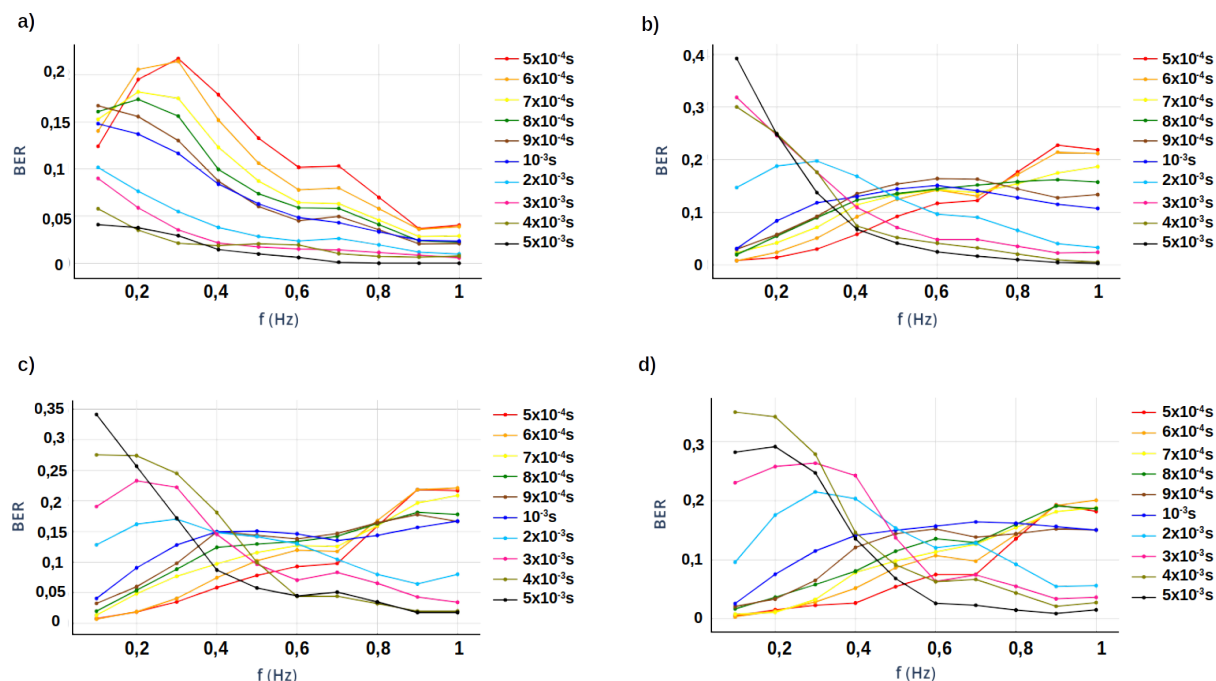
Nota-se ainda que quando a única estrutura de transporte presente é o NCX (Figura 5.4 **a**)), a SNR é maior (variando de -1 dB a 4 dB), seguido pela adição das demais estruturas (Figura 5.4 **b**)) e pela adição da sinalização de Na^+ (Figura 5.4 **c**)), que variam de -2 dB a 2 dB e -4 dB a 0 dB, respectivamente. Esse resultado indica que a adição da NKP e da CP aumentou a influência do ruído, visto que favorecem às trocas com o meio extracelular, assim também como a adição da sinalização de Na^+ , que, junto com a NKP, contribui indiretamente para a variação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, como visto nos Capítulos 2 e 3.

5.3 – Análise da taxa de erro de Bit

A Figura 5.5 mostra os resultados obtidos para a taxa de erro de bit (BER) para todas as composições do canal propostas em relação à frequência de entrada (f), variando o tempo de duração do *bit* (T_b). Inicialmente, é importante salientar que aumentar o T_b favorece a transmissão e a recepção de *bits* 1, pois ao contar com uma janela de tempo maior para a determinação do *bit* na modulação e na demodulação, o volume de Ca^{2+} trafegado naquele período de tempo (C_b) será maior e, conseqüentemente, maior será a chance de o C_b superar o limiar de concentração estabelecido (σ_0), de acordo com o explicado na Seção 4.3. Um raciocínio análogo pode ser aplicado para f , pois aumentando a frequência de $S[k]$, maior será o C_b transmitido para um mesmo período de tempo.

A Figura 5.5 **a**) esboça o comportamento da BER para o canal composto puramente pela sinalização de Ca^{2+} e reflete o raciocínio explicado no parágrafo anterior à medida em que revela que a taxa de erro diminui com o aumento de f e de T_b , pois o favorecimento da transmissão, e conseqüente recepção, de *bits* 1 diminui a probabilidade de o sistema confundir *bits* 0 por *bits* 1 e vice-versa. É possível perceber ainda na Figura 5.5 **a**) que, para as curvas com $T_b \leq 8 \times 10^{-4}$ s, há uma mudança de comportamento a partir dos valores de $f = 0,2$ Hz e $f = 0,3$ Hz, tornando esses dois valores de frequência os pontos mais críticos da análise.

Figura 5.5 – Taxa de Erro de Bit por T_b para cada combinação dos modelos de reações. **a)** Apenas c_1 fechada. **b)** c_1, c_2 e c_3 fechadas. **c)** c_1, c_3, c_4 e c_5 fechadas. **d)** Todas as chaves fechadas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao considerar outros modelos de reações, como pode ser observado nas Figuras 5.5 **b)**, **c)** e **d)**, ocorre uma inversão de comportamento. Para $T_b \leq 10^{-3}$ s, a BER é diretamente proporcional à frequência de entrada, enquanto que essas duas grandezas tornam a ser inversamente proporcionais para $T_b > 10^{-3}$ s. A adição dos modelos de reações que permitem a troca de Ca^{2+} com o meio extracelular provoca a interferência de $g[k]$ em $X[k]$, de modo que o aumento em $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oriundo das trocas com o $[\text{Ca}^{2+}]_o$ diminui o fluxo de moléculas advindas da difusão intercelular, visto que esta é regida pela Equação 2.14 e depende diretamente da diferença de concentração molecular entre as células. Em outros termos, essa diminuição no fluxo de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é traduzida como um atraso em $X[k]$, pois maior será o tempo necessário na demodulação para que C_b seja suficientemente grande a fim de superar σ_0 , aumentando a probabilidade de os *bits* serem interpretados como 0 na recepção.

Assim, o resultado exposto nas Figuras 5.5 **b)**, **c)** e **d)** revela que abaixo de determinado valor de T_b , o aumento da propagação de *bits* 1, devido ao aumento da frequência, provoca mais erros na recepção, pois a janela de tempo na demodulação não é grande o suficiente para compensar o atraso em $X[k]$. Para $T_b > 10^{-3}$ s, no entanto, a janela de tempo passa a compensar o efeito da interferência, possibilitando, portanto, maior detecção de *bits* 1, de modo que o aumento da frequência agora diminui a taxa de erro. Essa transição de comportamento também

ocorre em relação a f , visto que para $f < 0,4$ Hz, a BER é diretamente proporcional ao T_b , enquanto que essa proporcionalidade se inverte para $f > 0,7$ Hz. A faixa de 0,4 Hz e 0,7 Hz pode ser considerada uma zona de transição.

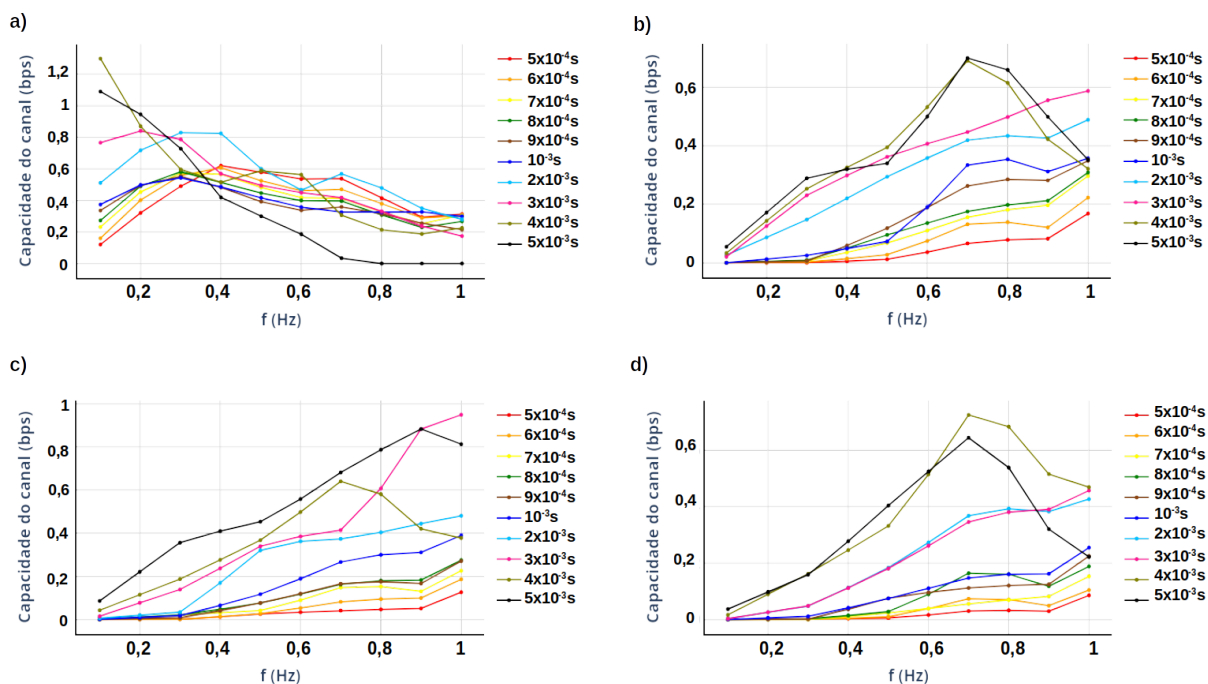
Além disso, pode-se observar ainda na Figura 5.5 que a taxa de erro média entre as curvas aumentou ao adicionar os demais modelos de reações, devido a atuação do ruído $g[k]$ no sistema, ao mesmo tempo em que se nota um comportamento semelhante entre as curvas das combinações em que se considera as estruturas de transporte iônico. Tal análise será melhor discutida na Seção 5.6.

5.4 – Análise da capacidade do canal

A capacidade do canal, por sua vez, pode ser avaliada a partir da Figura 5.6, que esboça essa métrica para todos os canais analisados por este trabalho. Para o canal composto apenas pela sinalização de Ca^{2+} (Figura 5.6 **a**)), é possível observar que a capacidade é majoritariamente decrescente com o aumento de f , apresentando uma mudança de comportamento para os valores de T_b inferiores a 3×10^{-3} s, visto que as curvas pertencentes a este intervalo são diretamente proporcionais à frequência de $S[k]$ quando esta é inferior a 0,4 Hz, aproximadamente, e mudam essa proporcionalidade acima desse valor de frequência. Para $T_b = 4 \times 10^{-3}$ s e $T_b = 5 \times 10^{-3}$ s, a capacidade do canal é sempre decrescente, enquanto que a curva de $T_b = 3 \times 10^{-3}$ s representa um estado de transição.

O comportamento de diminuição da capacidade do canal com o aumento de f pode ser explicado, pois para um canal livre de ruídos, onde a taxa de erro de *bit* é baixa, o aumento da frequência do sinal de entrada, ainda que reduza a BER (Figura 5.5 **a**)), implica na diminuição da quantidade de *bits* 0 trafegados no sistema, diminuindo a taxa de transmissão total e, conseqüentemente, a capacidade da comunicação do sistema, visto que esta depende da probabilidade de transmissão de ambos os *bits* (Equação 4.23). O mesmo acontece para o tempo de *bit*, de modo que a elevação dessa grandeza reduz o número total de *bits* propagados, visto que maior será o C_b necessário para a determinação de um único *bit*. Quando f está abaixo de 0,4 Hz, no entanto, a BER elevada faz com que o aumento de f tenha um efeito positivo para a capacidade do canal para os menores valores de T_b , já que estes tornam o sistema mais susceptível à permutação entre 0 e 1.

Figura 5.6 – Capacidade do canal por T_b para cada combinação dos modelos de reações. **a)** Apenas c_1 fechada. **b)** c_1, c_2 e c_3 fechadas. **c)** c_1, c_3, c_4 e c_5 fechadas. **d)** Todas as chaves fechadas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O mesmo raciocínio pode ser utilizado para analisar o comportamento da capacidade do canal composto pelos demais modelos de reações. Ao observar as Figuras 5.6 **b)**, **c)** e **d)**, é possível perceber que a adição das estruturas de transporte ao sistema provocou uma mudança na proporcionalidade entre a capacidade do canal e a frequência de entrada, fazendo com que sejam diretamente proporcionais para o intervalo de f analisado em quase todas as curvas de T_b . Esse resultado se justifica realizando uma mudança na perspectiva da análise, de modo que em um cenário com a influência de ruído, onde a taxa de erro de *bit* é significativa, o aumento da frequência eleva a capacidade do canal pela diminuição da BER, superando o efeito discutido no parágrafo anterior.

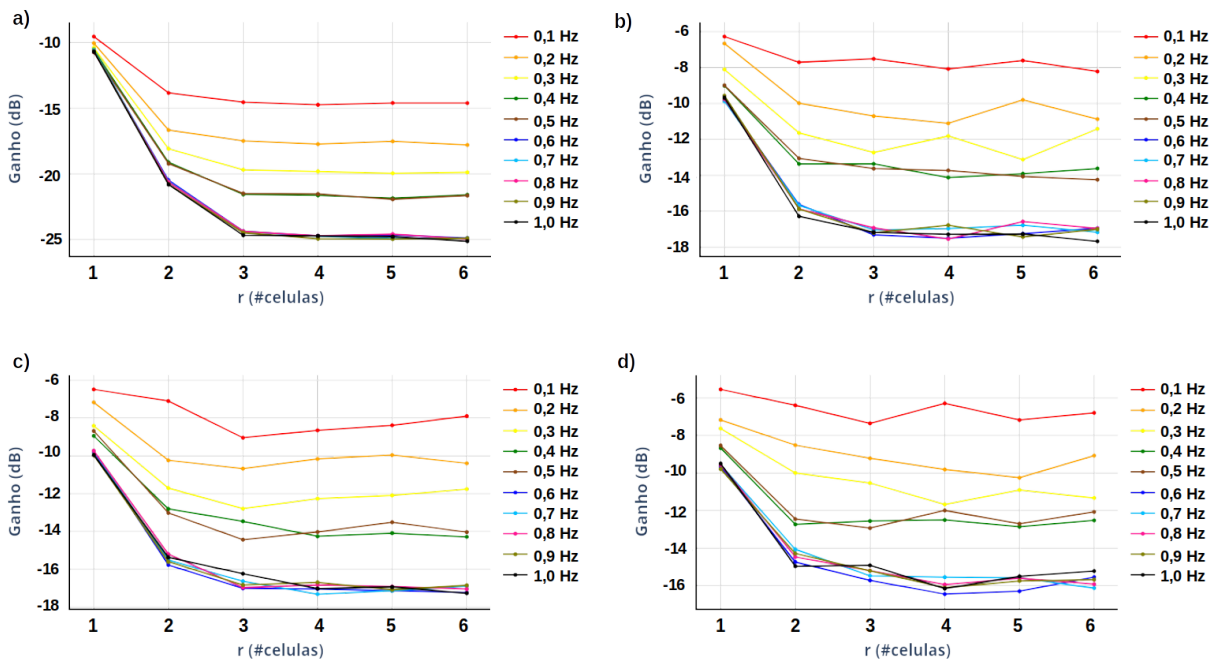
É importante salientar que, ainda que a capacidade do canal cresça, os valores da mesma, em média, não superaram os resultados retornados pelo canal da sinalização de Ca^{2+} , visto que os números dos novos modelos não ultrapassam 1 bps em todos os casos analisados, atingindo cerca de 0,7 bps para as configurações das Figuras 5.6 **b)** e **d)**. Além disso, a inversão no comportamento para $T_b = 4 \times 10^{-3}$ s e $T_b = 5 \times 10^{-3}$ s a partir de 0,7 Hz, aproximadamente, sugere que a partir de uma dada combinação entre T_b e f , o efeito discutido para o canal composto puramente pela sinalização de Ca^{2+} se torna o fator determinante para inverter

a proporcionalidade entre f e a capacidade do canal, correspondendo também ao intervalo apontado na Seção 5.2 em que o sinal e o ruído passam a crescer na mesma proporção.

5.5 – Análise do ganho de comunicação

Quanto ao ganho de comunicação, cujos resultados estão exibidos na Figura 5.7, o comportamento das curvas mostra-se semelhante para todas as composições do canal, refletindo uma exponencial decrescente à medida em que a distância (r), em células, entre o Tx e o Rx aumenta. Figura 5.7 a) mostra o ganho de $[Ca^{2+}]_i$, de acordo com a Equação 4.16, para o canal composto apenas pela sinalização de Ca^{2+} . Observa-se que o ganho diminui exponencialmente para $r < 3$ células, se tornando constante a partir desse valor.

Figura 5.7 – Ganho de comunicação por f para cada combinação dos modelos de reações. **a)** Apenas c_1 fechada. **b)** c_1, c_2 e c_3 fechadas. **c)** c_1, c_3, c_4 e c_5 fechadas. **d)** Todas as chaves fechadas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A queda de aproximadamente 150% para os maiores valores de frequência reflete que ao aumentar a distância do receptor, aumenta-se também a dificuldade para as moléculas de Ca^{2+} alcançarem o destino desejado, ou seja, o sinal $X[k]$ é atenuado. A partir de $r = 3$ células, no entanto, o sistema entra em um tipo de zona de saturação, discutida na Seção 5.1, de modo que a atenuação de $X[k]$ atingiu um valor tal que não sofre mais o efeito do aumento de r . Essa zona de saturação também pode ser percebida analisando o ganho em relação a f , visto que a

queda de aproximadamente 2,5 dB, em média, é interrompida a partir de $f = 0,6$ Hz, quando as curvas podem ser consideradas estatisticamente iguais.

Como explicado nas seções anteriores, o aumento de f eleva a propagação de Ca^{2+} para um mesmo período de tempo, permitindo que mais informação de $X[k]$ seja transmitida para o Rx, até que para um dado valor de f , a influência sobre o ganho de comunicação diminui, pois o $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no Tx eleva-se de tal forma que o aumento de concentração no Rx é insignificante, percentualmente.

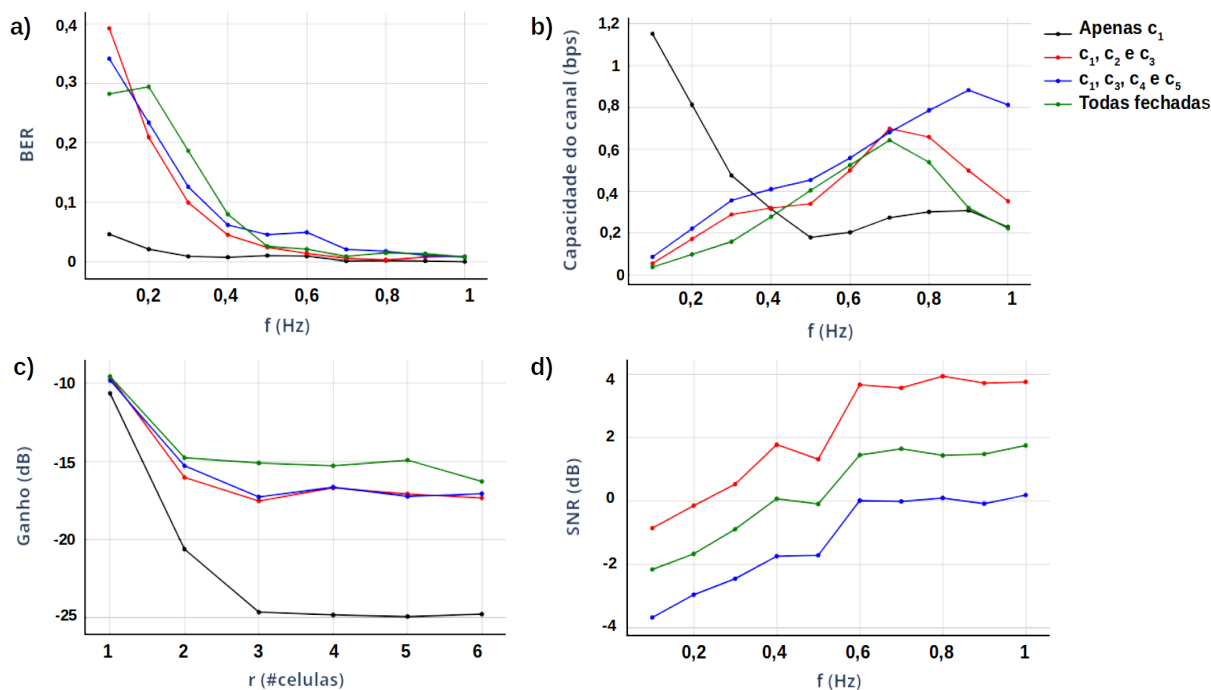
Com a adição das estruturas de transporte iônico, cujos resultados estão expostos nas Figuras 5.7 b), c) e d), o comportamento exponencial do ganho se expressa novamente, embora a queda percentual tenha diminuído para cerca de 60% nas maiores frequências, apresentando curvas mais achatadas para $f = 0,1$ Hz. Além disso, ambas as zonas de saturação também podem ser percebidas, bem como a ordem das curvas de acordo com seus valores de frequência. No entanto, nota-se que o valor médio do ganho aumentou em relação ao resultado da primeira composição do canal, chegando a um valor máximo de -6 dB, aproximadamente.

Esse resultado indica que a adição das estruturas contribuiu para o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no Rx, mas não necessariamente reflete maior detecção do sinal, visto que muitas moléculas são oriundas do meio extracelular e, portanto, também são resultado da interferência do ruído $g[k]$, que corrobora também com a característica mais caótica das curvas, uma vez que a variabilidade do sistema aumentou. A comparação geral entre as combinações do canal será melhor discutida na Seção 5.6, a fim de evidenciar a diferença do sistema composto puramente pela sinalização de Ca^{2+} para a composição com os demais modelos de reações.

5.6 – Comparação entre composições dos canais

Finalmente, a Figura 5.8 mostra a comparação dos resultados entre as composições do canal para cada métrica de avaliação. A Figura 5.8 a) mostra a BER para $T_b = 5 \times 10^{-3}$ s e evidencia que a adição dos demais modelos de reações a um canal puramente composto pela sinalização de Ca^{2+} aumenta significativamente a taxa de erro, elevando o valor máximo desta, de aproximadamente 0,05 para aproximadamente 0,35, embora o comportamento exponencial se mantenha e garanta a aproximação dos valores das curvas a partir de 0,7 Hz, alcançando aproximadamente 0.

Figura 5.8 – Comparação dos resultados por composição do canal para cada métrica de avaliação. **a)** Taxa de Erro de Bit para $T_b = 5 \times 10^{-3}$ s. **b)** Capacidade do canal para $T_b = 5 \times 10^{-3}$ s. **c)** Ganho de comunicação $f = 1$ Hz. **d)** Relação Sinal-Ruído para $T_b = 5 \times 10^{-3}$ s.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O comportamento da BER para os canais que incluem as estruturas de transporte é semelhante, bem como os valores atingidos, diferenciando-se ligeiramente a taxa de erro do canal composto por todos os modelos de reações, que apresenta o valor máximo de 0,3, enquanto a configuração de c_1, c_2 e c_3 fechadas atingem 0,4, aproximadamente. Desse modo, considerando a variabilidade do sistema de comunicação desenvolvido, a BER retornada pelos canais que incluem as estruturas podem ser consideradas estatisticamente iguais.

Quanto à capacidade do canal, representada na Figura 5.8 **b)** para $T_b = 5 \times 10^{-3}$ s, a alteração da composição do canal permitiu analisar essa métrica a partir de uma nova perspectiva. Conforme descrito na Seção 5.4, em um cenário mais ruidoso provocado pela adição das estruturas, onde a BER é alta, a capacidade da comunicação passa a ser crescente, de modo que é inferior para $f < 0,4$ Hz e supera a configuração com apenas c_1 fechada a partir desse valor de frequência. Ainda assim, o canal composto unicamente pela sinalização de Ca^{2+} retornou a maior capacidade do canal, com cerca de 1,2 bps, enquanto que a configuração do canal com c_1, c_3, c_4 e c_5 fechadas (exceto a sinalização de Na^+) apresentou 0,9 bps como seu valor máximo, aproximadamente, distinguindo-se das demais composições do canal que incluem as estruturas.

A Figura 5.8 c) esboça a comparação dos canais para o ganho de comunicação em $f = 1$ Hz, que revela um aumento considerável dessa métrica de avaliação com a adição das estruturas de transporte. No entanto, visto que o ganho é calculado considerando a concentração final média de Ca^{2+} intracelular tanto no Tx como no Rx (Equação 4.16), os valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no Rx também representam a contribuição vinda das trocas com o meio extracelular, aumentando o valor da métrica, mas não implicando em uma maior detecção do sinal propriamente dito pelo Rx para essas composições dos canais. De qualquer modo, esse resultado revela a influência significativa da alteração do canal no sistema de comunicação como um todo, visto que a adição das estruturas de transporte representou um aumento médio de aproximadamente 30% dos níveis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ do Rx . Além disso, é importante destacar que a adição da sinalização de Na^+ à composição do canal permitiu elevar o ganho em cerca de 14,30%, em média.

Por fim, a SNR, representada na Figura 5.8 d) para $T_b = 5 \times 10^{-3}$ s, é fundamental para investigar a influência da adição das estruturas no sistema, visto que ela relaciona o sinal com o ruído produzido pelas mesmas. É possível observar que o canal composto pelas estruturas de transporte sem a sinalização de Na^+ aumentou a influência do ruído em cerca de 300%, em média, em relação à configuração de chaves que inclui o NCX juntamente com as sinalizações (c_1 , c_2 e c_3 fechadas). Considerando todos os modelos de reações, no entanto, houve uma redução média na SNR de 100%, aproximadamente, evidenciando que a sinalização de Na^+ provocou uma diminuição da influência de $g[k]$ em $X[k]$ em relação à configuração de c_1 , c_3 , c_4 e c_5 fechadas. Desse modo, a adição das estruturas por si só provocou a maior interferência do ruído extracelular no sinal.

A real necessidade de conhecimento sobre os mecanismos biológicos naturais existentes no cérebro humano, a fim de prover a base de soluções eficazes para o tratamento de doenças como o Alzheimer, por exemplo, demanda o aumento do desenvolvimento de sistemas computacionais que descrevem a propagação de moléculas através dos tecidos nervosos. Tais sistemas favorecem o estudo de aplicações bioinspiradas e de arquiteturas de nanorredes moleculares presentes na natureza. Diante disso, este trabalho propôs o desenvolvimento de um sistema de comunicação molecular em um tecido de astrócitos que se baseasse na propagação de Ca^{2+} , Na^+ e K^+ através de estruturas biológicas responsáveis por regular os níveis de concentração iônica nesse tecido, a fim de avaliar a influência dessas estruturas na transmissão do Ca^{2+} , como molécula de referência do sistema.

A adição das estruturas permitiu que a taxa de erro de bit elevasse seu valor máximo em relação ao sistema de comunicação baseado puramente em sinalização de Ca^{2+} de cerca de 0,05 para cerca de 0,35, mantendo, porém, o comportamento de queda exponencial ao longo da faixa de frequência analisada em pelo menos 4 de 10 valores de tempo de *bit* escolhidos. Além disso, a consideração das reações do NCX, da NKP e da CP proporcionaram também uma nova perspectiva para a análise da capacidade do canal de comunicação, evidenciando a diferença entre um cenário ruidoso e um cenário sem a interferência de moléculas externas ao citosol.

O ganho de comunicação, por sua vez, assim como a relação sinal-ruído, possibilitou o destaque da influência do ruído no sinal de Ca^{2+} , visto que a primeira métrica, por exemplo, aumentou cerca de 30%, em média, devido ao fluxo de moléculas oriundo das trocas com o meio extracelular. A SNR também revelou a diferença entre a atuação das estruturas de transporte, de acordo com as composições de canal escolhidas. Embora as combinações de estruturas tenham apresentado, de modo geral, um comportamento semelhante entre si para todas as métricas de avaliação em termos de morfologia das curvas e das amplitudes alcançadas, a SNR foi mínima

no cenário em que a sinalização de Na^+ não estava presente, revelando que a presença das estruturas iônicas foi suficiente para elevar a interferência do ruído ao seu máximo valor na configuração do sistema analisada.

A sinalização de Na^+ representou um meio para a estabelecer o fluxo intracelular de sódio entre as células, a fim de viabilizar e estimular as trocas moleculares com o meio extracelular em todo o tecido, através da bomba de sódio e potássio e do canal trocador de sódio e cálcio, categorizando-se como um mecanismo secundário de influência no sinal.

Desse modo, os resultados expostos e discutidos revelaram o impacto da adição das estruturas de transporte iônico no modelo computacional de um sistema de comunicação molecular, evidenciando a necessidade de levar em consideração diferentes modelos de reações que viabilizam as interações com outras moléculas além do cálcio, a fim de agregar maior robustez à simulação em relação aos sistemas biológicos reais, visto que a implementação de tais modelos implica em significativas mudanças numéricas e analíticas, atendendo ao objetivo geral proposto por este trabalho.

6.1 – Trabalhos Futuros

A análise realizada por esta dissertação de mestrado fomenta o desenvolvimento de trabalhos futuros que investiguem, por exemplo, a utilização de um limiar de concentração (σ_0) variável, que realize o ajuste automático proporcionalmente ao aumento do fluxo de cálcio decorrente da adição das estruturas ou, ainda, do aumento da frequência do sinal de estímulo, a fim de adequar a modulação e a demodulação para diferentes cenários, o que implicaria em uma mudança no sinal transmitido e conseqüentemente, nas métricas de avaliação.

Além disso, pode-se investigar a utilização de diversas células transmissoras e receptoras, desenvolvendo um sistema de múltiplas entradas e múltiplas saídas (MIMO), no qual diferentes topologias de propagação poderiam ser estudadas, alterando a posição relativa entre os Tx e os Rx no tecido tridimensional, explorando, por exemplo, as topologias circular (receptores ao redor dos transmissores), cruz (disposição dos receptores em formato de cruz no tecido 3D) e linha reta (receptores enfileirados no mesmo plano dos transmissores). Para esse trabalho futuro, os conceitos de interferência co-canal e interferência intersimbólica devem ser levados em consideração.

Outro trabalho possível decorre da investigação mais aprofundada das reações que envolvem a molécula de potássio, desde a implementação de outras estruturas de transporte que se baseiam nesta molécula até a inclusão da complexidade biológica e das metodologias matemáticas referentes à variação dos níveis de ATP no tecido de astrócitos. O potássio está presente nos processos mais fundamentais do corpo humano e corresponde a uma das principais moléculas responsáveis pela regulação da homeostase celular (Castillo *et al.*, 2015).

Finalmente, também é relevante realizar uma análise do sistema de comunicação molecular como um circuito RLC (resistivo, indutivo e capacitivo), substituindo o algoritmo estocástico de Gillespie (Gillespie, 1977) por uma metodologia disseminada na área da engenharia elétrica, considerando os conceitos da tensão elétrica, ou diferença de potencial, como a diferença da concentração molecular entre dois meios e a corrente elétrica como o fluxo ordenado de moléculas de cálcio.

Publicações

- ▣ I. S. SILVA; OLIVEIRA, K. R. S.; FARIAS, R. S; REGIS, C. D. M. Avaliação da Influência da Valinomicina via Bomba de Na^+/K^+ na Comunicação Molecular por Sinalização de Ca^{2+} em Astrócitos. In: **Simpósio Brasileiro de Telecomunicações e Processamento de Sinais**, 2020, Florianópolis - SC.

Referências Bibliográficas

- Abshire, Pamela, & Andreou, Andreas G. 2001. Capacity and Energy Cost of Information in Biological and Silicon Photoreceptors. *Proceedings of the IEEE*, **89**(7), 1052–1064.
- Akyildiz, Ian F, Fekri, Faramarz, Sivakumar, Raghupathy, Forest, Craig R, & Hammer, Brian K. 2012. Monaco: fundamentals of molecular nano-communication networks. *IEEE Wireless Communications*, **19**(5), 12–18.
- Alberts, Bruce, Johnson, Alexander, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roberts, Keith, & Walter, Peter. 2002. Carrier proteins and active membrane transport. *In: Molecular Biology of the Cell. 4th edition.* Garland Science.
- Allaman, Igor, Bélanger, Mireille, & Magistretti, Pierre J. 2011. Astrocyte–neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends in neurosciences*, **34**(2), 76–87.
- Alle, Henrik, Roth, Arnd, & Geiger, Jörg RP. 2009. Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science*, **325**(5946), 1405–1408.
- Allen, Nicola J. 2014. Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annual review of cell and developmental biology*, **30**, 439–463.
- Baigent, Stephen, Stark, Jaroslav, & Warner, Anne. 1997a. Modelling the Effect of Gap Junction Nonlinearities in Systems of Coupled Cells. *Journal of Theoretical Biology*, **186**, 223–239.
- Baigent, Stephen, Stark, Jaroslav, & Warner, Anne. 1997b. Modelling the effect of gap junction nonlinearities in systems of coupled cells. *Journal of theoretical biology*, **186**(2), 223–239.
- Band, Yehuda B, & Avishai, Yshai. 2013. *Quantum mechanics with applications to nanotechnology and information science.* Academic Press.

- Baranauskas, Gytis, David, Yaron, & Fleidervish, Ilya A. 2013. Spatial mismatch between the Na⁺ flux and spike initiation in axon initial segment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(10), 4051–4056.
- Barros, M. T., Balasubramaniam, S., & Jennings, B. 2015a. Comparative End-to-end Analysis of Ca²⁺ Signaling-based Molecular Communication in Biological Tissues. *IEEE Transactions on Communications*, **63**(12), 5128–5142.
- Barros, Michael Taynnan. 2017. Ca²⁺-signaling-based molecular communication systems: Design and future research directions. *Nano Communication Networks*, **11**, 103–113.
- Barros, Michael Taynnan, & Dey, Subhrakanti. 2017a. Feed-forward and Feedback Control in Astrocytes for Ca²⁺-based Molecular Communications Nanonetworks. *bioRxiv*, August, 177154.
- Barros, Michael Taynnan, & Dey, Subhrakanti. 2017b. Set Point Regulation of Astrocyte Intracellular Ca²⁺ Signalling. *Pages 315–320 of: The 17th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE NANO 2017)*,.
- Barros, Michael Taynnan, Balasubramaniam, Sasitharan, & Jennings, Brendan. 2015b. Comparative end-to-end analysis of Ca²⁺-signaling-based molecular communication in biological tissues. *IEEE Transactions on Communications*, **63**(12), 5128–5142.
- Barros, Michael Taynnan, Silva, Walisson, & Regis, Carlos Danilo Miranda. 2018. The Multi-Scale Impact of the Alzheimer’s Disease on the Topology Diversity of Astrocytes Molecular Communications Nanonetworks. *IEEE Access*, **6**, 78904–78917.
- Beaugé, LUIS, & DiPolo, REINALDO. 1991. Effects of monovalent cations on Na-Ca exchange in nerve cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **639**, 147–155.
- Bernardinelli, Yann, Magistretti, Pierre J, & Chatton, Jean-Yves. 2004. Astrocytes generate Na⁺-mediated metabolic waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**(41), 14937–14942.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**, 517–529.

- Bilgin, Bilgesu A, Dinc, Ergin, & Akan, Ozgur B. 2018. DNA-based molecular communications. *IEEE Access*, **6**, 73119–73129.
- Blaustein, Mordecai P, & Lederer, W Jonathan. 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological reviews*, **79**(3), 763–854.
- Blaustein, MP, Juhaszova, M, Golovina, VA, Church, PJ, & Stanley, EF. 2002. Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Annals of the new York Academy of Sciences*, **976**(1), 356–366.
- Borges, Ligia F, Barros, Michael T, & Nogueira, Michele. 2020. A Multi-Carrier Molecular Communication Model for Astrocyte Tissues. *Pages 1–6 of: ICC 2020-2020 IEEE International Conference on Communications (ICC)*. IEEE.
- Brady, Scott, Siegel, George, Albers, R Wayne, & Price, Donald. 2011. *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*. Academic press.
- Brazhe, Alexey R, Verisokin, Andrey Y, Vervevko, Darya V, & Postnov, Dmitry E. 2018. Sodium–calcium exchanger can account for regenerative Ca²⁺ entry in thin astrocyte processes. *Frontiers in cellular neuroscience*, **12**, 250.
- Brini, Marisa, & Carafoli, Ernesto. 2011. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **3**(2), a004168.
- Bukaukas, F. F., Bukauskiene, A., Bennett, M. V. L., & Verselis, V. K. 2013. Gating properties of gap junction channels assembled from connexin43 and connexin 43 fused with green fluorescent protein. *Biophysics Journal*, **81**, 137–152.
- Bushong, Eric A, Martone, Maryann E, Jones, Ying Z, & Ellisman, Mark H. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *Journal of Neuroscience*, **22**(1), 183–192.
- Büther, Florian, Lau, Florian-Lennert, Stelzner, Marc, & Ebers, Sebastian. 2017. A formal definition for nanorobots and nanonetworks. *Pages 214–226 of: Internet of Things, Smart Spaces, and Next Generation Networks and Systems*. Springer.

- Carter, Brett C, & Bean, Bruce P. 2009. Sodium entry during action potentials of mammalian neurons: incomplete inactivation and reduced metabolic efficiency in fast-spiking neurons. *Neuron*, **64**(6), 898–909.
- Castillo, Juan P, Rui, Huan, Basilio, Daniel, Das, Avisek, Roux, Benoît, Latorre, Ramon, Bezánilla, Francisco, & Holmgren, Miguel. 2015. Mechanism of potassium ion uptake by the Na⁺/K⁺-ATPase. *Nature Communications*, **6**, 7622.
- Chahibi, Youssef, Pierobon, Massimiliano, Song, Sang Ok, & Akyildiz, Ian F. 2013. A molecular communication system model for particulate drug delivery systems. *IEEE Transactions on biomedical engineering*, **60**(12), 3468–3483.
- Chatton, Jean-Yves, Marquet, Pierre, & Magistretti, Pierre J. 2000. A quantitative analysis of l-glutamate-regulated Na⁺ dynamics in mouse cortical astrocytes: implications for cellular bioenergetics. *European Journal of Neuroscience*, **12**(11), 3843–3853.
- Chatton, Jean-Yves, Magistretti, Pierre J, & Barros, L Felipe. 2016. Sodium signaling and astrocyte energy metabolism. *Glia*, **64**(10), 1667–1676.
- Clapham, David E. 2007. Calcium signaling. *Cell*, **131**(6), 1047–1058.
- Clarke, RJ, Apell, H-J, & Läger, P. 1989. Pump current and Na⁺/K⁺ coupling ratio of Na⁺/K⁺-ATPase in reconstituted lipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **981**(2), 326–336.
- Cooper, Geoffer M. 2000. *The cell: a molecular approach 2nd Edition*.
- Deitmer, Joachim W, & Rose, Christine R. 2010. Ion changes and signalling in perisynaptic glia. *Brain research reviews*, **63**(1-2), 113–129.
- Dermietzel, Rolf. 1998. Gap junction wiring: anew'principle in cell-to-cell communication in the nervous system? *Brain Research Reviews*, **26**(2-3), 176–183.
- Di Leva, Francesca, Domi, Teuta, Fedrizzi, Laura, Lim, Dmitry, & Carafoli, Ernesto. 2008. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Archives of biochemistry and biophysics*, **476**(1), 65–74.

- DiPolo, Reinaldo, & Beauge, Luis. 1986. Reverse Na^+ Ca^{2+} exchange requires internal Ca and/or ATP in squid axons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **854**(2), 298–306.
- DiPolo, Reinaldo, Beauge, Luis, & Rojas, Hector. 1989. In dialyzed squid axons Ca^{2+} activates Ca^{2+} Na^+ and Na^+ Na^+ exchanges in the absence of Ca chelating agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **978**(2), 328–332.
- Egan, Malcolm, Loscri, Valeria, Duong, Trung Q, & Di Renzo, Marco. 2018. Strategies for coexistence in molecular communication. *IEEE transactions on nanobioscience*, **18**(1), 51–60.
- Fleiderovich, Ilya A, Lasser-Ross, Nechama, Gutnick, Michael J, & Ross, William N. 2010. Na^+ imaging reveals little difference in action potential-evoked Na^+ influx between axon and soma. *Nature neuroscience*, **13**(7), 852.
- Foskett, J Kevin, White, Carl, Cheung, King-Ho, & Mak, Don-On Daniel. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiological reviews*, **87**(2), 593–658.
- Ghézali, Grégory, Dallérac, Glenn, & Rouach, Nathalie. 2016. Perisynaptic astroglial processes: dynamic processors of neuronal information. *Brain Structure and Function*, **221**(5), 2427–2442.
- Gillespie, Daniel Thomas. 1977. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *Journal of Physical Chemistry*, **81**(25), 2340–2361.
- Ginsburg, Kenneth S, Weber, Christopher R, & Bers, Donald M. 2013. Cardiac Na^+ – Ca^{2+} exchanger: dynamics of Ca^{2+} -dependent activation and deactivation in intact myocytes. *The Journal of physiology*, **591**(8), 2067–2086.
- Goldbeter, A., Dupont, G., & Berridge, M. J. 1990. Minimal model for signal-induced Ca^{2+} oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **87**, 1461–1465.
- Grandgenett, Paul M, Otsu, Keiko, Wilson, Helen R, Wilson, Mary E, & Donelson, John E. 2007. A function for a specific zinc metalloprotease of African trypanosomes. *PLoS Pathog*, **3**(10), e150.

- Guthrie, Peter B, Segal, Menahem, & Kater, SB. 1991. Independent regulation of calcium revealed by imaging dendritic spines. *Nature*, **354**(6348), 76–80.
- Haim, Lucile Ben, & Rowitch, David H. 2017. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, **18**(1), 31.
- Halidi, Nadia, Boittin, Francois-Xavier, Beny, Jean-Louis, & Meister, Jean-Jacques. 2011. Propagation of fast and slow intercellular Ca²⁺ waves in primary cultured arterial smooth muscle cells. *Cell Regulation*, **50**(5), 459–467.
- Hamilton, Nicola B, & Attwell, David. 2010. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nature Reviews Neuroscience*, **11**(4), 227–238.
- Hardy, John, & Selkoe, Dennis J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *science*, **297**(5580), 353–356.
- Hertz, Leif, Xu, Junnan, Song, Dan, Yan, Enzhi, Gu, Li, & Peng, Liang. 2013. Astrocytic and neuronal accumulation of elevated extracellular K⁺ with a 2/3 K⁺/Na⁺ flux ratio—consequences for energy metabolism, osmolarity and higher brain function. *Frontiers in computational neuroscience*, **7**, 114.
- Hodgkin, Alan L, & Huxley, Andrew F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, **117**(4), 500.
- Hofer, Aldebaran M, & Brown, Edward M. 2003. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, **4**(7), 530–538.
- Houades, Vanessa, Koulakoff, Annette, Ezan, Pascal, Seif, Isabelle, & Giaume, Christian. 2008. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *Journal of Neuroscience*, **28**(20), 5207–5217.
- Jacobs, Maria-Flora. 2019. Effects of Aquatic Acidification on Calcium Uptake in White River Shrimp *Litopenaeus setiferus* Gills.
- Jamali, Vahid, Ahmadzadeh, Arman, Jardin, Christophe, Sticht, Heinrich, & Schober, Robert. 2016. Channel estimation for diffusive molecular communications. *IEEE Transactions on Communications*, **64**(10), 4238–4252.

- Jensen, Thomas P, Buckby, Lucy E, & Empson, Ruth M. 2004. Expression of plasma membrane Ca²⁺ ATPase family members and associated synaptic proteins in acute and cultured organotypic hippocampal slices from rat. *Developmental brain research*, **152**(2), 129–136.
- Kadloor, S., Adve, R. S., & Eckford, A. W. 2012. Molecular Communication Using Brownian Motion With Drift. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, **11**, 89–99.
- Keener, James P., & Sneyd, James. 2008. *Mathematical Physiology: I: Cellular Physiology (Interdisciplinary Applied Mathematics)*. Springer.
- Kilinc, D., & Akan, O. B. 2013a. An Information Theoretical Analysis of Nanoscale Molecular Gap Junction Communication Channel Between Cardiomyocytes. *IEEE Transactions on Nanotechnology*, **12**(2), 129–136.
- Kilinc, D., & Akan, O. B. 2013b. An Information Theoretical Analysis of Nanoscale Molecular Gap Junction Communication Channel Between Cardiomyocytes. *IEEE Transactions on Nanotechnology*, **12**(2), 129–136.
- Kirischuk, Segei, Kettenmann, H, & Verkhratsky, A. 1997. Na⁺/Ca²⁺ exchanger modulates kainate-triggered Ca²⁺ signaling in Bergmann glial cells in situ. *The FASEB journal*, **11**(7), 566–572.
- Kirischuk, Sergei, Kettenmann, Helmut, & Verkhratsky, Alexei. 2007. Membrane currents and cytoplasmic sodium transients generated by glutamate transport in Bergmann glial cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, **454**(2), 245–252.
- Kirischuk, Sergei, Parpura, Vladimir, & Verkhratsky, Alexei. 2012. Sodium dynamics: another key to astroglial excitability? *Trends in neurosciences*, **35**(8), 497–506.
- Kirischuk, Sergei, Héja, László, Kardos, Julianna, & Billups, Brian. 2016. Astrocyte sodium signaling and the regulation of neurotransmission. *Glia*, **64**(10), 1655–1666.
- Koenigsberger, Michèle, Sauser, Roger, Lambole, Mathieu, Bény, Jean-Louis, & Meister, Jean-Jacques. 2004a. Ca²⁺ dynamics in a population of smooth muscle cells: modeling the recruitment and synchronization. *Biophysical journal*, **87**(1), 92–104.

- Koenigsberger, Michele, Sauser, Roger, Lamboley, Mathieu, Beny, Jean-Louis, & Meister, Jean-Jacques. 2004b. Ca²⁺ dynamics in a population of smooth muscle cells: modeling the recruitment and synchronization. *Biophysical Journal*, **87**, 92–104.
- Koo, Bon Hong, Yilmaz, H Birkan, Chae, Chan-Byoung, & Eckford, Andrew. 2015. Detection algorithms for molecular MIMO. *Pages 1122–1127 of: 2015 IEEE International Conference on Communications (ICC)*. IEEE.
- Kowey, Peter R. 2002. The role of potassium. *Pages 151–157 of: Women's Health and Menopause*. Springer.
- Krebs, Joachim, Vasak, Milan, Scarpa, Antonio, & Carafoli, Ernesto. 1987. Conformational differences between the E1 and E2 states of the calcium adenosine triphosphatase of the erythrocyte plasma membrane as revealed by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, **26**(13), 3921–3926.
- Kumar, Nalin M, & Gilula, Norton B. 1996. The Gap Junction Communication Channel. **84**(03), 381–8.
- Kumar, Nalin M., & Gilula, Norton B. 1997. The Gap Junction Communication Channel. *Cell*, **84**, 381–388.
- Kuran, Mehmet S, Yilmaz, Huseyin Birkan, Tugcu, Tuna, & Akyildiz, Ian F. 2011. Modulation techniques for communication via diffusion in nanonetworks. *Pages 1–5 of: 2011 IEEE international conference on communications (ICC)*. IEEE.
- Lallouette, Jules, Pitta, Maurizio De, Ben-Jacob, Eshel, & Berry, Hugues. 2014. Sparse short-distance Connection Enhance Calcium Wave Propagation in a 3D model of astrocytes networks. *Frontiers in Computation Neuroscience*, **8**(45), 1–18.
- Lallouette, Jules, De Pittà, Maurizio, & Berry, Hugues. 2019. Astrocyte networks and intercellular calcium propagation. *Pages 177–210 of: Computational Glioscience*. Springer.
- Langer, Julia, Stephan, Jonathan, Theis, Martin, & Rose, Christine R. 2012. Gap junctions mediate intercellular spread of sodium between hippocampal astrocytes in situ. *Glia*, **60**(2), 239–252.

- Lasser-Ross, Nechama, & Ross, William N. 1992. Imaging voltage and synaptically activated sodium transients in cerebellar Purkinje cells. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **247**(1318), 35–39.
- Lavrentovich, Maxim, & Hemkin, Sheryl. 2008. A mathematical model of spontaneous calcium(II) oscillations in astrocytes. *Journal of Theoretical Biology*, **251**, 553–560.
- Lipowski, Adam, & Lipowska, Dorota. 2012. Roulette-wheel selection via stochastic acceptance. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, **391**(6), 2193–2196.
- Lodish, H, Berk, A, Zipursky, SL, Matsudaira, P, Baltimore, D, & Darnell, J. 2000. Overview of membrane transport proteins. *Molecular cell biology*, 4th edn. WH Freeman, New York.
- Lytton, Jonathan. 2007. Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochemical Journal*, **406**(3), 365–382.
- Matsuoka, Satoshi, Philipson, Kenneth D, & Hilgemann, Donald W. 1996. Multiple Functional States of the Cardiac Na⁺-Ca²⁺ Exchanger: Whole-Cell, Native-Excised, and Cloned-Excised Properties. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **779**(1), 159–170.
- Mirzakhilili, Ehsan, Epureanu, Bogdan I, & Gourgou, Eleni. 2018. A mathematical and computational model of the calcium dynamics in *Caenorhabditis elegans* ASH sensory neuron. *PloS one*, **13**(7), e0201302.
- Moore, Michael J., Suda, Tatsuya, & Oiwa, Kazuhiro. 2009. Molecular Communication: Modelling Noise Effects on Information Rates. *IEEE Transactions on NanoBioScience*, **8**, 169–180.
- Na, Suhail M. 2010. K-ATPase: ubiquitous multifunctional transmembrane protein and its relevance to various pathophysiological conditions. *J Clin Med Res*, **2**(1), 1–17.
- Nakano, T., Suda, T., Okaie, Y., Moore, M. J., & Vasilakos, A. V. 2014. Molecular Communication Among Biological Nanomachines: A Layered Architecture and Research Issues. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, **13**(3), 169–197.
- Nakano, Tadashi, & Liu, Jian-Qin. 2010a. Design and analysis of molecular relay channels: An information theoretic approach. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, **9**(3), 213–221.

- Nakano, Tadashi, & Liu, Jian-Qin. 2010b. Design and Analysis of Molecular Relay Channels: An Information Theoretic Approach. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, **9**, 213–221.
- Nakano, Tadashi, Okaie, Yutaka, & Hara, Takahiro. 2018. *Applications of Molecular Communication Systems*. Cham: Springer International Publishing. Pages 1–6.
- Nedergaard, Maiken. 1994. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science*, **263**(5154), 1768–1771.
- Nicholls, DG, & Ferguson, SJ. 2013. Quantitative bioenergetics (Chapter 3): the measurement of driving forces. *Bioenergetics, 4th edn (Nicholls DG and Ferguson SJ, eds)*, 27–51.
- Noble, Denis, & Herchuelz, Andre. 2007. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in cell function: Conference on Na/Ca Exchange. *EMBO reports*, **8**(3), 228–232.
- North, R Alan. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews*.
- Ogata, Katuya, & Kosaka, T. 2002. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, **113**(1), 221–233.
- Ottolia, Michela, Torres, Natalia, Bridge, John HB, Philipson, Kenneth D, & Goldhaber, Joshua I. 2013. Na/Ca exchange and contraction of the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **61**, 28–33.
- Padányi, Rita, Pászty, Katalin, Penheiter, Alan R, Filoteo, Adelaida G, Penniston, John T, & Enyedi, Ágnes. 2003. Intramolecular interactions of the regulatory region with the catalytic core in the plasma membrane calcium pump. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(37), 35798–35804.
- Palmgren, Micheal G, & Axelsen, Kristian B. 1998. Evolution of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1365**(1-2), 37–45.
- Palop, Jorge J, Mucke, Lennart, & Roberson, Erik D. 2010. Quantifying biomarkers of cognitive dysfunction and neuronal network hyperexcitability in mouse models of Alzheimer's disease: depletion of calcium-dependent proteins and inhibitory hippocampal remodeling. *Pages 245–262 of: Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia*. Springer.

- Paluzzi, Silvio, Alloisio, Susanna, Zappettini, Simona, Milanese, Marco, Raiteri, Luca, Nobile, Mario, & Bonanno, Giambattista. 2007. Adult astroglia is competent for Na⁺/Ca²⁺ exchanger-operated exocytotic glutamate release triggered by mild depolarization. *Journal of neurochemistry*, **103**(3), 1196–1207.
- Parpura, Vladimir, & Verkhratsky, Alexei. 2012a. The astrocyte excitability brief: from receptors to gliotransmission. *Neurochemistry international*, **61**(4), 610–621.
- Parpura, Vladimir, & Verkhratsky, Alexei. 2012b. Homeostatic function of astrocytes: Ca²⁺ and Na⁺ signalling. *Translational neuroscience*, **3**(4), 334–344.
- Parpura, Vladimir, & Verkhratsky, Alexei. 2012c. Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signalling: evolution of the concept. *ASN neuro*, **4**(4), AN20120019.
- Parpura, Vladimir, Heneka, Michael T, Montana, Vedrana, Oliet, Stéphane HR, Schousboe, Arne, Haydon, Philip G, Stout Jr, Randy F, Spray, David C, Reichenbach, Andreas, Pannicke, Thomas, *et al.* 2012. Glial cells in (patho) physiology. *Journal of neurochemistry*, **121**(1), 4–27.
- Parthimos, Dimitris, Edwards, David Hughes, & Griffith, TM. 1999. Minimal model of arterial chaos generated by coupled intracellular and membrane Ca²⁺ oscillators. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **277**(3), H1119–H1144.
- Peters, Alan. 1991. The fine structure of the nervous system. *Neurons and their supporting cells*.
- Pivovarov, Arkady S, Calahorro, Fernando, & Walker, Robert J. 2019. Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invertebrate Neuroscience*, **19**(1), 1.
- Regehr, Wade G. 1997. Interplay between sodium and calcium dynamics in granule cell presynaptic terminals. *Biophysical journal*, **73**(5), 2476–2488.
- Reyes, Reno C, Verkhratsky, Alexei, & Parpura, Vladimir. 2012. Plasmalemmal Na/Ca²⁺ exchanger modulates Ca²⁺-dependent exocytotic release of glutamate from rat cortical astrocytes. *ASN Neuro*, **4**(1), 33–45.
- Robb-Gaspers, Lawrence D, & Thomas, Andrew P. 1995. Coordination of Ca²⁺ signaling by intercellular propagation of Ca²⁺ waves in the intact liver. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(14), 8102–8107.

- Robinson, Kelly. 2002. Charge relaxation due to surface conduction on an insulating sheet near a grounded conducting plane. *Pages 589–598 of: Conference Record of the 2002 IEEE Industry Applications Conference. 37th IAS Annual Meeting (Cat. No. 02CH37344)*, vol. 1. IEEE.
- Rojas, Héctor, Colina, Claudia, Ramos, Magaly, Benaim, Gustavo, Jaffe, Erica H, Caputo, Carlo, & DiPolo, Reinaldo. 2007. Na⁺ entry via glutamate transporter activates the reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange and triggers-induced Ca²⁺ release in rat cerebellar Type-1 astrocytes. *Journal of neurochemistry*, **100**(5), 1188–1202.
- Rose, Christine R, & Karus, Claudia. 2013. Two sides of the same coin: sodium homeostasis and signaling in astrocytes under physiological and pathophysiological conditions. *Glia*, **61**(8), 1191–1205.
- Rose, Christine R, & Ransom, Bruce R. 1996. Intracellular sodium homeostasis in rat hippocampal astrocytes. *The Journal of physiology*, **491**(2), 291–305.
- Rose, Christine R, & Ransom, Bruce R. 1997. Gap junctions equalize intracellular Na⁺ concentration in astrocytes. *Glia*, **20**(4), 299–307.
- Rose, CR, & Chatton, J-Y. 2016. Astrocyte sodium signaling and neuro-metabolic coupling in the brain. *Neuroscience*, **323**, 121–134.
- Scemes, Eliana, & Giaume, Christian. 2006. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*, **54**(7), 716–725.
- Scemes, Eliana, Suadicani, Sylvia O, Dahl, Gerhard, & Spray, David C. 2007. Connexin and pannexin mediated cell–cell communication. *Neuron glia biology*, **3**(3), 199–208.
- Shattock, Michael J, Ottolia, Michela, Bers, Donald M, Blaustein, Mordecai P, Boguslavskyi, Andrii, Bossuyt, Julie, Bridge, John HB, Chen-Izu, Ye, Clancy, Colleen E, Edwards, Andrew, *et al.* 2015. Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart. *The Journal of physiology*, **593**(6), 1361–1382.
- Shi, Lu, & Yang, Lie-Liang. 2017. Error performance analysis of diffusive molecular communication systems with on-off keying modulation. *IEEE Transactions on Molecular, Biological and Multi-Scale Communications*, **3**(4), 224–238.

- Sofroniew, Michael V, & Vinters, Harry V. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, **119**(1), 7–35.
- Somjen, George G. 2004. *Ions in the brain: normal function, seizures, and stroke*. Oxford University Press.
- Stafford, Nicholas, Wilson, Claire, Oceandy, Delvac, Neyses, Ludwig, & Cartwright, Elizabeth J. 2017. The plasma membrane calcium ATPases and their role as major new players in human disease. *Physiological reviews*, **97**(3), 1089–1125.
- Stout, Charles E, Costantin, James L, Naus, Christian CG, & Charles, Andrew C. 2002. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(12), 10482–10488.
- Syková, Eva, & Nicholson, Charles. 2008. Diffusion in brain extracellular space. *Physiological reviews*, **88**(4), 1277–1340.
- Thurley, Kevin, Wu, Lani F, & Altschuler, Steven J. 2018. Modeling cell-to-cell communication networks using response-time distributions. *Cell systems*, **6**(3), 355–367.
- Unichenko, Petr, Myakhar, Olga, & Kirischuk, Sergei. 2012. Intracellular Na⁺ concentration influences short-term plasticity of glutamate transporter-mediated currents in neocortical astrocytes. *Glia*, **60**(4), 605–614.
- Verkhratsky, Alexej, & Kettenmann, Helmut. 1996. Calcium signalling in glial cells. *Trends in neurosciences*, **19**(8), 346–352.
- Vogt, Arend, Silapetere, Arita, Grimm, Christiane, Heiser, Florian, Möller, Maximiliano Ancina, & Hegemann, Peter. 2019. Engineered passive potassium conductance in the KR2 sodium pump. *Biophysical journal*, **116**(10), 1941–1951.
- Wang, Fushun, Smith, Nathan A, Xu, Qiwu, Fujita, Takumi, Baba, Akemichi, Matsuda, Toshio, Takano, Takahiro, Bekar, Lane, & Nedergaard, Maiken. 2012. Astrocytes modulate neural network activity by Ca²⁺-dependent uptake of extracellular K⁺. *Science signaling*, **5**(218), ra26–ra26.
- Zhong, Ning, Beaumont, Vahri, & Zucker, Robert S. 2001. Roles for mitochondrial and reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchange and the plasmalemma Ca²⁺ ATPase in post-tetanic potentiation at crayfish neuromuscular junctions. *Journal of Neuroscience*, **21**(24), 9598–9607.

Zylińska, L, & Soszyński, Mirosław. 2000. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase in excitable and nonexcitable cells. *Acta Biochimica Polonica*, **47**(3), 529–539.
