



Casa abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Modelo matemático de la actividad eléctrica y las  
oscilaciones de  $Ca^{2+}$  asociadas a la liberación de insulina en  
células  $\beta$  humanas

Tesis que para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias**

presenta

**Gerardo Jorge Félix Martínez**

Asesor de tesis: Dr. José Rafael Godínez Fernández

**Jurado calificador**

**Presidente**

Dr. Ramón González Camarena

**Secretario**

Dr. José Rafael Godínez Fernández

**Vocales**

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Dra. Elia Martha Pérez Armendariz

Dr. Leonardo Dagdug Lima

México, D. F. 8 de diciembre de 2015



A mis papás, María del Rosario y Gerardo,  
por todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanas, Laura y Priscilla,  
por todo lo que hemos compartido.

A Mateo y Luciana, por su cariño.





# Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por abrirme sus puertas.

A todas las personas que hicieron posible este trabajo. De manera especial al Dr. José Rafael Godínez Fernández, por darme la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Biofísica, pero sobre todo, por su confianza, apoyo y paciencia.

Al Dr. Mathias Braun, quien con su generosidad hizo posible este trabajo.

A los miembros del jurado, Dra. Martha Pérez Armendáriz, Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Dr. Leonardo Dagdug Lima, Dr. Ramón González Camarena y Dr. Rafael Godínez Fernández, por el tiempo brindado a la revisión de este trabajo, así como por sus valiosos comentarios. De la misma manera, agradezco a la Dra. Myrian Velasco por sus importantes observaciones sobre esta tesis.

Al Dr. Juan Carlos Echeverría Arjonilla, por todo su apoyo.

A todos mis maestros, a quienes siempre les estaré agradecido.

A todos mis compañeros y amigos, por acompañarme siempre.

Una vez más, a mi familia.



# Modelo matemático de la actividad eléctrica y las oscilaciones de $\text{Ca}^{2+}$ asociadas a la liberación de insulina en células $\beta$ humanas

Gerardo Jorge Félix Martínez

Asesor de Tesis

Dr. José Rafael Godínez Fernández

## Resumen

Las células  $\beta$  son responsables de la secreción de insulina en respuesta a un incremento en la concentración de glucosa en sangre. Al ser excitables eléctricamente, las células  $\beta$  exhiben un patrón de actividad eléctrica ante un estímulo de glucosa, producido por un mecanismo general bien establecido en el que participan el metabolismo, el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y diversos mecanismos de transporte iónico. La actividad eléctrica promueve la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales iónicos de  $\text{Ca}^{2+}$  localizados en la membrana celular, generando un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio intracelular, que es la señal clave para provocar la secreción de insulina. Se sabe que los gránulos de insulina se encuentran asociados a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y que estos se distribuyen de manera no homogénea sobre la membrana celular. Con base en estas características morfológicas, en esta tesis se desarrolla un modelo tridimensional de la célula  $\beta$  humana que consiste en un modelo de la difusión amortiguada del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular acoplado a modelos matemáticos de las corrientes macroscópicas que participan en la formación del patrón de actividad eléctrica producido como respuesta a un estímulo de glucosa. Como resultado, el modelo propuesto es capaz de reproducir la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana en diferentes condiciones y de simular la distribución espaciotemporal del  $\text{Ca}^{2+}$  producida por los diversos patrones de actividad eléctrica. Al incluir por primera vez los aspectos espaciales explícitamente, este modelo constituye un importante avance en el campo del modelado de la célula  $\beta$ .



# Contenido

<b>Lista de Publicaciones</b>	<b>11</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>12</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>15</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>17</b>
1.1. Descripción del problema . . . . .	17
1.2. Hipótesis . . . . .	19
1.3. Objetivos . . . . .	19
1.3.1. Objetivo general . . . . .	19
1.3.2. Objetivos particulares . . . . .	19
1.4. Justificación . . . . .	20
1.5. Descripción de la tesis . . . . .	21
<b>2. Fundamentos de electrofisiología celular</b>	<b>23</b>
2.1. Membrana celular y concentraciones iónicas . . . . .	23
2.2. Gradiente electroquímico y potencial de equilibrio . . . . .	25
2.3. Potencial de membrana en reposo . . . . .	26
2.4. Canales iónicos . . . . .	27
2.5. Propiedades eléctricas de la membrana celular . . . . .	28
2.5.1. Capacitancia de la membrana . . . . .	29
2.5.2. Corrientes eléctricas . . . . .	29
2.6. Experimentos de fijación de voltaje en microáreas de membrana . . . . .	31
<b>3. Antecedentes</b>	<b>35</b>
3.1. Sistema de regulación de la glucosa . . . . .	35
3.2. Fisiología de la célula $\beta$ . . . . .	38
3.2.1. Mecanismo general de secreción de insulina . . . . .	38

3.2.2.	Canales iónicos y actividad eléctrica . . . . .	39
3.2.3.	Manejo del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular y metabolismo . . . . .	44
3.2.4.	Secreción de insulina . . . . .	47
3.2.5.	Diferencias entre especies . . . . .	47
3.3.	Modelos matemáticos de la célula $\beta$ . . . . .	50
3.3.1.	Modelos de la actividad eléctrica en células $\beta$ humanas . . . . .	57
3.3.2.	Limitaciones de los modelos matemáticos . . . . .	57
3.4.	Modelos de la difusión amortiguada de $\text{Ca}^{2+}$ . . . . .	59
<b>4.</b>	<b>Metodología</b>	<b>61</b>
4.1.	Modelo conceptual . . . . .	61
4.2.	Metodología general . . . . .	62
4.3.	Modelado de las corrientes macroscópicas de $\text{Ca}^{2+}$ . . . . .	64
4.4.	Análisis de los registros experimentales de las corrientes macroscópicas de $\text{Ca}^{2+}$ . . . . .	66
4.4.1.	Registros electrofisiológicos de las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ . . . . .	66
4.4.2.	Caracterización de las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ en la célula $\beta$ humana . . . . .	68
4.5.	Modelado de la difusión amortiguada del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular . . . . .	70
4.6.	Resolución del modelo por medio del método de los elementos finitos (FEM) . . . . .	72
4.6.1.	Implementación computacional en COMSOL Multiphysics . . . . .	73
4.6.2.	Geometría . . . . .	74
4.6.3.	Condiciones iniciales y de frontera . . . . .	76
4.6.4.	Enmallado y aspectos computacionales . . . . .	77
4.7.	Simulación de experimentos de fijación de voltaje . . . . .	78
4.7.1.	Criterios de validación . . . . .	79
4.8.	Simulación de la actividad eléctrica en condiciones fisiológicas . . . . .	80
4.8.1.	Criterios de validación . . . . .	82
4.8.2.	Contribución de las corrientes iónicas a la formación de los potenciales de acción mediante el análisis del potencial director ( <i>lead potential analysis</i> ) . . . . .	82
<b>5.</b>	<b>Simulación de las corrientes macroscópicas de <math>\text{Ca}^{2+}</math> en células <math>\beta</math> humanas en condiciones de fijación de voltaje</b>	<b>85</b>
5.1.	Corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo P/Q . . . . .	85
5.2.	Corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T . . . . .	86
5.3.	Corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L . . . . .	89
5.4.	Corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ en condiciones de fijación de voltaje . . . . .	92

5.5.	Dinámica del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en condiciones de fijación de voltaje . . . . .	94
5.5.1.	Dominios submembranales de $\text{Ca}^{2+}$ en la célula $\beta$ humana . . . . .	94
5.5.2.	Distribución espaciotemporal del $\text{Ca}^{2+}$ en la vecindad de la membrana celular . . . . .	96
5.5.3.	Efecto de amortiguadores de $\text{Ca}^{2+}$ endógenos fijos en la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . . . . .	98
5.5.4.	Comparación con mediciones experimentales del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en células $\beta$ . . . . .	100
5.5.5.	Concentraciones de $\text{Ca}^{2+}$ máximas producidas por las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ aisladas . . . . .	102
5.6.	Efecto de las corrientes tipo T y P/Q en la corriente tipo L . . . . .	103
5.7.	Conclusiones . . . . .	103
<b>6.</b>	<b>Simulación de la actividad eléctrica de la célula <math>\beta</math> humana aislada en condiciones fisiológicas</b> . . . . .	<b>107</b>
6.1.	Modelo de la célula completa . . . . .	107
6.1.1.	Corriente de $\text{K}^+$ activada por $\text{Ca}^{2+}$ . . . . .	109
6.1.2.	Corriente de $\text{K}^+$ del tipo rectificador tardío . . . . .	109
6.1.3.	Corriente de $\text{Na}^+$ dependiente del voltaje . . . . .	110
6.1.4.	Corriente de $\text{K}^+$ sensible al ATP . . . . .	110
6.1.5.	Corriente no específica dependiente del $\text{Ca}^{2+}$ (TRP) . . . . .	111
6.1.6.	Corriente de $\text{K}^+$ tipo HERG . . . . .	112
6.1.7.	Corriente de fuga . . . . .	112
6.1.8.	Otras corrientes . . . . .	112
6.2.	Actividad eléctrica en forma de disparo de potenciales de acción . . . . .	113
6.2.1.	Contribución de las corrientes iónicas a la formación de los potenciales de acción . . . . .	115
6.2.2.	Modelo cualitativo del disparo del potencial de acción . . . . .	119
6.3.	Dinámica del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular producida por el disparo de potenciales de acción . . . . .	120
6.3.1.	Dinámica de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en presencia de un amortiguador endógeno de $\text{Ca}^{2+}$ inmóvil . . . . .	120
6.3.2.	Efecto de los amortiguadores de $\text{Ca}^{2+}$ móviles en los transitorios de $\text{Ca}^{2+}$ . . . . .	122
6.3.3.	Dominios submembranales de $\text{Ca}^{2+}$ en condiciones fisiológicas . . . . .	125
6.3.4.	Comparación con mediciones experimentales del $\text{Ca}^{2+}$ en células $\beta$ . . . . .	125
6.4.	Conclusiones . . . . .	127

<b>7. Conclusiones generales y perspectivas</b>	<b>129</b>
7.1. Perspectivas . . . . .	130
<b>Referencias</b>	<b>131</b>
<b>Apéndice</b>	<b>149</b>
Artículo 1 . . . . .	150
Artículo 2 . . . . .	166
Artículo 3 . . . . .	181
Artículo 4 . . . . .	196
Artículo 5 . . . . .	198
Artículo 6 . . . . .	203
Artículo 7 . . . . .	208



# Lista de Publicaciones

Derivados de este proyecto surgieron los siguientes artículos que fueron publicados o presentados en revistas y congresos nacionales e internacionales. Los artículos en extenso se pueden consultar en el Apéndice.

1. Félix-Martínez, G. J. y Godínez-Fernández, J. R. Modeling  $\text{Ca}^{2+}$  currents and buffered diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  in human  $\beta$ -cells during voltage clamp experiments. *Mathematical biosciences* **270**, 66-80 (2015).
2. Félix-Martínez, G. J. y Godínez-Fernández, J. R. Mathematical models of electrical activity of the pancreatic  $\beta$ -cell: A physiological review. *Islets* **6**, e949195 (2014).
3. Félix-Martínez, G. J. y Godínez-Fernández, J. R. Effects of impaired ATP production and glucose sensitivity on human  $\beta$ -cell function: a simulation study. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* **35**, 157-170 (2014).
4. Félix-Martínez, G. J. y Godínez-Fernández, J. R.  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains in the pancreatic  $\beta$ -cell: a three-dimensional modeling approach. *Biomath Communications* **1** (2014).
5. Félix-Martínez, G. J. y Godínez-Fernández, J. R. *Analysis of spiking electrical activity in Human  $\beta$ -cells using mathematical models* en *IFMBE Proceedings* **49** (Springer International Publishing, 2015), 888-891.
6. Félix-Martínez, G. J. y Godínez-Fernández, J. R. *Modeling buffered  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion in a single human  $\beta$ -cell: the role of endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffers and  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion mechanisms* en *Memorias del Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica 2014* (SOMIB, 2014), 92-95.
7. Godínez-Fernández, J. R. y Félix-Martínez, G. J. *Papel de la oscilación de la concentración de ATP en la actividad eléctrica de la célula  $\beta$*  en *Memorias del XXIV Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica* (SOMIB, 2011).

# Índice de Figuras

2.1.	Gradientes de concentraciones iónicas . . . . .	24
2.2.	Gradiente electroquímico y potencial de equilibrio . . . . .	26
2.3.	Mecanismos de transporte iónico en la membrana celular . . . . .	27
2.4.	Funcionamiento de los canales iónicos . . . . .	28
2.5.	Representación de la membrana celular como un circuito eléctrico . . . . .	29
2.6.	Técnica experimental de fijación de voltaje en microáreas de membrana ( <i>patch clamp</i> ) en la configuración de célula completa . . . . .	32
2.7.	Ejemplo de un experimento de fijación de voltaje . . . . .	33
3.1.	Diagrama simplificado del sistema de regulación de la glucosa . . . . .	36
3.2.	Niveles de organización en el páncreas . . . . .	37
3.3.	Modelo básico de la secreción de insulina estimulada por glucosa . . . . .	39
3.4.	Patrones de actividad eléctrica en células $\beta$ . . . . .	41
3.5.	Contribución de los canales iónicos a la actividad eléctrica de la célula $\beta$ humana . . . . .	43
3.6.	Movilización de gránulos de insulina y exocitosis . . . . .	48
3.7.	Modelo de Chay y Keizer . . . . .	51
3.8.	Modelo de Smolen y Keizer . . . . .	52
3.9.	Retículo endoplásmico como segundo compartimento de $\text{Ca}^{2+}$ en los modelos de la célula $\beta$ . . . . .	54
3.10.	Modelo del oscilador dual (DOM) . . . . .	56
3.11.	Modelo de Riz y Pedersen de la célula $\beta$ humana . . . . .	58
4.1.	Modelo conceptual . . . . .	62
4.2.	Diagrama de la metodología general del modelado . . . . .	63
4.3.	Modelo conceptual de los canales iónicos . . . . .	65
4.4.	Ejemplos típicos de las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ de experimentales de células $\beta$ humanas . . . . .	67
4.5.	Curvas I-V experimentales . . . . .	69

4.6.	Estimación del potencial de inversión del $\text{Ca}^{2+}$ . . . . .	69
4.7.	Análisis de la cinética de activación e inactivación de las corrientes macroscópicas . . . . .	71
4.8.	Diagrama del método de los elementos finitos (FEM) . . . . .	73
4.9.	Geometría del modelo de la difusión amortiguada del $\text{Ca}^{2+}$ . . . . .	75
4.10.	Diagramas del enmallado para la implementación en COMSOL . . . . .	78
5.1.	Registro experimental de la corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo P/Q y función de activación estacionaria. . . . .	86
5.2.	Registro experimental de la corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T. . . . .	87
5.3.	Ajuste de las funciones estacionarias y de las constantes de tiempo de activación e inactivación de la corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T . . . . .	88
5.4.	Registro experimental de la corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L. . . . .	90
5.5.	Ajuste de las funciones estacionarias y de las constantes de tiempo de activación e inactivación de la corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L . . . . .	91
5.6.	Simulación de las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ en condiciones de fijación de voltaje	93
5.7.	No se producen dominios submembranales de $\text{Ca}^{2+}$ en condiciones de fijación de voltaje . . . . .	95
5.8.	Simulación del transitorio producido por un pulso despolarizante a 0 mV en presencia de 10 mM de EGTA. . . . .	97
5.9.	Concentraciones de $\text{Ca}^{2+}$ maximas a diferentes distancias de las fuen- tes de $\text{Ca}^{2+}$ durante experimentos de fijación de voltaje . . . . .	99
5.10.	Simulación del transitorio producido por un pulso despolarizante a 0 mV en presencia de 10 mM de EGTA y 0.5 mM de un amortiguador endógeno inmóvil . . . . .	101
5.11.	Concentraciones máximas debidas a las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ aisladas durante experimentos de fijación de voltaje . . . . .	103
5.12.	Efecto de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ debida a las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T y P/Q en la inactivación de la corriente tipo L . . . . .	104
6.1.	Diagrama del modelo de actividad eléctrica de la célula $\beta$ humana. . .	108
6.2.	Simulación de la actividad eléctrica en forma de potenciales de acción.	114
6.3.	Potencial de acción y corrientes que participan en su formación . . . .	115
6.4.	Análisis del segmento de despolarización mediante el método LPA . .	116
6.5.	Análisis del segmento de repolarización mediante el método LPA . . .	118
6.6.	Modelo cualitativo del disparo del potencial de acción . . . . .	120
6.7.	Transitorios de $\text{Ca}^{2+}$ producidos por la actividad eléctrica en forma de potenciales de acción . . . . .	121

6.8.	Transitorios de $\text{Ca}^{2+}$ , $[\text{END}_f]$ y $[\text{END}_f \cdot \text{Ca}]$ producidos por un potencial de acción en presencia de un amortiguador endógeno inmóvil. . .	122
6.9.	Concentraciones máximas y mínimas para todas las especies durante un transitorio producido por un potencial de acción a diferentes distancias de las fuentes de $\text{Ca}^{2+}$ . . . . .	123
6.10.	Transitorios producidos por un potencial de acción en presencia de dos amortiguadores endógeno . . . . .	124
6.11.	Dominios submembranales de $\text{Ca}^{2+}$ producidos por el disparo de potenciales de acción. . . . .	126

# Índice de Tablas

2.1. Concentraciones iónicas típicas en la célula de mamífero . . . . .	24
3.1. Diferencias y similitudes en la expresión de los canales iónicos de células $\beta$ de ratón y de humano. . . . .	41
3.2. Potencial de membrana de activación de las corrientes iónicas de la célula $\beta$ humana incluidas en el modelo. . . . .	42
4.1. Parámetros usados en las simulaciones de los experimentos de fijación de voltaje. . . . .	79
4.2. Parámetros usados en las simulaciones de la actividad eléctrica de la célula $\beta$ en condiciones fisiológicas. . . . .	81
4.3. Concentración de $\text{Ca}^{2+}$ a la que el 50 % de los canales de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L están en estado de inactivación ( $K_{hL}$ ) . . . . .	81



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Descripción del problema

La insulina es la única hormona responsable de reducir directamente los niveles de glucosa en sangre. Es sintetizada y secretada por las células  $\beta$  del páncreas en respuesta a un incremento en la glucosa plasmática u otros estímulos. Su importancia es tal, que deficiencias en el funcionamiento de la célula  $\beta$  están asociadas con el establecimiento de la diabetes tipo 2 (DT2)[1-4], enfermedad que es considerada en la actualidad como un grave problema de salud pública a nivel mundial. En este sentido, se estima que en la actualidad más de 366 millones de personas padecen diabetes a nivel mundial, y que para el año 2030 esta cifra superará los 500 millones de personas[5]. En México, de acuerdo con datos de la Encuesta Nacional de Salud 2012[6], más de 6.4 millones de personas padecen diabetes actualmente, aunque otros estudios[5] han estimado una prevalencia mayor, superando los 10 millones de personas. Además, se proyecta que en México, para el año 2030, el número de personas diagnosticadas con DT2 superará los 16 millones de personas[5].

Conocer a detalle el proceso de secreción de insulina a nivel celular es de suma importancia para el entendimiento del origen de la DT2. Existe consenso en cuanto al mecanismo general de secreción de insulina, de acuerdo con el cual un incremento en la concentración de glucosa acelera el metabolismo celular (i.e. la producción de ATP), provocando el cierre de los canales iónicos de  $K^+$  sensibles al ATP. Esto da lugar a la despolarización de la membrana celular y al inicio de la actividad eléctrica, permitiendo así la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula. El incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular es lo que finalmente promueve la liberación de insulina. Muchos detalles de este mecanismo, conocido como secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS por sus siglas en inglés) son aún desconocidos, por lo

que en las últimas décadas la célula  $\beta$  ha sido estudiada extensamente tanto desde una perspectiva experimental como teórica. Mucho de lo que se conoce actualmente sobre la regulación de la secreción de insulina a nivel celular proviene de estudios realizados en células de roedor. Sin embargo, diferencias importantes encontradas recientemente entre las células  $\beta$  de roedor y de humano han derivado en estudios dedicados a la célula  $\beta$  humana específicamente.

De particular interés para este proyecto son las características electrofisiológicas de la célula  $\beta$  humana, es decir, la identidad y características de los mecanismos celulares que participan en la formación del patrón de actividad eléctrica, así como su papel en la misma. Estos mecanismos son caracterizados por medio de técnicas experimentales bien conocidas. Como complemento, es común la construcción de modelos matemáticos que reproducen el patrón de actividad eléctrica observado experimentalmente y que permiten, a través de ellos, estudiar la interacción entre los diferentes mecanismos que lo producen. Sin embargo, los modelos de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  han despreciado procesos importantes, como son la localización de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana celular y el proceso de difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$ , que de manera importante dan forma a los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  que finalmente movilizan a los gránulos de insulina.

En esta tesis, partiendo del análisis y caracterización de los registros experimentales de las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula  $\beta$  humana, se construyeron modelos matemáticos de cada una de las corrientes, con la finalidad de reproducir el comportamiento observado durante experimentos de fijación de voltaje. Cabe destacar que entre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  modeladas se encuentra la corriente tipo L, que tiene la particularidad de ser activada por cambios en el potencial de membrana e inactivada por el incremento de la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que en el modelo que se propone es determinada por un modelo de la difusión amortiguada del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una geometría tridimensional. Posteriormente, se simuló el patrón de actividad eléctrica de la célula  $\beta$  en condiciones fisiológicas, al incluir, además de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , corrientes de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  presentes en la célula  $\beta$  humana.

Como resultado, el modelo propuesto es capaz no solo de reproducir las características esenciales de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana, sino de predecir el comportamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  en prácticamente cualquier punto del medio intracelular, tomando en cuenta, por ejemplo, las características de las proteínas amortiguadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en el citoplasma, el tamaño y forma de la célula y la localización y distribución de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El modelo final, al conjuntar un modelo de la actividad eléctrica con un modelo de la difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  en una geometría tridimensional constituye un avance importante en el campo del modelado de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$ .



A continuación se presentan la hipótesis en la que se basa este proyecto de investigación, así como los objetivos planteados para la realización del mismo.

## 1.2. Hipótesis

Dado que las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  y las características morfológicas de la célula  $\beta$  humana han sido descritas experimentalmente, es posible construir, mediante técnicas de simulación, un modelo tridimensional de la célula  $\beta$  humana que reproduzca el comportamiento eléctrico de la célula y permita simular la dinámica de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  resultantes en condiciones tanto experimentales como fisiológicas.

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo general

Construir, con base en datos experimentales, un modelo matemático de la célula  $\beta$  humana que incluya los aspectos morfológicos de la célula, que considere explícitamente el proceso de difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio intracelular y que reproduzca las características esenciales de la actividad eléctrica tanto en condiciones experimentales como fisiológicas.

### 1.3.2. Objetivos particulares

- Caracterizar las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula  $\beta$  humana.
- Obtener una representación matemática de cada una de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  usando el formalismo de Hodgkin y Huxley.
- Construir un modelo tridimensional de la difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  que considere los aspectos morfológicos y espaciales básicos de la célula  $\beta$  humana.
- Acoplar los modelos de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  con el modelo de la difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Reproducir las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones de fijación de voltaje y simular los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio intracelular producidos durante los experimentos.

- Construir un modelo de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana en condiciones fisiológicas.
- Reproducir el patrón de actividad eléctrica en forma de disparo de potenciales de acción y estimar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  durante los transitorios generados en el medio intracelular.

## 1.4. Justificación

El estudio de la célula  $\beta$ , tanto desde una perspectiva teórica como experimental, ha sido fundamental para conocer, al menos parcialmente, el origen de enfermedades como la diabetes tipo 2, y tiene como objetivo principal el desarrollo de nuevas y mejores terapias para su tratamiento. En el caso de la célula  $\beta$  humana, el trabajo experimental se ve limitado, en primer lugar, por la escasa disponibilidad de tejido humano para su estudio. Además, la naturaleza de las técnicas experimentales impiden el estudio simultáneo de los diferentes mecanismos que participan en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Como solución a esto, en los últimos años se han desarrollado, con base en el conocimiento previo, modelos matemáticos de los que han surgido valiosas hipótesis para explicar las observaciones experimentales. La gran mayoría de estos modelos matemáticos se basan en datos experimentales de células de roedores, ya que se asumía como un buen modelo de la célula humana. Sin embargo, hay evidencia suficiente de que existen diferencias importantes entre células  $\beta$  de roedor y células  $\beta$  humanas.

Por otro lado, dada la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en diferentes procesos celulares relacionados con la secreción de insulina, resulta sorprendente el escaso número de estudios (teóricos o experimentales) acerca de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  en medio intracelular de la célula  $\beta$ , ya sea de roedor o de humano. Igualmente sorprendente es el hecho de que, a pesar de que los modelos matemáticos se han utilizado para el estudio de la célula  $\beta$  por más de treinta años, aún no se hayan considerado los aspectos morfológicos y espaciales en la construcción de dichos modelos.

Radica en lo anterior la importancia de la construcción de un modelo como el que aquí se propone, ya que constituirá una alternativa a los modelos tradicionales, y será una herramienta valiosa como complemento a los estudios experimentales de la actividad eléctrica y de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

## 1.5. Descripción de la tesis

Esta tesis está estructurada de la siguiente manera. En el **Capítulo 2** se presentan de manera conceptual los principios básicos de la electrofisiología celular en los que se basa este proyecto. Se describe el origen del comportamiento eléctrico de la membrana, los mecanismos de transporte iónico, y la técnica experimental empleada para el registro de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  analizadas. En el **Capítulo 3** se exponen, en primer lugar, las bases fisiológicas del funcionamiento de la célula  $\beta$ . Posteriormente se presenta una breve revisión del campo del modelado de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$ , partiendo de los modelos basados en datos de células de roedor hasta llegar a los recientes modelos de la célula  $\beta$  humana. Finalmente se discuten las limitaciones de los modelos matemáticos y las características principales de los modelos de difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el contexto del estudio de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio intracelular. El **Capítulo 4** tiene como objetivo describir la metodología seguida para la construcción del modelo final. Se parte de la metodología general del modelado y posteriormente se describen los diferentes métodos y técnicas empleadas en la construcción de los modelos de las corrientes iónicas y de la difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el **Capítulo 5** se muestran los resultados de las simulaciones de los experimentos de fijación de voltaje. Se comparan las corrientes simuladas con los registros experimentales y se estima el rango de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanzadas en la vecindad de la membrana. En el **Capítulo 6** se presentan los resultados de las simulaciones de la actividad eléctrica de la célula en condiciones fisiológicas. Entre ellos destacan el análisis de la contribución de las distintas corrientes iónicas en la formación de los potenciales de acción, así como de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  producidos en el medio intracelular. Finalmente, en el **Capítulo 7** se enuncian las conclusiones generales de este proyecto.



## Capítulo 2

# Fundamentos de electrofisiología celular

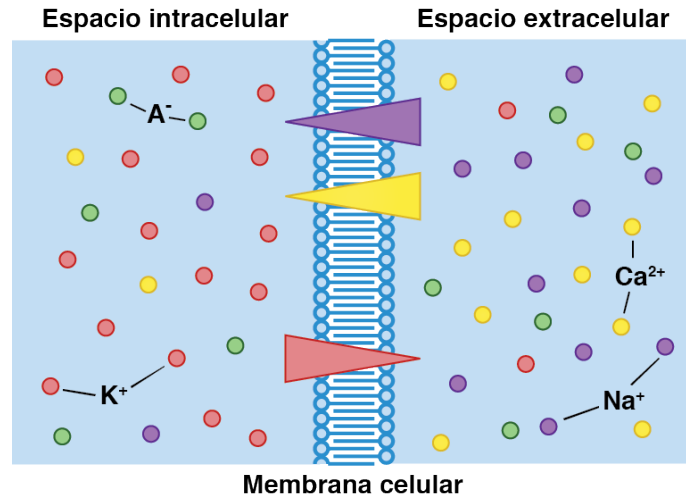
En la célula  $\beta$  pancreática, el paso de iones a través de la membrana celular (principalmente  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ ) produce señales eléctricas fundamentales para la secreción de insulina estimulada por glucosa. Estas señales son generadas, en mayor medida, por el gradiente electroquímico a través de la membrana celular producido por las diferencias en las concentraciones de los diferentes tipos iónicos entre el interior y el exterior de la célula.

Al estudio de las propiedades eléctricas de la membrana celular se le conoce como electrofisiología, y consiste en la medición y análisis de corrientes iónicas y cambios en el potencial de membrana mediante técnicas experimentales. Como complemento, en las últimas décadas se ha hecho uso de modelos matemáticos con la finalidad de encontrar posibles explicaciones para las observaciones experimentales, que a su vez sirvan como base para el trabajo experimental futuro.

En este capítulo se describen brevemente los conceptos básicos de la electrofisiología celular que sirven como base para la construcción del modelo matemático de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana, objetivo central de este trabajo.

### 2.1. Membrana celular y concentraciones iónicas

Todas las células están delimitadas por la membrana celular, compuesta por una bicapa fosfolipídica que actúa como barrera al paso de iones y otras moléculas entre el interior y el exterior de la célula. Aunque existen diferencias entre especies, los medios a ambos lados de la membrana tienen una distribución iónica similar, habiendo un exceso de iones de  $K^+$  al interior de la célula y un exceso de iones de  $Na^+$



**Figura 2.1:** La separación de cargas generada por la membrana celular genera gradientes de concentración entre el medio extracelular e intracelular. Independientemente de la especie se cumple que  $[Ca^{2+}]_i < [Ca^{2+}]_o$ ,  $[K^+]_i > [K^+]_o$  y  $[Na^+]_i < [Na^+]_o$ . En la mayoría de las células hay un gran número de moléculas y iones con carga negativa ( $A^-$ ) en el medio intracelular, como iones de  $Cl^-$  y proteínas.

	Intracelular (mM)	Extracelular (mM)
$K^+$	140	5
$Na^+$	5-15	145
$Ca^{2+}$ (libre)	$1-2 \times 10^{-4}$	2.5 - 5

**Tabla 2.1:** Concentraciones iónicas típicas en la célula de mamífero. Adaptada de ref. [7].

y  $Ca^{2+}$  al exterior[7]. Los rangos de concentraciones típicas para los iones de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  en células de mamífero se muestran en la Tabla 2.1 (ver también la Fig. 2.1). En la mayoría de las células se encuentran también un considerable número de iones y moléculas con carga negativa en el citoplasma[7]. Los gradientes electroquímicos producidos por la permeabilidad selectiva de la membrana celular son de suma importancia para una gran variedad de procesos fisiológicos a nivel celular.

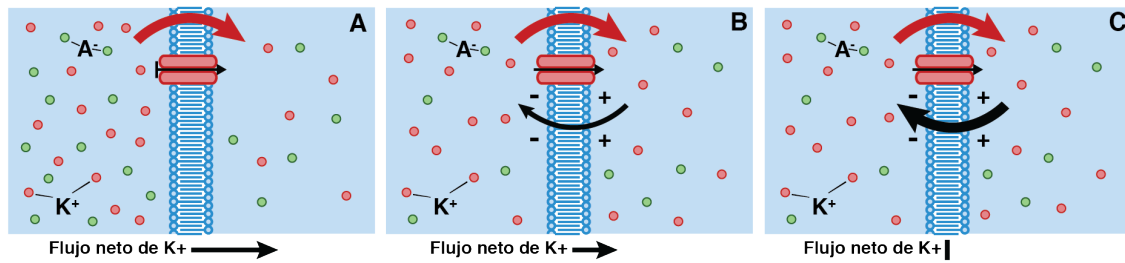
## 2.2. Gradiente electroquímico y potencial de equilibrio

El movimiento de iones a través de la membrana es determinado tanto por el gradiente de concentración entre el interior y el exterior de la célula, como por el campo eléctrico producido por la separación de cargas a ambos lados de la membrana celular[7, 8]. A la combinación de estos dos factores se le conoce como gradiente electroquímico. Esto es, suponiendo que la membrana celular fuera permeable únicamente a los iones de  $K^+$ , estos difundirán desde el interior hacia el exterior de la célula (en dirección del gradiente de concentración, Fig. 2.2A). Este movimiento hacia el exterior de iones de  $K^+$  cargados positivamente dejará a la célula con una carga negativa neta, generando un campo eléctrico a través de la membrana que se traduce en una fuerza eléctrica de atracción en los iones de  $K^+$  (Fig. 2.2B). Una vez alcanzado el equilibrio entre el movimiento iónico hacia afuera debido al gradiente de concentración y la fuerza eléctrica de atracción hacia el interior, el flujo neto de iones a través de la membrana será nulo (Fig. 2.2C). Al potencial de membrana al que se alcanza este estado de equilibrio ( $V_X$ ,  $X = K^+$ ,  $Na^+$  o  $Ca^{2+}$ ) se le conoce como **potencial de equilibrio** y está dado por la ecuación de Nernst[7, 8]:

$$V_X = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i}, \quad (2.1)$$

en donde  $R$  es la constante universal de los gases,  $T$  es la temperatura (en Kelvin),  $z$  es la valencia de la especie iónica y  $[X]_o$  y  $[X]_i$  representan las concentraciones extracelular e intracelular del ion  $X$  respectivamente.

El flujo de iones a través de la membrana celular ocurre a través de proteínas especializadas que se encuentran incrustadas en ella, como son los canales iónicos, bombas e intercambiadores[7]. Los **canales iónicos** son poros dinámicos que atraviesan la membrana y permiten el paso de iones en dirección del gradiente electroquímico. Cuentan con diferentes estados conformacionales (e.g. abiertos, cerrados, inactivados), cambiando de uno a otro en respuesta a diferentes estímulos, como pueden ser cambios en el potencial de membrana o en la concentración de algún ion o molécula[8] (ver Sección 2.4). Por su parte, las **bombas** son transportadores que llevan iones en contra del gradiente de concentración, lo que implica un gasto energético. La energía requerida por las bombas es obtenida de la hidrólisis de moléculas de ATP, que son degradadas a ADP en el proceso[7]. De la misma manera, los **intercambiadores** transportan moléculas en contra del gradiente de concentración, pero a diferencia de las bombas, la energía requerida es obtenida del transporte de otras moléculas, ya sea en la misma dirección o en dirección opuesta[7]. Ejemplos de los tres mecanismos



**Figura 2.2:** Gradiente electroquímico y potencial de equilibrio. **A.** Iones de  $K^+$  difunden en dirección del gradiente de concentración (flecha roja) desde el interior (izq.) de la célula al exterior (der.), asumiendo que la membrana es impermeable al paso de moléculas y iones cargados negativamente ( $A^-$ ). **B.** Este movimiento genera un campo eléctrico a través de la membrana que se opone al movimiento de difusión (flecha negra). **C.** Conforme más iones de  $K^+$  han difundido al exterior la fuerza eléctrica crece hasta un punto en el que el flujo neto de iones de  $K^+$  es nulo (potencial de equilibrio).

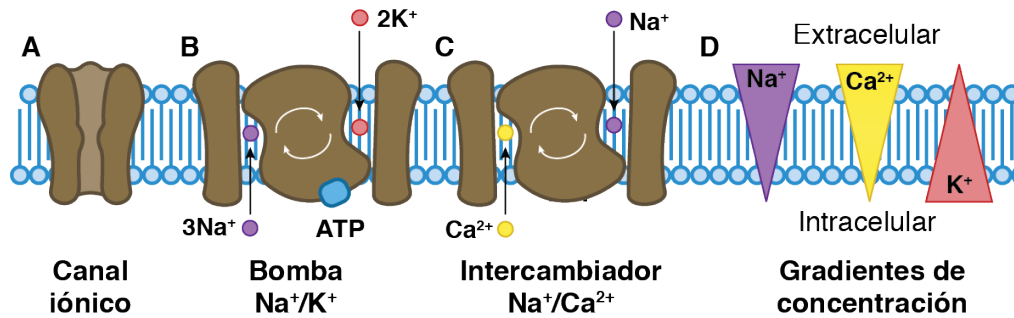
de transporte se esquematizan en la Fig. 2.3.

Los gradientes de concentración (ver Fig. 2.1 y Tabla 2.1) son mantenidos principalmente por la actividad de la bomba  $Na^+/K^+$  y el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (Fig. 2.3B y C respectivamente). La bomba  $Na^+/K^+$  es la principal causa de los gradientes de concentración de  $Na^+$  y  $K^+$ , ya que transporta tres iones de  $Na^+$  hacia afuera de la célula y dos iones de  $K^+$  hacia adentro[7, 9]. Por su parte, el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  transporta iones de  $Ca^{2+}$  hacia el exterior de la célula (en contra del gradiente de concentración), tomando como fuente de energía el transporte de iones de  $Na^+$  en dirección de su gradiente electroquímico[7]. En el proceso, el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  transporta un ion de  $Ca^{2+}$  por tres iones de  $Na^+$ . Además, la membrana plasmática permite el paso selectivo de iones a través de mecanismos de transporte pasivos (que no requieren energía), contribuyendo también a la formación de los gradientes de concentración[7, 8].

## 2.3. Potencial de membrana en reposo

Todas las células en condiciones de reposo tienen una diferencia de potencial a través de su membrana plasmática, de tal manera que el interior de la célula se encuentra negativamente cargado con respecto al exterior. Este es el potencial de membrana de reposo. En la célula  $\beta$  humana el potencial de membrana en reposo es de alrededor de  $-70$  mV[10]. La magnitud del potencial de reposo es determinada por las diferencias de concentración iónica entre el medio intracelular y el extracelular



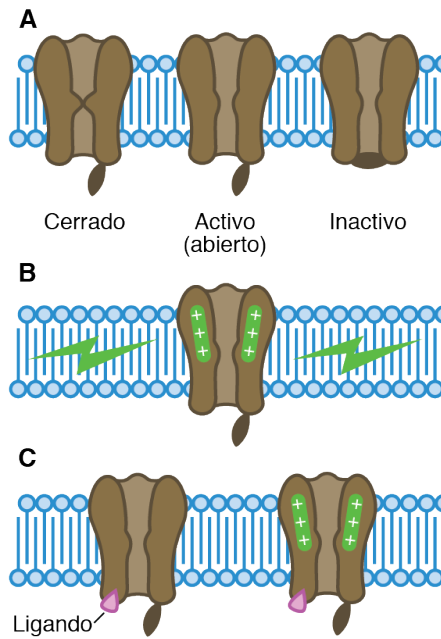


**Figura 2.3:** Mecanismos de transporte iónico en la membrana celular. **A.** Los canales iónicos permiten el paso de iones en dirección del gradiente electroquímico. **B.** La bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  transporta 3 iones de  $\text{Na}^+$  hacia el exterior y 2 iones de  $\text{K}^+$  hacia el interior (en contra del gradiente de concentración) utilizando la hidrólisis de ATP como fuente de energía. **C.** Intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . El gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$  es la fuente de energía para llevar  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el exterior de la célula en contra de su gradiente de concentración. **D.** Los gradientes de concentración del  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

y la permeabilidad de la membrana a los diferentes tipos de iones. Es conocido que el potencial de reposo en las células  $\beta$  depende principalmente de la permeabilidad de la membrana a los iones de  $\text{K}^+$  [11, 12], debida a la presencia de los canales de  $\text{K}^+$  sensibles al ATP ( $K_{ATP}$ ) que son regulados principalmente por la concentración de ATP y ADP [13, 14]. Por una parte, el incremento en el ATP citosólico provoca el cierre de los canales  $K_{ATP}$ , mientras que el  $\text{MgATP}$  y el  $\text{MgADP}$  estimulan su apertura [14]. Es por esto que a bajas concentraciones de glucosa los canales  $K_{ATP}$  permiten el paso de iones de  $\text{K}^+$  debido a una actividad metabólica baja, que se traduce en una relación ATP/ADP baja.

## 2.4. Canales iónicos

Los canales iónicos son de suma importancia para las células excitables, ya que, al controlar la permeabilidad de la membrana celular, son responsables de establecer el potencial de membrana en reposo y de producir el patrón de actividad eléctrica [8, 9]. Una propiedad de suma importancia de los canales iónicos es su selectividad. Esto es, su capacidad de dejar pasar preferentemente a cierto tipo iónico. El paso de iones a través de los canales está determinado por diferentes compuertas que abren o cierran el canal (Fig. 2.4A). En realidad, estas compuertas son cambios conformacionales a nivel molecular producidos por diferentes factores, entre los que destacan cambios en

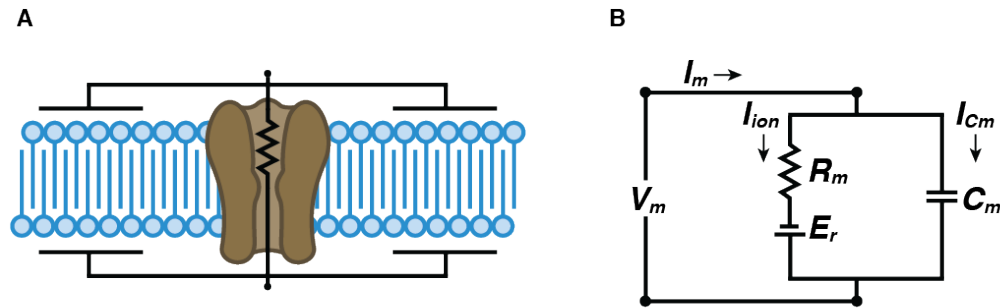


**Figura 2.4:** **A.** El paso de iones a través de los canales iónicos está determinado por diferentes compuertas. Se muestra un canal cerrado (izq.), un canal activo (abierto) y un canal en estado de inactivación (derecha). **B.** Canal iónico sensible al voltaje. Un sensor en el canal detecta los cambios en el potencial de membrana produciendo los cambios conformacionales. **C.** Canales dependientes de ligandos. Hormonas, neurotransmisores u otras moléculas regulan la actividad de los canales iónicos. Existen algunos canales que dependen tanto del voltaje como de ligandos (der.), como el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

el potencial de membrana y la concentración de diferentes ligandos (e.g. hormonas, neurotransmisores o los propios iones[8]). A los primeros se les conoce como canales iónicos sensibles al voltaje y a los segundos, canales iónicos regulados por ligandos. Un diagrama de ambos tipos de canales iónicos se muestra en la Fig. 2.4B-C. En algunos casos, como en el de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, la actividad de los canales es regulada tanto por el potencial de membrana como por ligandos ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

## 2.5. Propiedades eléctricas de la membrana celular

Es común en el campo de la electrofisiología describir el comportamiento eléctrico de las membranas biológicas en términos de componentes de circuitos eléctricos. Por ejemplo, la separación de cargas debida a la permeabilidad selectiva de la membrana celular se representa como un capacitor, los canales iónicos son vistos como resistencias variables y la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio de las diferentes poblaciones iónicas es representada como una fuente de voltaje[7-9]. A continuación se describen brevemente estos conceptos, que son la base de los modelos matemáticos de la actividad eléctrica a nivel celular.



**Figura 2.5:** Representación de la membrana celular como un circuito equivalente. **A.** La membrana celular, al separar cargas, se puede considerar como un capacitor. Los canales iónicos se representan como resistencias. **B.** Circuito eléctrico equivalente.

### 2.5.1. Capacitancia de la membrana

La membrana celular se puede considerar como un aislante separando dos soluciones conductoras (los medios intracelular y extracelular). Esto, desde un punto de vista eléctrico constituye un capacitor (ver Fig. 2.5), y por lo tanto es capaz de almacenar carga[7, 8]. La carga acumulada por este capacitor se puede escribir como:

$$Q = V_m C_m, \quad (2.2)$$

en donde  $V_m$  es el potencial de membrana (medido en volts) y  $C_m$  es la capacitancia de membrana (medido en farads). El valor de  $C_m$  depende de las dimensiones de la membrana, ya que es proporcional a la superficie ( $A$ ) y a la constante dieléctrica que la caracteriza ( $\epsilon_r$ ), e inversamente proporcional a su grosor ( $d$ ). Esto es:

$$C_m = \frac{A\epsilon_r}{d}. \quad (2.3)$$

Ya que las membranas biológicas en células animales tienen un grosor que puede considerarse como constante ( $\sim 100 \text{ \AA}$ ), se estima una equivalencia entre capacitancia y superficie aproximada de  $1 \mu F/cm^2$ [9, 15, 16]. Esta relación nos permite estimar la superficie de la membrana celular usando el valor de la capacitancia de la membrana.

### 2.5.2. Corrientes eléctricas

Las corrientes transmembranales ( $I_m$ ) son una medición del paso de iones a través de la membrana celular. En condiciones fisiológicas se puede decir que  $I_m$  está dada

por la suma de las corrientes producidas por el paso de iones a través de los canales iónicos ( $I_{\text{ion}}$ ) y la corriente capacitiva ( $I_{Cm}$ )[7, 8] (ver Fig. 2.5, es decir:

$$I_m = I_{\text{ion}} + I_{Cm}. \quad (2.4)$$

Al diferenciar la Ecuación 2.2, y considerando el hecho de que el cambio en la cantidad de carga por unidad de tiempo se puede expresar como una corriente (i.e.  $I = dQ/dt$ ), se obtiene la corriente capacitiva:

$$I_{Cm} = \frac{dQ}{dt} = C_m \frac{dV_m}{dt}. \quad (2.5)$$

Por otro lado, la corriente iónica  $I_{\text{ion}}$  representa la suma de las corrientes debido a los canales iónicos presentes en la célula. Por ejemplo, si la célula cuenta con canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $I_{\text{ion}}$  estaría dada por  $I_{\text{ion}} = I_K + I_{Na} + I_{Ca}$ . De manera general entonces se puede escribir como:

$$I_{\text{ion}} = \sum_X I_X, \quad (2.6)$$

en donde  $X$  identifica el ion ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) que produce cada corriente. Es importante mencionar que en la expresión anterior, la corriente correspondiente a cada tipo iónico ( $I_X$ ) representa la corriente a través de la totalidad de los canales del tipo  $X$ , a lo que se le conoce como corriente macroscópica. Esto se puede expresar como  $I_X = N_X i_X P_{oX}$ , en donde  $N_X$  es el número de canales del tipo  $X$ ,  $i_X$  es la corriente unitaria a través de un solo canal y  $P_{oX}$  es la probabilidad de apertura del canal.

Por convención, se asume que una corriente transmembranal positiva implica la salida de cargas positivas de la célula, teniendo un efecto de repolarización en el potencial de membrana. Por el contrario, una corriente negativa es entonces la entrada de cargas positivas a la célula, teniendo por lo tanto un efecto despolarizante.

Comúnmente, la membrana celular y los mecanismos de transporte, y por lo tanto los cambios en el potencial de membrana producidos por las corrientes iónicas, son descritos mediante el circuito eléctrico equivalente que se muestra en la Fig. 2.5B, en el que el nodo inferior representa el exterior celular mientras que el nodo superior representa el medio intracelular. En el circuito equivalente las corrientes ( $I_{\text{ion}}$  e  $I_{Cm}$ ) se encuentran en paralelo, por lo que, por conservación de corriente, se debe de cumplir que  $I_m = I_{\text{ion}} + I_{Cm} = 0$  (Eq. 2.4). Haciendo uso de la Ecuación 2.5, esto se puede escribir como:

$$C_m \frac{dV_m}{dt} + I_{\text{ion}} = 0. \quad (2.7)$$

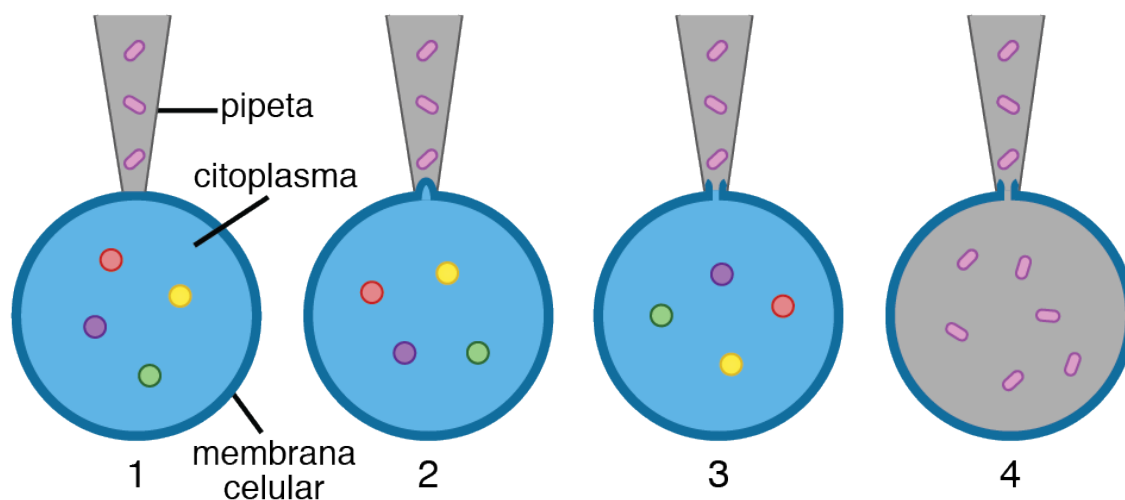
Reagrupando, y usando la Ecuación 2.6 se obtiene:

$$\frac{dV_m}{dt} = -\frac{I_{\text{ion}}}{C_m} = -\frac{1}{C_m} \sum_X I_X \quad (2.8)$$

La ecuación 2.8 es la ecuación diferencial que describe los cambios de  $V_m$  en función del tiempo debido a las corrientes iónicas a través de la membrana celular. Prácticamente todos los modelos de la actividad eléctrica, independientemente del tipo celular, se basan en la representación de la membrana como un circuito eléctrico equivalente.

## 2.6. Técnica experimental de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch clamp*) en la configuración de célula completa

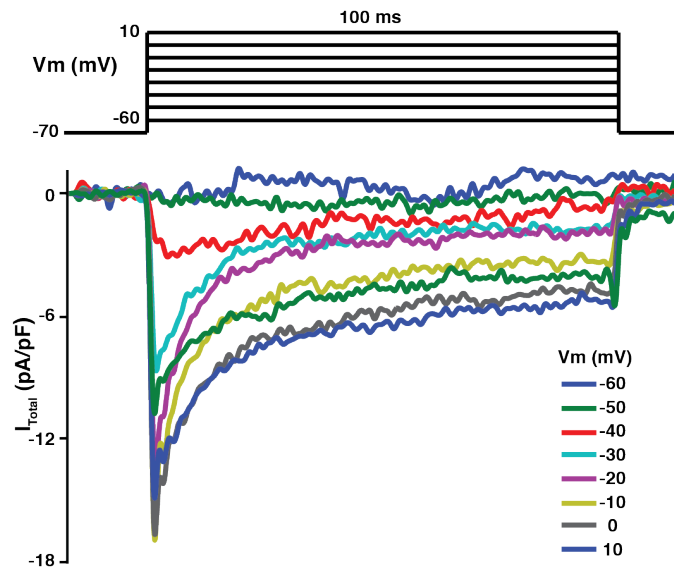
Como se vio en la sección anterior, los cambios en el potencial de membrana dependen principalmente de la identidad y características de las corrientes iónicas involucradas. Normalmente se emplean técnicas experimentales bien conocidas para el estudio y caracterización de dichas corrientes. En este caso, ya que lo que se busca es reproducir el comportamiento eléctrico de la célula completa siguiendo la representación de la membrana celular como un circuito eléctrico equivalente, es necesario partir de registros de las corrientes macroscópicas, que en este caso fueron obtenidos mediante experimentos de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch clamp*) en la configuración de célula completa (ver Sección 4.4.1). Esta configuración es usada para registrar las corrientes que fluyen a través de toda la membrana celular, permitiendo simultáneamente manipular el ambiente intracelular [9, 16, 17]. Un diagrama de esta técnica experimental se muestra en la Fig 2.6. En esta configuración, una micropipeta hace contacto con la membrana celular formando un sello de alta resistencia (1). Posteriormente, mediante succión (2) se provoca la ruptura de la membrana, permitiendo el contacto directo de la solución de la pipeta y el electrodo con el citoplasma (3), lo que permite el acceso eléctrico al interior de la célula. La punta de la pipeta es lo suficientemente grande como para permitir la eliminación del contenido citoplasmático, aunque hay evidencia de que los amortiguadores endógenos de  $\text{Ca}^{2+}$  fijos se conservan en el medio intracelular [18, 19]. Además, debido a la diferencia de volúmenes entre la pipeta y la célula ( $\sim 10 \mu\text{L}$  y  $\sim 1 \text{pL}$  respectivamente [17]), una vez rota la membrana el fluido intracelular se puede considerar igual a la solución de la pipeta (4).



**Figura 2.6:** Técnica experimental fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch clamp*) en la configuración de célula completa. (1). Se forma un sello entre la pipeta y la membrana celular. Mediante succión (2) se produce la ruptura de la membrana celular (3) permitiendo el acceso eléctrico al interior celular. Los componentes solubles citosólicos se dializan con la solución de la pipeta (4).

El principio de la técnica experimental de fijación de voltaje consiste en inyectar corriente de igual magnitud pero de signo opuesto a la corriente que fluye a través de la membrana celular, lo que, al no existir un flujo de corriente neto, permite mantener el potencial de membrana a un valor constante. En estos experimentos se mide la corriente a través de la totalidad de la membrana celular, producida por el flujo de iones a través de una gran cantidad de canales de diferentes tipos (corriente macroscópica). Para estudiar poblaciones específicas de canales iónicos se utilizan por lo general bloqueadores selectivos de canales o experimentos de sustitución iónica. Una descripción detallada de esta técnica experimental se puede consultar en otros textos especializados ([9, 16, 17]).

Los registros experimentales de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula  $\beta$  humana aislada en los que se basa este trabajo fueron obtenidos por Braun et al.[20] mediante experimentos de fijación de voltaje usando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana en la configuración de célula completa. Un ejemplo de los registros de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenidos de estos experimentos se muestran en la Fig. 2.7.



**Figura 2.7:** Registros de la corriente macroscópica total de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula  $\beta$  humana obtenidos mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana en la configuración de célula completa. Se aplicaron pulsos de voltaje de 100 ms de duración partiendo de un potencial de mantenimiento de -70 mV a valores de voltaje de prueba entre -60 y 10 mV. Se muestran trazos típicos de los experimentos realizados por Braun et al.[20] (ver Sección 4.4.1).





# Capítulo 3

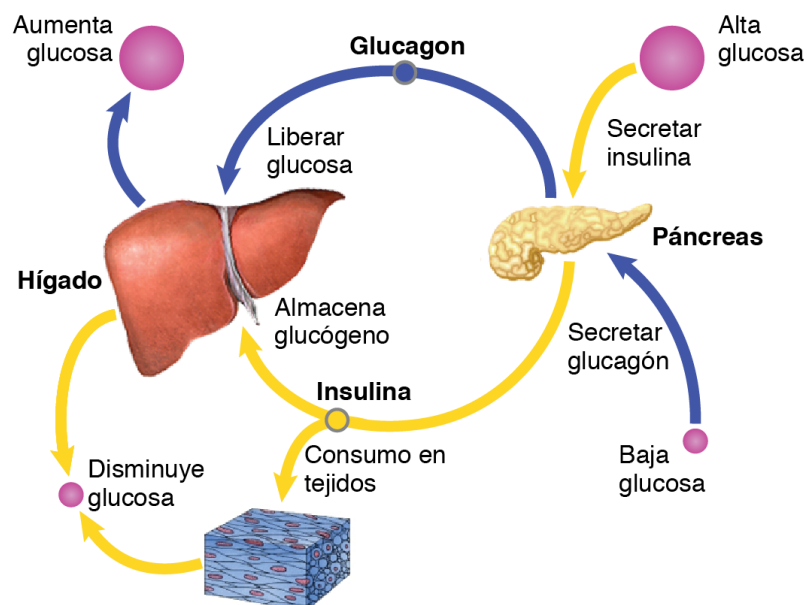
## Antecedentes

La célula  $\beta$  es parte fundamental del sistema de regulación de la glucosa, al ser la única célula capaz de secretar insulina y por lo tanto de disminuir los niveles de glucosa en sangre directamente. Como complemento al trabajo experimental, los modelos matemáticos de la célula  $\beta$  han sido de mucha utilidad para comprender la manera en que diversos mecanismos celulares interaccionan para dar lugar a la secreción de insulina estimulada por glucosa. Una gran cantidad de modelos basados en datos de células  $\beta$  de roedor han sido propuestos en los últimas décadas, y sólo recientemente han surgido modelos matemáticos basados en datos obtenidos de células  $\beta$  humanas. En este capítulo, basado casi en su totalidad en nuestro artículo de revisión[21] (**Artículo 2**), se hace una revisión del campo del modelado matemático de la célula  $\beta$ , partiendo de una descripción breve de los mecanismos celulares que participan en la secreción de insulina.

### 3.1. Sistema de regulación de la glucosa

El nivel de glucosa en sangre promedio en el cuerpo humano oscila alrededor de los 90 mg/dl[22], alcanzando una concentración máxima no mayor a 165 mg/dl después de la ingesta de alimentos[23], y una concentración mínima de 60 mg/dl observada después del ejercicio físico o de un ayuno prolongado[24, 25]. Estos niveles de glucosa son estrictamente regulados por un sistema de regulación neurohormonal, ya que concentraciones de glucosa por encima del valor máximo (165 mg/dl) incrementan el riesgo de enfermedades cardiovasculares[26]. Asimismo, concentraciones menores que el valor mínimo (60 mg/dl) podrían afectar la función cerebral[27] y provocar además convulsiones, daño cerebral permanente e incluso la muerte[22].

El sistema de regulación de la glucosa está compuesto por una gran cantidad

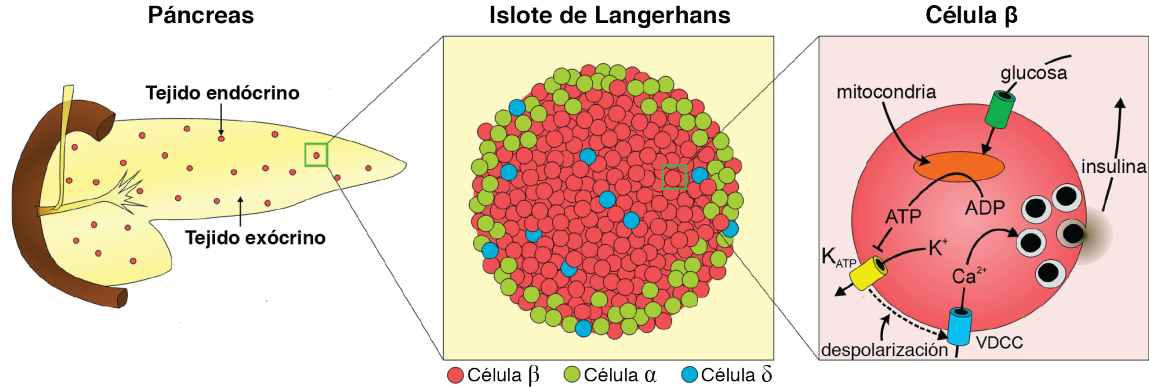


**Figura 3.1:** Diagrama simplificado del sistema de regulación de la glucosa. Acción de la **insulina** (trayectoria amarilla). Al aumentar la concentración de glucosa en sangre, el páncreas secreta insulina que, a través de su efecto a nivel hepático y de los tejidos, reduce los niveles de glucosa. El **glucagón** (trayectoria azul) tiene un efecto opuesto a la insulina y es secretado en respuesta a niveles bajos de glucosa.

de mecanismos fisiológicos a diferentes niveles de organización, siendo la acción de diversas hormonas y neurotransmisores, liberados por diferentes órganos, la vía en que son regulados los flujos de glucosa que finalmente determinan la concentración de glucosa en sangre. Entre estos destacan la insulina y el glucagón, hormonas secretadas por el páncreas, así como las catecolaminas, secretadas por la médula adrenal en respuesta a cambios en el sistema nervioso simpático. Otros factores importantes para la regulación de la glucosa en sangre son las incretinas, que son hormonas intestinales que potencian la secreción de insulina después de la ingesta de alimentos por la vía oral[28].

De manera simplificada, este sistema se puede describir de la siguiente manera (Fig. 3.1): Cuando ocurre un incremento en la concentración de glucosa en sangre, es estimulada la liberación de insulina del páncreas, la cual, al unirse a receptores específicos, suprime la liberación de glucosa del hígado[29], además de promover la traslocación de los transportadores de glucosa a la membrana celular en los tejidos adiposo y muscular, incrementando su consumo de glucosa[30]. Simultáneamente, la acción de la insulina permite que el hígado capture glucosa del torrente sanguíneo para ser almacenada en forma de glucógeno para su posterior utilización. Una cantidad importante de glucosa es utilizada como combustible, como ocurre en el tejido muscular y en el cerebro, siendo el consumo de glucosa en este último independiente de la acción de la insulina.

Por otro lado, niveles de glucosa bajos promueven la secreción de glucagón de las



**Figura 3.2:** Niveles de organización en el páncreas. El tejido endócrino del páncreas, disperso en el tejido exócrino, se compone de grupos de células llamados islotes pancreáticos o islotes de Langerhans. En ellos se encuentran diversos tipos de células entre las que destacan la célula  $\beta$ , responsable de la secreción de insulina. Adaptada de [33].

células  $\alpha$  del páncreas. Esta hormona juega el papel opuesto a la insulina, siendo así la principal responsable del restablecimiento del nivel de glucosa ante un estado de hipoglucemia[31] (Fig. 3.1). El glucagon actúa exclusivamente en el hígado, en donde se une a receptores específicos y potencia la degradación del glucógeno almacenado a glucosa, que al ser liberada en el torrente sanguíneo incrementa los niveles de glucosa. Por su parte, las catecolaminas, que son liberadas en forma tanto de hormonas como de neurotransmisores (e.g. epinefrina y norepinefrina) durante el estado de hipoglucemia, tienen como principales efectos la inhibición de la secreción de insulina, así como promover indirectamente la liberación de glucosa (gluconeogénesis y glucogenólisis) a nivel hepático. A nivel renal, las catecolaminas estimulan también la producción y liberación de glucosa (gluconeogénesis[22, 32]), mientras que en el tejido muscular inhiben el consumo de glucosa y estimulan la degradación del glucógeno almacenado a glucosa (glucogenólisis).

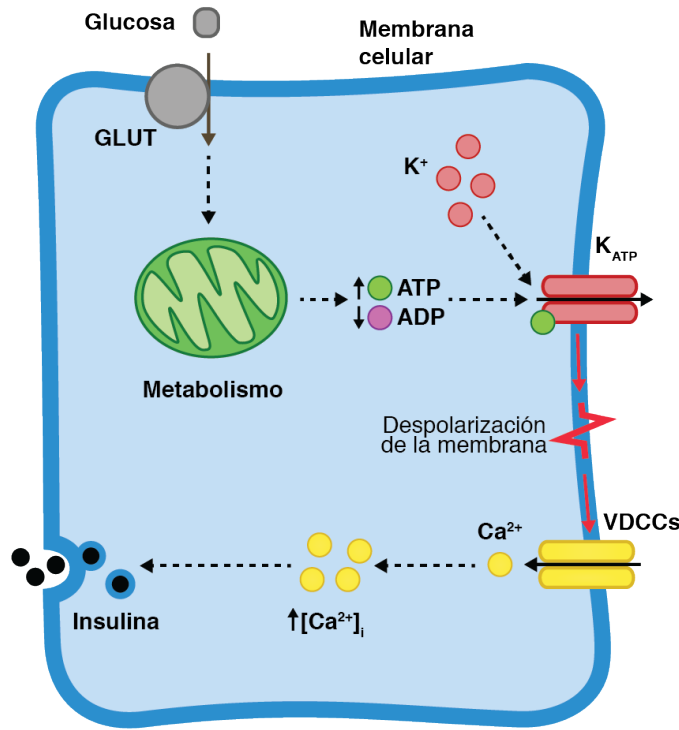
Dentro del páncreas, las células  $\beta$  y  $\alpha$ , productoras y secretoras de insulina y glucagon respectivamente, se encuentran agrupadas en los denominados islotes pancreáticos, también conocidos como islotes de Langerhans, que constituyen el páncreas endócrino y que se encuentran dispersos en el tejido acinar del páncreas exócrino (Fig. 3.2).

## 3.2. Fisiología de la célula $\beta$

### 3.2.1. Mecanismo general de secreción de insulina

En la célula  $\beta$ , la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) es promovida por el incremento en la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), generado por una secuencia de eventos bien establecida (Figs. 3.3 y 3.2) que comienza con el transporte de glucosa al interior de la célula a través de los transportadores específicos de glucosa (GLUT), lo que acelera el metabolismo celular, dando como resultado la producción de adenosin trifosfato (ATP) a expensas de adenosin difosfato (ADP). Esto genera un aumento en la relación ATP/ADP, provocando el cierre de los canales de  $K^+$  sensibles al ATP ( $K_{ATP}$ ), dando inicio a la despolarización lenta del potencial de membrana ( $V_m$ ). Se ha propuesto que, además del cierre de los canales  $K_{ATP}$ , una corriente no específica a través de canales TRP (receptores del potencial transitorio) contribuye a la despolarización inicial del potencial de membrana[10, 34]. Eventualmente se alcanza el potencial de membrana umbral al que los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje (VDCCs) son activados, permitiendo el flujo de  $Ca^{2+}$  hacia el interior de la célula. Es el incremento en  $[Ca^{2+}]_i$ , provocado por estos eventos, el que finalmente estimula la secreción de insulina. Es esta la principal vía de secreción de insulina estimulada por glucosa, y se le conoce comúnmente como vía dependiente de los canales  $K_{ATP}$ . Como complemento a esta última, la secreción de insulina estimulada por glucosa es amplificada por una vía independiente de los canales  $K_{ATP}$ , conocida como vía de amplificación, que mejora el efecto del incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  en la maquinaria de exocitosis[35-38]. Los mecanismos celulares y moleculares detrás de la vía de amplificación aún no han sido identificados completamente, aunque se piensa que diversos factores metabólicos juegan un papel clave[39, 40]. Además, existen otras vías neurohormonales (e.g. a través del sistema nervioso parasimpático o las incretinas) que potencian la secreción de insulina[39].

Alteraciones a nivel de la célula  $\beta$  están fuertemente relacionadas a niveles de glucosa en ayunas anormales y/o a alteraciones en la tolerancia a la glucosa, que pueden dar paso al desarrollo de diabetes tipo 2 (DT2)[41], enfermedad caracterizada principalmente por una marcada resistencia a la insulina y disfunción de la célula  $\beta$ . Muchos factores son conocidos por alterar la adecuada secreción de insulina a nivel celular. Por ejemplo, se han asociado mutaciones en la expresión de los canales iónicos con un riesgo mayor de diabetes[2, 10, 42]. Además, se ha demostrado que defectos en la sensibilidad a la glucosa, así como alteraciones en su metabolismo podrían resultar en hiperglucemia y eventualmente en DT2[1, 43].



**Figura 3.3:** Modelo básico de la secreción de insulina estimulada por glucosa. Después de ser transportada al interior de la célula a través de los transportadores GLUT, la glucosa es metabolizada, potenciando la producción de ATP y como consecuencia el cierre de los canales de  $K^+$  sensibles al ATP. La membrana es despolarizada, activando eventualmente los canales iónicos de  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje, lo que produce un incremento en  $[Ca^{2+}]_i$ , finalmente estimulando la secreción de insulina. Adaptada de la ref. [21].

### 3.2.2. Canales iónicos y actividad eléctrica

Los cambios en el potencial de membrana de la célula  $\beta$ , necesarios para permitir la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los VDCCs, son generados por la acción conjunta de mecanismos de transporte iónico (canales iónicos, bombas e intercambiadores), que son regulados por ligandos (e.g.  $Ca^{2+}$  o ATP) o por el mismo potencial de membrana. Una gran cantidad de canales iónicos participan en la formación del patrón de actividad eléctrica de la célula  $\beta$ , entre los que se incluyen canales de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  dependientes del voltaje, así como canales de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes del  $Ca^{2+}$  [34, 44-46]. De especial importancia son los canales  $K_{ATP}$ , que sirven como enlace entre los cambios en el metabolismo de la glucosa y la actividad eléctrica en las células  $\beta$ [14]. Otros canales catiónicos no selectivos, como los canales denominados receptores del potencial transitorio (TRP) han sido también encontrados en células  $\beta$ [34, 44]. Una descripción más detallada de las propiedades de los canales iónicos en células  $\beta$  pueden consultarse en las diferentes revisiones sobre el tema[34, 44, 45, 47].

La expresión de los canales iónicos difieren entre especies[20, 48], como se muestra en la Tabla 3.1. Estas diferencias posiblemente se ven reflejadas en el correspondiente patrón de actividad eléctrica (para revisiones recientes ver referencias [10, 34, 44, 49]).

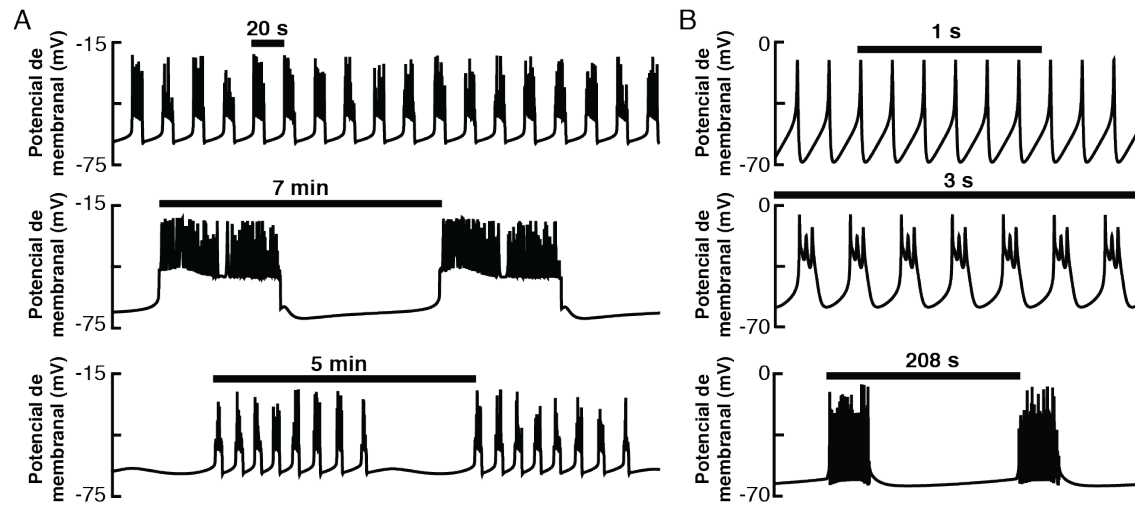
En roedores, las células  $\beta$  exhiben un patrón de actividad eléctrica característico que se compone de oscilaciones lentas en  $V_m$ , sobre las cuales se sobreponen potenciales de acción[44-46]. A este comportamiento se le conoce como ráfagas de potenciales de acción o actividad eléctrica en ráfagas (Fig. 3.4A). Diversos tipos de actividad eléctrica en ráfagas se han observado en roedores[50-52], que pueden ser clasificados como oscilaciones “rápidas” (período  $< 60$  s), “lentas” (período  $< 1$  min) y “mixtas” (oscilaciones rápidas superpuestas en oscilaciones lentas). Simulaciones de los distintos patrones de actividad eléctrica observados experimentalmente en células  $\beta$  de roedor se muestran en la Fig. 3.4A. Los registros experimentales equivalentes, obtenidos por Beauvois et al.[52] por medio de la técnica de registro intracelular en islotes de ratón, se pueden consultar en la Fig. 2 en la ref. [52]. Por otro lado, en las células  $\beta$  humanas, el disparo de potenciales de acción es el patrón eléctrico más común, aunque el comportamiento en ráfagas se ha observado también recientemente[10, 20, 53, 54]. Rorsman y Braun[10] reportaron que en la gran mayoría de las células  $\beta$  humanas registradas ( 70 %) mediante la técnica de *patch* perforado se observó un patrón eléctrico en forma de disparo de potenciales de acción, mientras que solo en un porcentaje menor ( 25 %) se observó el disparo de ráfagas rápidas con un periodo de 2-5 s. Ráfagas lentas, con un periodo de minutos fueron obtenidas recientemente[10, 54] usando la misma técnica experimental, aunque la incidencia de este comportamiento es, hasta donde se sabe, muy baja. Simulaciones que reproducen los patrones de actividad eléctrica observados en la célula  $\beta$  humana se muestran en la Fig. 3.4B (los registros experimentales equivalentes se pueden ver en las Fig. 1, 2 y 6 en la ref. [54]).

Es importante mencionar que el comportamiento eléctrico de las células  $\beta$  varía dependiendo de las condiciones experimentales en las que se llevan a cabo los registros. Por ejemplo, en experimentos en roedores se ha observado que las ráfagas rápidas son más comunes en registros de células  $\beta$  en islotes completos, aunque se sabe que el periodo de oscilación puede cambiar debido a estímulos externos, produciendo por ejemplo ráfagas de potenciales de acción lentas (con un periodo de minutos) al estimular con epinefrina o ráfagas aún más rápidas (periodo  $\leq 10$  s) en respuesta a un estímulo de acetilcolina[50]. Por otra parte, en células aisladas, el comportamiento eléctrico más común son las ráfagas con un período menor a 10 segundos, aunque en ocasiones también se observan oscilaciones lentas con un periodo de minutos. Raramente se han encontrado ráfagas con un periodo de 10-60 s en células  $\beta$  aisladas, a diferencia de los registros electrofisiológicos en islotes completos.

En una reciente revisión sobre el tema, Rorsman y Braun[10] propusieron un modelo cualitativo para la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana (Fig. 3.5). De acuerdo con este modelo, a niveles de glucosa no estimulatorios ( $\leq 3$  mM) la acti-

Canal	Ratón	Humano	Referencias
$K_{ATP}$	Kir6.2/SUR1		[48, 55-57]
$Ca_L$	$Ca_v1.2$ , $Ca_v1.3$		[10, 20, 58]
$Ca_T$		$Ca_v3.1$ , $Ca_v3.2$	[10, 20, 58]
$Ca_{PQ}$	$Ca_v2.1$		[10, 20, 58]
$Ca_N$	$Ca_v2.2^a$		[10, 20, 47, 58]
$Ca_R$	$Ca_v2.3$		[47, 58]
$Na_v$	$Na_v1.3$ , $Na_v1.7$	$Na_v1.6$ , $Na_v1.7$	[10, 20, 59, 60]
$K_v$	$K_v2.1$ , $kA$ , Herg	$K_v2.1$ , $K_{ir}$ , Herg	[10, 20, 44, 47, 61-64]
BK	KCa1.1		[10, 20, 47]
SK	SK1-4	SK3, SK4	[10, 44, 65, 66]

**Tabla 3.1:** Diferencias y similitudes en la expresión de los canales iónicos de células  $\beta$  de ratón de ratón y de humano. <sup>a</sup>Es aún debatida la presencia de estos canales en la célula de ratón.



**Figura 3.4:** Patrones de actividad eléctrica en células  $\beta$ . **A.** Simulaciones del comportamiento eléctrico en forma de ráfagas de potenciales de acción en células  $\beta$  de roedor. Se muestran ráfagas rápidas (arriba), lentas (medio) y compuestas (abajo). Simulaciones hechas con el Modelo del Oscilador Dual (DOM) [67]. **B.** Simulaciones de la actividad eléctrica en células  $\beta$  humanas. Se muestran disparos de potenciales de acción (arriba), y ráfagas de potenciales rápidos (medio) y lentas (abajo). Simuladas con el modelo de Riz et al.[54] Adaptada de ref. [21].

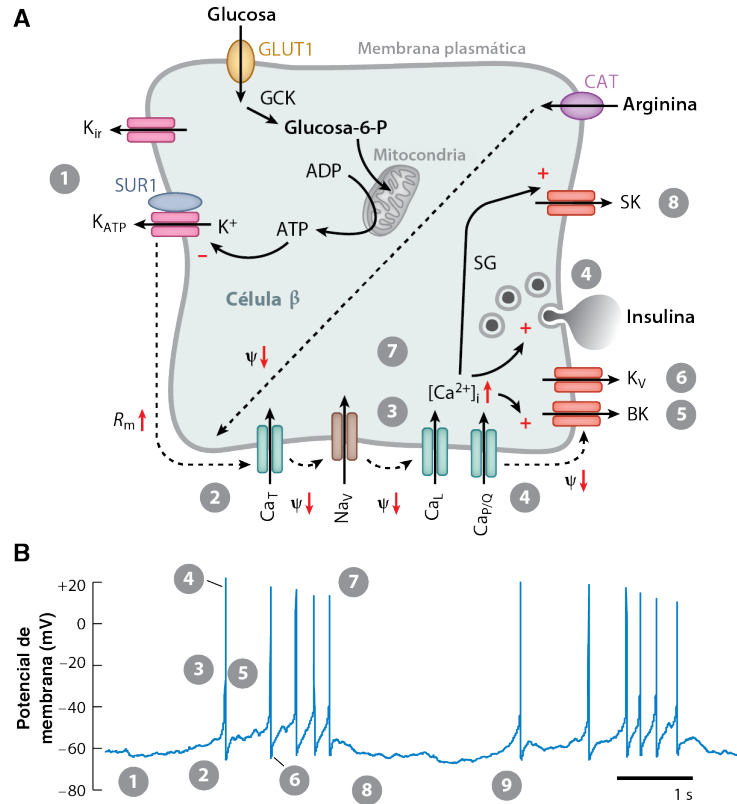
Canal	$V_m$ umbral (mV)	Referencia
$Ca_L$	-40	[10, 20]
$Ca_T$	-60	[10, 20]
$Ca_{PQ}$	-20	[10, 20]
$Na_v$	-30	[10, 20]
BK	-30	[10, 20]
$K_v$	-20 – -30	[10, 20, 61]
HERG	-50	[62, 63]

**Tabla 3.2:** Potencial de membrana de activación de las corrientes iónicas de la célula  $\beta$  humana incluidas en el modelo.

vidad de los canales  $K_{ATP}$  y  $K_{ir}$  mantienen un potencial de membrana negativo de alrededor de -70 mV. Concentraciones de glucosa ligeramente mayores (3.5 - 6 mM) provocarían el cierre de estos canales de  $K^+$ , llevando al potencial de membrana a -60 mV, permitiendo la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo T para producir una mayor despolarización. Se ha propuesto que canales no específicos, como los canales TRP participan como una corriente de fondo que contribuye a la despolarización inicial[10, 34], aunque su función en la célula  $\beta$  humana no ha sido estudiada[10]. Eventualmente, el potencial de membrana se habrá despolarizado lo suficiente como para permitir la activación de los canales de  $Na^+$ , seguidos de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L. Estas dos poblaciones de canales son responsables del disparo inicial del potencial de acción. Conforme el potencial se acerca a -20 mV, los canales de  $Ca^{2+}$  tipo P/Q se abren, provocando la exocitosis de los gránulos de insulina. El incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular resultante de la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  activa los canales de  $K^+$  dependientes del  $Ca^{2+}$ , que contribuyen a la repolarización del potencial de acción iniciada por la inactivación de los canales de  $Na^+$ . De acuerdo con este modelo, tanto los canales de  $K^+$  del tipo rectificador tardío como los canales de  $K^+$  tipo HERG (nombre procedente de las siglas correspondientes a su denominación en inglés “*human ether-a-go-go-related gene*”) podrían contribuir a la repolarización del potencial de acción, teniendo también un papel relevante en la hiperpolarización transitoria que ocurre después de los potenciales de acción. En la Tabla 3.2 se muestran los valores umbrales de voltaje a los que se detectan las principales corrientes iónicas durante experimentos de fijación de voltaje en la célula  $\beta$  humana.

Es importante mencionar que aunque se conoce con cierto detalle el papel de los canales iónicos en la producción del comportamiento eléctrico en forma de potenciales de acción, el origen del comportamiento eléctrico en ráfagas es aún materia de debate.





**Figura 3.5: A y B.** Contribución de los canales iónicos a la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana. En condiciones de glucosa no estimulatoria el potencial de membrana en reposo es determinado por los canales  $K_{ATP}$  y  $K_{ir}$  (1). Un incremento de glucosa a niveles estimulatorios produce el cierre de los canales  $K_{ATP}$  como resultado del incremento en la actividad metabólica, iniciando la despolarización de la membrana y la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo T (2). Cuando la membrana se ha despolarizado lo suficiente se abren los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, seguidos de los canales de  $Na^+$  (3). Casi al llegar al pico del potencial de acción son activados los canales de  $Ca^{2+}$  tipo P/Q, incrementando la entrada de  $Ca^{2+}$  y promoviendo la secreción de insulina (4) y la apertura de los canales  $K_{Ca}$  de alta conductancia (BK), que junto con la inactivación de los canales de  $Na^+$  provocan la repolarización de los potenciales de acción (5). Se piensa que el cierre de los canales de  $K^+$  (HERG y  $K_v$ ) participa en la aparición de la hiperpolarización al final del potencial de acción (6). La amplitud reducida de los potenciales de acción subsecuentes se explica por la inactivación acumulada tanto de los canales de  $Na^+$  como de  $Ca^{2+}$  tipo L (7). Los canales  $K_{Ca}$  de baja conductancia (SK), que se abren conforme aumenta transitoriamente  $[Ca^{2+}]_i$ . Posteriormente, los canales  $K_{ATP}$  se abren ante la disminución del cociente ATP/ADP (8). Un siguiente grupo de potenciales de acción es producido una vez que el cociente ATP/ADP incrementa una vez más,  $[Ca^{2+}]_i$  ha disminuído y los canales de  $Ca^{2+}$  tipo T han sido reactivados (9). Adaptada de [10].

Se ha propuesto que el comportamiento en ráfagas de potenciales de acción observado en células  $\beta$  humanas es provocado por la apertura de los canales  $K_{Ca}$  de baja conductancia (SK)[10, 54] y/o de los canales  $K_{ATP}$  debido a la disminución del cociente ATP/ADP resultante del consumo energético por parte de mecanismos como las bombas  $Ca^{2+}$ -ATPasas[10].

### 3.2.3. Manejo del $Ca^{2+}$ intracelular y metabolismo

El incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) es la señal principal para promover de la exocitosis de insulina. Se ha observado que  $[Ca^{2+}]_i$  oscila en sincronía con el potencial de membrana[68-71], y que la exocitosis de insulina ocurre cuando los canales de  $Ca^{2+}$  se encuentran activos[72-74]. Muchos mecanismos son responsables de las oscilaciones y el manejo del  $Ca^{2+}$  intracelular (ver ref. [71] para una revisión extensa sobre el tema). La entrada de  $Ca^{2+}$  se produce por la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje, siendo transportado hacia el exterior de la célula  $\beta$  a través de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA)[75] y el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX)[76, 77]. Se sabe que las células  $\beta$  tanto de humano como de ratón expresan las cuatro isoformas (PMCA1-4) de la bomba PMCA[78-80]. Por otro lado, estudios en células  $\beta$  de roedores indican que las isoformas presentes en las células  $\beta$  son las NCX1.2, NCX1.3 y NCX1.7[79, 81], aunque podrían existir diferencias entre especies.

En el medio intracelular, el  $Ca^{2+}$  es regulado por los depósitos intracelulares: el retículo endoplásmico (ER) y la mitocondria. El ER captura  $Ca^{2+}$  a través de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa del retículo sarco-endoplásmico (SERCA) durante el incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  causado por la apertura de los VDCCs, lo que limita la amplitud de las oscilaciones del  $Ca^{2+}$  intracelular. Además, se ha mostrado que el ER es relevante tanto para las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  y el control de  $V_m$  [52]. Estudios de inmunocitoquímica y PCR indican que tanto en células  $\beta$  de roedor como de humano se expresan la SERCA3 y SERCA2b[82-84]. Durante el período de repolarización, el  $Ca^{2+}$  es liberado del ER, evitando una caída abrupta de  $[Ca^{2+}]_i$  [85, 86]. La salida de  $Ca^{2+}$  del ER a través de canales como los receptores de inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ Rs) o los receptores de rianodina (RyRs) es controlada por el mismo  $Ca^{2+}$  o por mensajeros intracelulares (e.g.  $IP_3$ )[86-88]. Esto permite que la célula  $\beta$  responda a agonistas muscarínicos al liberar  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico hacia el citosol[89]. Las células  $\beta$  humanas expresan las isoformas  $IP_3R2$  e  $IP_3R3$  (pero no la  $IP_3R1$ )[90], mientras que en ratas y en células INS1 se ha reportado la presencia de las tres isoformas ( $IP_3R1-3$ )[91]. Por su parte, estudios de inmunofluorescencia indican que la mayoría de las células  $\beta$  humanas cuentan con los tipos RyR1 y RyR2 de los receptores de rianodina[92], a

diferencia de las células  $\beta$  de rata en las que estudios de PCR indican que se expresan los receptores RyR2 pero no los RyR1[91].

La mitocondria tiene una gran capacidad para la captura de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque se sabe que en condiciones de reposo esta no juega un papel importante como depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  [43, 93]. Sin embargo, se ha propuesto que la mitocondria funciona como un amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  que limita la amplitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos[94, 95]. Un aumento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es transmitido a la mitocondria en donde la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se da a través del uniportador mitocondrial (MCU), y es transportado al citosol por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (NCLX)[96, 97]. En células INS1, el uniportador mitocondrial forma un complejo con el MICU1 (mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake 1), que sirve como el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  que regula la actividad del MCU[98]. Desde el punto de vista funcional estos dos mecanismos (MCU y NCLX) podrían ser de suma importancia para la secreción de insulina estimulada por glucosa. Esto lo demostraron Tarasov et al.[96] en células  $\beta$  de ratón, quienes, al inhibir el funcionamiento del MCU, observaron un incremento menor del  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ , lo que se tradujo en la disminución del cociente ATP/ADP. Por el contrario, al bloquear la actividad del intercambiador NCLX observaron un incremento en el cociente ATP/ADP, debido a una mayor duración del incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial[96].

La mitocondria y el metabolismo de la glucosa juegan un papel de suma importancia en el control de la secreción de insulina estimulada por glucosa (revisiones extensivas se pueden encontrar en las ref. [43, 99-102]). En las células  $\beta$ , la primera etapa del metabolismo es la glucólisis, en la que la glucosa es metabolizada a piruvato por medio de una serie compleja de reacciones enzimáticas. El piruvato es entonces procesado durante el ciclo tricarboxílico (TCA), resultando en los portadores de electrones NADH y FADH<sub>2</sub>. Los electrones de estos portadores son utilizados posteriormente en la cadena respiratoria, que promueve la salida de protones de la matriz mitocondrial, generando un gradiente de protones y por lo tanto estableciendo un potencial de membrana mitocondrial[99]. Es el flujo de protones a través de la ATP sintasa el que produce la fosforilación de ADP a ATP. El ATP sintetizado es finalmente llevado al citosol por la nucleótido de adenina translocasa (ANT) que simultáneamente transporta ADP a la mitocondria.

Es el ATP el que regula la actividad de los canales  $K_{ATP}$  (que también son regulados por la concentración de ADP)[14] y de otros procesos dependientes del ATP, como la actividad de las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas (e.g. PMCA y SERCA)[52, 76, 103] y la exocitosis de insulina[104]. A pesar del aumento en el consumo de ATP por estos mecanismos, se ha observado un incremento neto en el cociente ATP/ADP citosólico[96, 105], lo que puede ser explicado por dos factores: la mayor disponibilidad de glucosa para ser metabolizada y el efecto del incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en

la oxidación de la glucosa[100], a través de la activación de las dehidrogenasas mitocondriales y otras enzimas[106-108]. Se ha propuesto también que el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  tiene un efecto negativo sobre la producción de ATP al reducir la fuerza protón motriz[95, 109, 110], aunque hay una gran cantidad de evidencia en el sentido de que el principal efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial es potenciar, en vez de inhibir, la producción de ATP[96, 100, 111].

La secreción de insulina es pulsátil con un periodo en el orden de minutos[112, 113]. Dado que oscilaciones metabólicas con un período similar han sido observadas[109, 110, 114-121], se ha propuesto que estas podrían ser el origen del comportamiento pulsátil de la secreción de insulina. Por ejemplo, se han observado oscilaciones lentas en el ATP y/o en el cociente ATP/ADP por medio de medición de bioluminiscencia de luciferasa[115, 118]. Otros autores[109, 110, 119] han reportado oscilaciones lentas en el potencial de membrana mitocondrial medidas por medio de la fluorescencia de Rhodamina 123. Además, se han mostrado el mismo tipo de oscilaciones en el consumo de oxígeno mitocondrial, medidas directamente mediante microsensores implantados[120]. El origen de las oscilaciones metabólicas es aún materia de debate, aunque al menos dos hipótesis han sido propuestas. Por un lado, se ha sugerido que son generadas durante la glucólisis debido a un ciclo de retroalimentación positiva del producto FBP en la actividad de la enzima PFK[122, 123]. Por otro lado, se ha propuesto también que la interacción entre la producción y consumo de ATP es responsable de las oscilaciones observadas en el ATP citosólico[103, 118, 124]. En el **Artículo 7**[125] se evaluó, mediante un modelo mínimo, el papel del comportamiento oscilatorio de la concentración de ATP en la actividad eléctrica en ráfagas de potenciales de acción, concluyendo que las oscilaciones metabólicas podrían tener un papel fundamental para el adecuado funcionamiento eléctrico de la célula  $\beta$ .

Alteraciones a nivel mitocondrial han sido relacionadas con la diabetes tipo 2 y sus complicaciones[126-128]. Por ejemplo, en islotes de pacientes diabéticos se ha observado una morfología mitocondrial alterada[129]. Asimismo, se ha reportado la reducción en la oxidación de la glucosa, el consumo de oxígeno y la producción de ATP[129, 130]. Se ha propuesto que una alteración en la producción de radicales libres (ROS, especies reactivas de oxígeno) podría tener efectos negativos en la oxidación de la glucosa y eventualmente a la pérdida de función de la célula  $\beta$ . Por otro lado, Tarasov et al.[96] mostraron mediante registros simultáneos del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial,  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la relación ATP/ADP (midiendo la fluorescencia de pericam, fura-red y perceval respectivamente), que deficiencias en el uniportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  de células  $\beta$  de ratón reducen el incremento en la relación ATP/ADP. Además de esto, Doliba et al.[131] mostraron mediante mediciones simultáneas del uso y oxidación de glucosa (mediciones radiométricas),  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (fluorescencia de fura-2

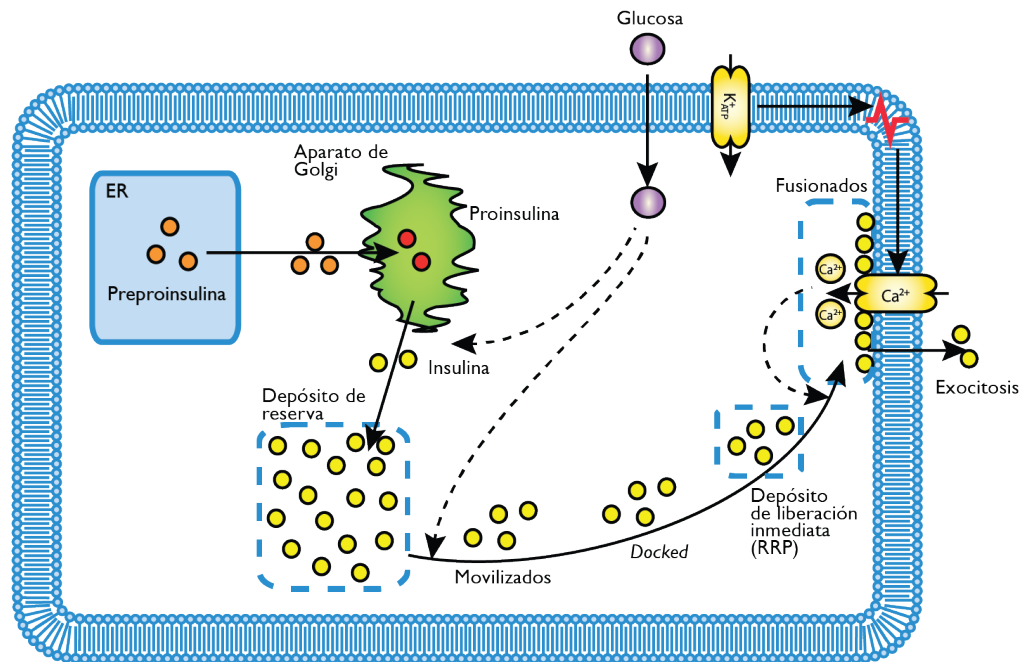
AM) y secreción de insulina (radioinmunoensayo) que alteraciones bioenergéticas en células  $\beta$  tanto de humano como de roedores (rata y ratón) resultan en una importante reducción en la producción de ATP. Se piensa que nuevos tratamientos para la diabetes tipo 2 podrían involucrar agentes farmacológicos que mejoren la función mitocondrial o bien reduzcan los efectos negativos de las alteraciones metabólicas[128]. En el **Artículo 3**[132] derivado de este proyecto, exploramos mediante un modelo computacional los efectos de una producción de ATP alterada y de deficiencias en la sensibilidad a la glucosa en el funcionamiento de la célula  $\beta$ . Nuestras simulaciones dan soporte a la hipótesis de que alteraciones metabólicas están fuertemente relacionadas a la patogénesis de la DT2.

### 3.2.4. Secreción de insulina

La secreción de insulina muestra una respuesta bifásica ante un estímulo de glucosa, que consiste en una primera fase transitoria, seguida de una segunda fase sostenida con una velocidad de secreción menor[133]. Se ha propuesto que este comportamiento se debe a la existencia de distintos depósitos de gránulos de insulina[133, 134] (ver Fig. 3.6), que se distinguen tanto por su proximidad a la membrana celular como por su sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  [135]. Una fracción menor de los gránulos conforma el depósito de liberación inmediata (RRP por sus siglas en inglés en *readily releasable pool*), localizado en la vecindad inmediata de los VDCCs, en donde los llamados microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  son formados al alcanzarse niveles mucho mayores de  $\text{Ca}^{2+}$  que en el resto del citosol[136-138]. Se piensa que la liberación de los gránulos que forman parte del RRP es responsable de la primera fase de la secreción de insulina[134, 139, 140], la cual termina una vez que el depósito RRP ha sido agotado. De acuerdo con esta propuesta, la segunda fase de secreción es sostenida por la movilización de gránulos de insulina desde un depósito de reserva hacia la membrana plasmática, en donde estos pueden ser liberados al medio extracelular[134]. Recientemente se mostró evidencia directa, adquirida mediante imágenes de microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF), que da soporte a esta propuesta[141, 142]. Una descripción detallada de los mecanismos involucrados en la exocitosis de los gránulos de insulina se puede encontrar en otros trabajos[133, 143, 144].

### 3.2.5. Diferencias entre especies

Mucho de lo que se conoce sobre la secreción de insulina y en general de la célula  $\beta$  se debe a estudios realizados en células de roedores. Estos resultados se han extrapolado al funcionamiento de las células  $\beta$  de humano con la finalidad entender las



**Figura 3.6:** Movilización de gránulos de insulina y exocitosis. La primera fase de secreción se debe a la liberación de los gránulos de insulina localizados en el depósito de liberación inmediata (RRP). La segunda fase es sostenida por la movilización de gránulos de insulina desde el depósito de reserva hacia la membrana celular en donde son liberados al exterior.

causas de enfermedades relacionadas al sistema de regulación de la glucosa, como la DT2. Las células  $\beta$  de roedores y humanos comparten ciertas características generales, como el bien establecido mecanismo general de secreción de insulina estimulada por glucosa (ver sección 3.2.1). Sin embargo, en los últimos años se han encontrado diferencias importantes a diferentes niveles de organización, lo que significa que las conclusiones derivadas de los estudios en células de roedor u otra especie deben de ser confirmadas en células humanas. A continuación se describen brevemente las diferencias más importantes entre las células  $\beta$  de roedores y de humano.

A nivel de los islotes de Langerhans, existen diferencias importantes tanto en la organización como la proporción de las diferentes células que los componen [145, 146]. Mientras en roedores las células  $\beta$  se encuentran claramente localizadas en el centro de los islotes, rodeadas por las demás células ( $\alpha$ ,  $\delta$ , etc.), en los islotes humanos se observa un arreglo de células más heterogéneo.

Otra diferencia importante es el nivel umbral de glucosa al que la insulina comienza a ser secretada. Mientras este umbral se encuentra en el rango de 3 a 4 mM en células humanas [147, 148], en roedores es de alrededor de 6 mM [149]. Asimismo, la dinámica de exocitosis muestra diferencias entre las dos especies [150]. Por ejemplo, mientras un pulso despolarizante de 500 ms produjo un incremento en la capacitancia de membrana de hasta  $\sim 430$  fF [20] en células  $\beta$  humanas, un pulso de 800 ms produjo un aumento en la capacitancia alcanzando únicamente  $\sim 150$  fF [151] en células  $\beta$  de ratón, lo que representa una respuesta tres veces menor.

La diferencia entre especies más importante para este trabajo la constituyen los canales iónicos expresados y su papel en la actividad eléctrica y la secreción de insulina [10, 20, 34]. En la célula  $\beta$  humana se han identificado canales de  $K^+$  dependientes del ATP, canales de  $Ca^{2+}$  tipo T, L y P/Q, canales de  $Na^+$  voltage-dependientes, canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de baja y alta conductancia (SK y BK respectivamente), canales de  $K^+$  voltage-dependientes, canales de  $K^+$  tipo HERG y canales receptores del potencial transitorio (TRP) no específicos ([10, 49], Fig. 3.5).

Al igual que las células  $\beta$  humanas, las células de roedores expresan canales de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje. Además, también se expresan los canales de  $K^+$  dependientes del ATP y los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  (SK y BK). Sin embargo, existen algunas diferencias en cuanto a la identidad molecular de los canales expresados en las diferentes especies. En la Tabla 3.1 (Sección 3.2.2) se muestran las principales diferencias en la expresión de los canales iónicos entre células  $\beta$  de ratón y de humano. La diferencia más importante entre las dos especies parece encontrarse en los canales permeables al  $Ca^{2+}$ . Células  $\beta$  de ambas especies cuentan con canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, y tipo P/Q, aunque estos últimos parecen no tener un rol relevante en la formación de la actividad eléctrica en las células de ratón [90]. Por otra parte,

los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T son expresados en las células humanas pero no en las de ratón, mientras que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo R se expresan en las células de ratón pero no en las de humano[34].

Estas diferencias a nivel de los canales iónicos se ven reflejadas en el comportamiento eléctrico observado en las diferentes especies. Mientras que en células  $\beta$  de roedor el patrón de actividad eléctrica más común son las ráfagas de potenciales de acción, en células humanas el disparo de potenciales de acción es el patrón comúnmente observado, aunque también se han observado ráfagas de potenciales de acción ocasionalmente[10, 49, 53, 54]. Es importante mencionar que todos los registros de actividad eléctrica en células  $\beta$  humanas consultados[10, 20, 49, 54] se han obtenido mediante la técnica de *patch* perforado, lo que podría influir en el patrón de actividad eléctrica observada.

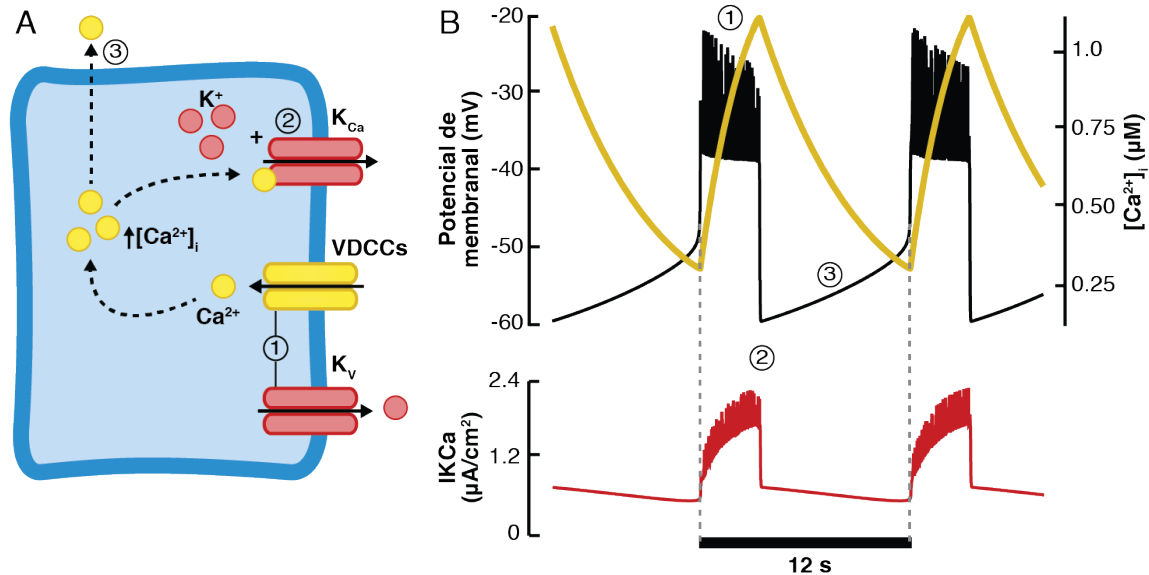
### 3.3. Modelos matemáticos de la célula $\beta$

Como complemento al trabajo experimental, los modelos matemáticos de las células  $\beta$  han sido ampliamente usados para entender cómo interactúan los diversos mecanismos celulares que participan en la secreción de insulina estimulada por glucosa, con la finalidad de proponer hipótesis y explicaciones factibles que expliquen las observaciones experimentales en células  $\beta$ .

Los modelos matemáticos de la célula  $\beta$  han ido creciendo en complejidad conforme ha surgido nueva evidencia experimental. En esta sección, se presenta un breve recuento de la evolución del campo de modelado matemático de la célula  $\beta$ . Una discusión más extensa sobre el tema se puede encontrar en nuestra reciente revisión[21] (**Artículo 2**), o en otras revisiones sobre el tema[51, 152-154].

Los primeros modelos matemáticos de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  se basaron en su totalidad en datos experimentales de células de ratón, y trataron de explicar el comportamiento eléctrico en ráfagas con un período  $< 60$  s (oscilaciones rápidas, ver sección 3.2.2), observado por primera vez por Dean y Matthews[155, 156] a finales de la década de los años sesenta. En general, estos primeros modelos se basaron en la idea de una sola variable lenta como mecanismo de retroalimentación para dar inicio y término a las ráfagas de potenciales de acción (mecanismo marcapasos). Por ejemplo, en el modelo de 1983 de Chay y Keizer[157], considerado el primer modelo de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$ , se utiliza el efecto de los cambios en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sobre la conductancia de los canales  $K_{Ca}$  como mecanismo marcapasos (Fig. 3.7), lo que había sido propuesto por Atwater et al.[158] para explicar sus observaciones experimentales. Experimentos posteriores mostraron que en realidad  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tiene una dinámica rápida[68, 69], similar a la mostrada por el potencial de mem-

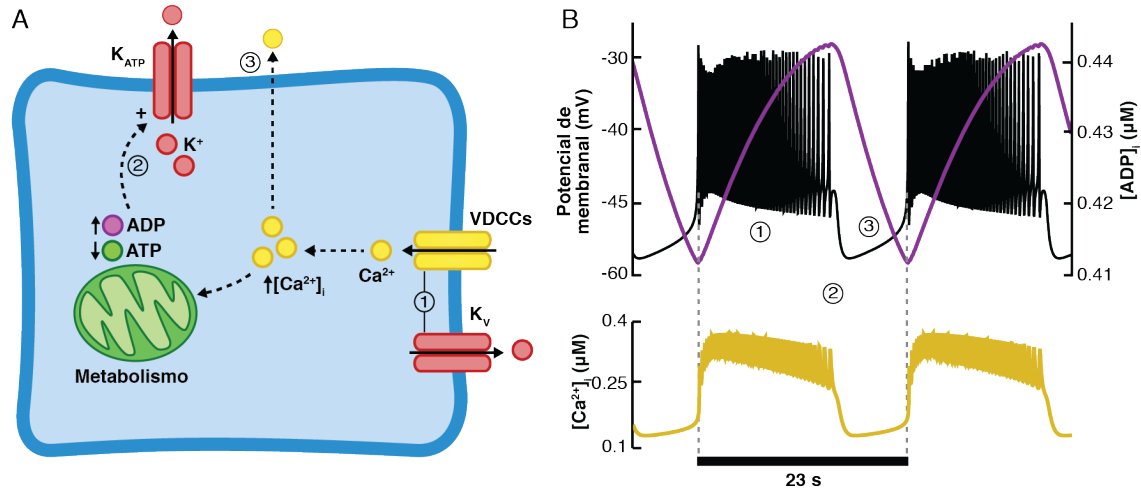




**Figura 3.7:** Modelo mínimo de Chay y Keizer (CK). **A.** Diagrama del modelo CK. La fase activa (1) es producida por los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje (VDCCs) y los canales  $K_v$ . Debido al incremento lento de  $[Ca^{2+}]_i$  los canales  $K_{Ca}$  son activados, eventualmente repolarizando el potencial de membrana (2). Durante la fase silente (3) los canales VDCCs se encuentran cerrados, y el  $Ca^{2+}$  es transportado al exterior de la célula, inhibiendo así la actividad de los canales  $K_{Ca}$ . La despolarización lenta eventualmente activa los VDCCs y los canales  $K_v$ , iniciando una nueva ráfaga de potenciales de acción. **B.** Ráfagas rápidas de potenciales de acción simuladas con el modelo CK[157]. Arriba: Potencial de membrana (curva negra) y  $[Ca^{2+}]_i$  (curva amarilla). Abajo: Corriente  $I_{KCa}$  como mecanismo marcapasos (ver texto principal). Adaptada de [21].

brana. Debido a esto, se propusieron mecanismos de retroalimentación alternativos, aunque es importante mencionar que prácticamente todos los modelos de la célula  $\beta$  existentes se basan en el modelo mínimo de Chay y Keizer[157].

Otro mecanismo propuesto mediante modelos matemáticos para explicar las oscilaciones rápidas de la actividad eléctrica fue la actividad de los canales  $K_{ATP}$ , identificados en la célula  $\beta$  en 1984[56, 159]. Los canales  $K_{ATP}$  mostraron ser de suma importancia para la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  al ser responsables de establecer el potencial de membrana en reposo, así como de dar inicio a la despolarización lenta que permite que otras corrientes depolarizantes sean activadas debido al cierre de los canales  $K_{ATP}$  al aumentar los niveles de ATP citosólico[10, 14, 47, 159]. Fueron los trabajos de Keizer y Magnus[160-162], así como el de Smolen y Keizer[163], los que introdujeron los canales  $K_{ATP}$  a los modelos matemáticos de la célula  $\beta$ . Con



**Figura 3.8:** Oscilaciones en la concentración de ATP regulan la actividad de los canales  $K_{ATP}$ . **A.** Durante la fase activa (1), sostenida por los canales VDCCs y  $K_v$ , incrementa el  $Ca^{2+}$  intracelular, ejerciendo un efecto negativo en la producción de ATP (reflejado en el incremento en el ADP). Los canales  $K_{ATP}$  se abren lentamente, repolarizando eventualmente el potencial de membrana (2). En la fase silente, la actividad de los VDCCs es inhibida junto con el flujo de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula, al mismo tiempo que  $Ca^{2+}$  es transportado al exterior de la célula. Conforme  $[Ca^{2+}]_i$  decrece, la producción de ATP incrementa, promoviendo el cierre de los canales  $K_{ATP}$  y la despolarización lenta de la membrana (3). **B.** Simulaciones de ráfagas de potenciales de acción rápidas producidas con el modelo de Smolen y Keizer[163]. Arriba: Potencial de membrana (curva negra) y concentración de ADP (curva púrpura). Abajo: La dinámica rápida de  $[Ca^{2+}]_i$  es similar a la observada experimentalmente. Adaptada de [21].

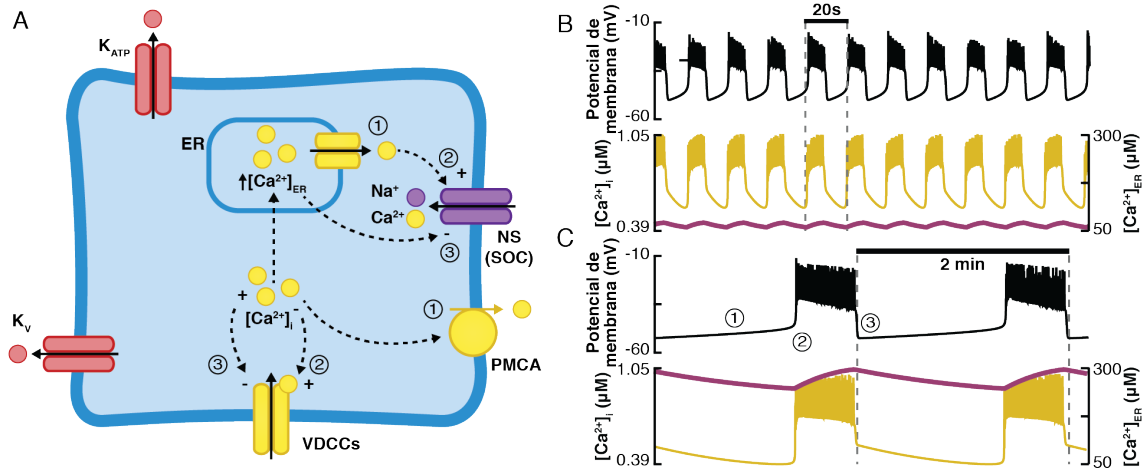
esto, lograron reproducir la dinámica rápida del  $Ca^{2+}$  intracelular, proponiendo a las variables metabólicas (e.g. ADP citosólico) como mecanismo marcapasos (ver Fig. 3.8).

Aunque existe evidencia experimental en favor de las oscilaciones tanto en el ATP citosólico[103, 118], así como en la actividad de los canales  $K_{ATP}$  durante la estimulación por glucosa[164], se ha sugerido que los canales  $K_{ATP}$  no son el único mecanismo de enlace entre el metabolismo de la glucosa y la liberación de insulina dependiente de  $Ca^{2+}$  vía cambios en el potencial de membrana[165], lo que podría explicar el hecho de que se ha observado actividad eléctrica persistente en respuesta a estímulos de glucosa en células  $\beta$  de ratón sin canales  $K_{ATP}$  funcionales (Kir6.2KO o SUR1KO)[165-167]. Sin embargo, es importante resaltar que la identidad de los mecanismos detrás de la actividad eléctrica independiente de los canales  $K_{ATP}$  es

aún desconocida. Los primeros modelos que incluyeron los canales  $K_{ATP}$  se basaron en dos ideas principales: 1) el efecto del  $Ca^{2+}$  en el metabolismo y 2) la relación entre la producción y el consumo de ATP. Otros modelos posteriores incluyeron descripciones detalladas del metabolismo de la glucosa[123, 168, 169], aunque se basaron en la hipótesis de que el comportamiento oscilatorio de las células  $\beta$  tiene como origen oscilaciones glucolíticas intrínsecas.

En 1990, Smith et al.[170] reportaron actividad eléctrica en ráfagas con un período en el orden de minutos (oscilaciones lentas, ver sección 3.2.2), la cual no fue posible reproducir con los primeros modelos matemáticos basados en un único mecanismo marcapasos[154, 171]. Esto propició el surgimiento de modelos más complejos en términos de las variables marcapasos propuestas como responsables del inicio y término de las ráfagas de potenciales de acción. Probablemente la característica más importante de estos nuevos modelos que surgieron a mediados de los años noventa fue la incorporación de los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  y los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de  $Ca^{2+}$  (tipo L), como en los modelos de Bertram et al. [172] y Chay [173], en los que se incluyeron por primera vez al retículo endoplásmico como segundo compartimento de  $Ca^{2+}$  (Fig. 3.9). Estos modelos fueron capaces de reproducir tanto las oscilaciones rápidas como las lentas debido a que en ellos el período de oscilación está determinado por la velocidad de liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico, ya que esta permite que el  $Ca^{2+}$  intracelular permanezca elevado por un tiempo mayor, manteniendo así a los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de  $Ca^{2+}$  en estado de inactivación, lo que retrasa el inicio de una nueva ráfaga de potenciales de acción. Además de esto, al incluir el retículo endoplásmico, también fue posible simular el efecto de agentes muscarínicos (como la acetilcolina) en la actividad eléctrica de las células  $\beta$ , que actúan regulando la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico[174].

Otro elemento importante que incorporaron los modelos con el ER como segundo compartimento de  $Ca^{2+}$  fue una corriente no específica activada por la liberación de  $Ca^{2+}$  del ER, llamada SOC por sus siglas en inglés (*Store Operated Channels*.) Esta corriente, de acuerdo con la hipótesis planteada por estos modelos permitiría la entrada de iones de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  durante la fase silente (cuando el ER está liberando  $Ca^{2+}$  al citosol), contribuyendo así a la despolarización inicial para dar paso a una nueva ráfaga de potenciales de acción. Aunque se piensa que una corriente SOC no específica está presente en las células  $\beta$ , esto es aún materia de debate. Recientemente se ha propuesto[175] que tanto una corriente no específica activada por  $Ca^{2+}$  (a través de los canales TRPM4-5), como una corriente SOC de  $Ca^{2+}$ , posiblemente generada por el complejo STIM1/ORAI1 (formado por la molécula de interacción con el estoma 1 y los canales de  $Ca^{2+}$  activados por la liberación de  $Ca^{2+}$ ), podrían tener un papel relevante en la regulación de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$ . Una revisión reciente



**Figura 3.9:** Retículo endoplásmico (ER) como segundo compartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los modelos de la célula  $\beta$ . **A.** Durante la fase activa (1),  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado del ER hacia el citosol siendo simultáneamente transportado al exterior de la célula a través de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA). Esto resulta en la activación de una corriente operada por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER (SOC) y de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  inactivada por  $\text{Ca}^{2+}$ , produciendo la despolarización de la membrana y el inicio de una ráfaga de potenciales de acción (2). Conforme  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  incrementa,  $\text{Ca}^{2+}$  es llevado al interior del ER, lo que provoca la inactivación tanto de la corriente SOC como de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  inactivada por  $\text{Ca}^{2+}$ , resultando en la repolarización de la membrana (3). **B y C.** Simulaciones de actividad eléctrica en savlas rápida (**B**) y lentas (**C**) hechas con el modelo de Chay[173]. Adaptada de [21]

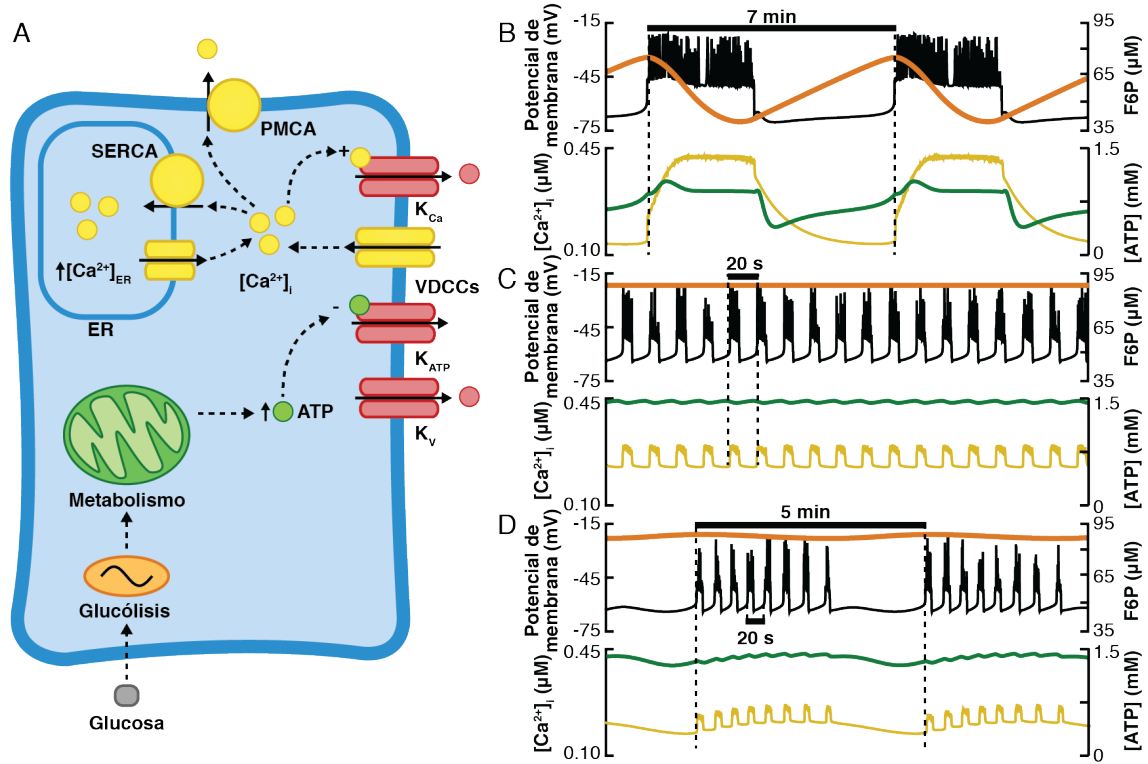
sobre las corrientes SOC se puede consultar en la ref. [175].

Otras propuestas fueron hechas más adelante para tratar de explicar el origen de las oscilaciones lentas. Entre estas destaca la propuesta de Bertram et al.[50], según la cual la periodicidad de la actividad eléctrica es determinada por la interacción entre una variable lenta y una rápida. Debido a que los modelos basados en esta idea son capaces de generar oscilaciones con un período intermedio diferente al período de estas variables, a este principio se le conoce como *phantom bursting*. Desde entonces han surgido una gran cantidad de modelos con el objetivo de determinar la identidad de estas variables. De hecho, los modelos descritos en el párrafo anterior en los que se introdujo el retículo endoplásmico son *phantom bursters*, aunque fueron identificados como tales hasta después de la propuesta de Bertram et al.[50].

Los modelos más recientes (basados en datos de células  $\beta$  de roedor) incluyen

representaciones detalladas de una gran cantidad de procesos celulares. Por ejemplo, el grupo de Fridlyand et al. ha propuesto a través de sus modelos[51, 176, 177] que la dinámica de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  ( $[\text{Na}^+]_i$ ) podría fungir como mecanismo marcapasos para la generación del patrón de actividad eléctrica en ráfagas. Estos modelos se basan en las observaciones experimentales de Grapengiesser et al.[178, 179], quienes midieron el  $\text{Na}^+$  intracelular a través de la fluorescencia de SBFI (sodium-binding benzofuran isophalate) en células  $\beta$  de ratón. Ellos sugirieron la posibilidad de que el incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en la fase activa de la actividad eléctrica podría generar un incremento en la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, provocando un lento incremento en la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular. Eventualmente se activaría a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  permitiendo el flujo de una corriente de  $\text{K}^+$  hacia afuera de la célula que provocaría la repolarización y la entrada a la fase silente de la actividad eléctrica, durante la cual  $[\text{Na}^+]_i$  disminuiría debido a una reducción de la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y por lo tanto inhibiendo también la corriente repolarizante a través de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , permitiendo el inicio de la despolarización y una nueva ráfaga de potenciales de acción.

El modelo más complejo propuesto hasta ahora se conoce como Modelo del Oscilador Dual (*Dual Oscillator Model*, DOM). Fue propuesto por Bertram et al.[67] en 2007 y se basa en modelos previos[171, 180] que utilizan el principio de *phantom bursting*. El DOM combina un modelo detallado de la glucólisis[122], el modelo del metabolismo mitocondrial de Magnus y Keizer[161, 162] y un modelo de actividad eléctrica[180]. Este modelo es capaz de reproducir todos los comportamientos eléctricos observados en la célula  $\beta$  de roedores (oscilaciones rápidas, lentas y mixtas, ver Fig. 3.10). La idea básica detrás del DOM es que diferentes regímenes de interacción entre la glucólisis, la producción de ATP y la actividad de los canales iónicos podría explicar la variedad de comportamientos observados en células  $\beta$  de roedores (ver **Artículo 2**[21] para una discusión más detallada al respecto). Por ejemplo, según el DOM, las oscilaciones lentas son generadas por las oscilaciones glucolíticas que producen cambios en la producción de ATP y por lo tanto en la actividad de los canales  $K_{ATP}$ . Por otro lado, las oscilaciones rápidas son generadas completamente por el componente eléctrico del modelo. Finalmente, las oscilaciones compuestas se producen cuando las oscilaciones en la glucólisis y en el componente eléctrico interaccionan. Simulaciones de estas oscilaciones generados con el DOM se muestran en la Fig. 3.10B-D.



**Figura 3.10:** Modelo del oscilador dual (DOM). **A.** Diferentes regímenes de interacción entre la glucólisis, producción de ATP y actividad de los canales iónicos producen los diferentes comportamientos eléctricos en la célula  $\beta$  de roedor. El ATP resultante del metabolismo de la glucosa regula la actividad de los canales  $K_{ATP}$  y por lo tanto el potencial de membrana, promoviendo la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje (VDCCs). La glucólisis, la producción de ATP y la actividad de los canales iónicos son regulados por los cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  del medio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) que es determinada por los VDCCs y la actividad de las bombas de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática (PMCA) y del retículo endoplásmico (SERCA). **B.** La actividad en ráfagas lentas es producida completamente por la glucólisis oscilatoria. **C.** Ráfagas rápidas son producidas por el componente eléctrico del modelo compuesto por los VDCCs, los canales de  $K^+$  sensibles al ATP y los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje y del  $Ca^{2+}$ . **D.** La actividad eléctrica compuesta es producida por la oscilación simultánea de la glucólisis y el componente eléctrico del modelo. **B-D.** Arriba: Potencial de membrana ( $V_m$ , curva negra) y el estado de la glucólisis (representado por la F6P, curva naranja). Abajo:  $[Ca^{2+}]_i$  (curva amarilla) y concentración de ATP (curva verde).

### 3.3.1. Modelos de la actividad eléctrica en células $\beta$ humanas

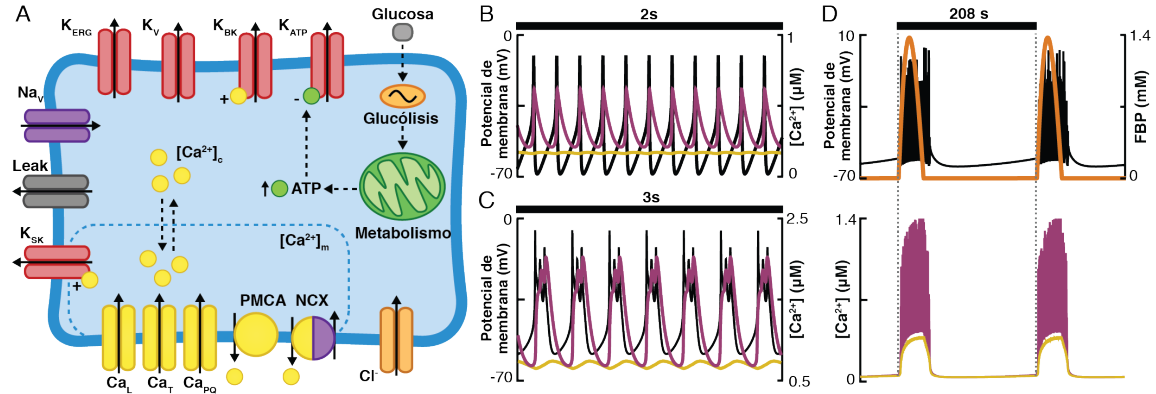
Todos los modelos descritos hasta ahora han sido construídos con base en datos experimentales obtenidos de células  $\beta$  de roedor, ya que se asumían como un buen modelo de la célula  $\beta$  humana. Sin embargo, como se describió en la sección 3.2.5, existen muchas diferencias importantes entre especies a diferentes niveles. Es por esto que modelos matemáticos de las células  $\beta$  de humano han surgido recientemente[49, 53, 54]. Pedersen construyó en 2010 el primer modelo basado completamente en datos electrofisiológicos de células  $\beta$  humanas[53] que posteriormente fue actualizado por Riz y Pedersen [54, 64] para incluir prácticamente todos los canales iónicos identificados hasta ahora en la célula  $\beta$  de humano, así como para considerar la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y el metabolismo de una manera reducida (Fig. 3.11).

Los modelos de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana hasta ahora propuestos[49, 53, 54] reproducen adecuadamente el disparo de potenciales de acción, que es el patrón de actividad eléctrica más observado. Son además capaces de generar ráfagas de potenciales rápidas, aunque sólo el modelo de Riz y Pedersen[54] y el modelo extendido de Fridlyand[49, 132] son capaces de producir ráfagas de potenciales de acción con un período de minutos (Fig. 3.11).

Es evidente que los modelos de las células  $\beta$  de humano se encuentran en una etapa temprana en comparación con los modelos matemáticos de las células de roedor. Sin embargo, dado que la disfunción de la célula  $\beta$  está relacionada en la patogénesis de la DT2, es de esperarse que los modelos de la célula humana evolucionen rápidamente conforme surja más evidencia experimental. También se espera que el progreso en el campo de los modelos matemáticos de células  $\beta$  contribuya al diseño de nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades relacionadas al sistema de regulación de la glucosa.

### 3.3.2. Limitaciones de los modelos matemáticos

Por muchas razones, los modelos matemáticos se ven limitados por simplificaciones inevitables y suposiciones a diferentes niveles. Por ejemplo, cuando surgió el modelo mínimo de Chay y Keizer[157] no se contaba con información detallada acerca de los mecanismos celulares involucrados en la actividad eléctrica de la célula  $\beta$ , lo que se vio reflejado en la simplicidad del modelo. Se puede decir lo mismo de los modelos recientes basados en datos de células  $\beta$  humanas, ya que el número de estudios en células  $\beta$  humanas es muy limitado si lo comparamos con el número de estudios realizados en células de roedor, lo que podría deberse a la limitada disponibilidad de tejido humano. A pesar de esto, estos modelos han servido como punto de partida para el desarrollo de modelos más completos. Ejemplo de esto es la evo-



**Figura 3.11:** Modelo de Riz y Pedersen de la célula  $\beta$  humana[54]. **A.** Canales incluidos en el modelo de la célula  $\beta$  humana. La dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  se modela de manera simple usando un enfoque compartamental (ver Sección 3.3.2). **B-D.** Simulaciones del potencial de membrana ( $V_m$ , curva negra),  $Ca^{2+}$  submembranal (curva rosa),  $[Ca^{2+}]_i$  (curva amarilla) y glucólisis (representada por la fructosa-1,6-bifosfatasa, FBP, curva naranja). **B.** Disparo de potenciales de acción. **C.** Actividad eléctrica en ráfagas rápidas y **D.** Actividad eléctrica en ráfagas lentas. Adaptada de [21]

lución de los modelos propuestos por los diferentes grupos (e.g. Chay[157, 173, 181], Fridlyand et al.[51, 176, 177] y Bertram et al.[50, 123, 171]), que han sido ampliados progresivamente conforme ha ido surgiendo más evidencia experimental.

Una de las limitaciones más importantes de los modelos matemáticos de la célula  $\beta$  propuestos hasta ahora es que la dinámica del  $Ca^{2+}$  intracelular ha sido modelada desde una perspectiva compartamental, en la que, si bien se toman en cuenta los flujos a través de la membrana celular, así como la captura y liberación de  $Ca^{2+}$  por los depósitos intracelulares, se asume que la concentración de  $Ca^{2+}$  de cada compartimiento cambia simultánea y homogéneamente. Esto es, no se toma en cuenta la distribución espaciotemporal del  $Ca^{2+}$  en el medio intracelular.

Es importante mencionar que la mayoría de los modelos de la célula  $\beta$  han sido construídos para reproducir observaciones experimentales específicas a nivel celular, con la finalidad de proponer hipótesis factibles que expliquen el origen del fenómeno de interés. A este tipo de modelos se les conoce como “modelos de célula completa” [182] y son construídos combinando modelos individuales de cada proceso celular considerado (e.g. canales iónicos, manejo de  $Ca^{2+}$ , metabolismo), por lo que simplificaciones o suposiciones pueden ser hechas en cada uno de estos modelos individuales dependiendo de los objetivos del modelo. Estas simplificaciones o suposiciones son entendibles dada la complejidad del sistema, siempre y cuando las implicaciones de



las simulaciones resultantes, ya sean hipótesis o predicciones, sean acotadas correspondientemente.

### 3.4. Modelos de la difusión amortiguada de $\text{Ca}^{2+}$

Los modelos computacionales han sido ampliamente usados para simular la distribución espaciotemporal del  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio intracelular en diferentes tipos de células[183-188]. En estos modelos, tanto amortiguadores endógenos como exógenos han sido considerados ya que juegan un papel importante para la distribución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Diferentes métodos han sido empleados en estos estudios para resolver el problema de reacción-difusión resultante, estando entre estos los métodos de diferencias finitas [183-185, 188], el método de Monte Carlo[186] y el método de los elementos finitos[187], que ha comenzado a usarse en este tipo de escenarios. Debido a las características y limitaciones de cada método, diferentes simplificaciones han sido consideradas. Por ejemplo, los modelos basados en esquemas de diferencias finitas[183, 184, 188] asumen que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran uniformemente distribuidos en la membrana celular, despreciando aspectos geométricos importantes como la distribución no homogénea de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , los componentes tangenciales de la difusión y la curvatura de la célula. Por otro lado, el modelo de Gil et al.[186], basado en el método de Monte Carlo, es capaz de considerar tanto la distribución y número de canales en una geometría tridimensional simplificada. Por su parte, el método del elemento finito tiene la ventaja de que permite el manejo de geometrías complejas, lo que hace posible considerar explícitamente el número de canales, su distribución en la membrana celular, y otros aspectos difíciles de considerar mediante otros métodos computacionales.



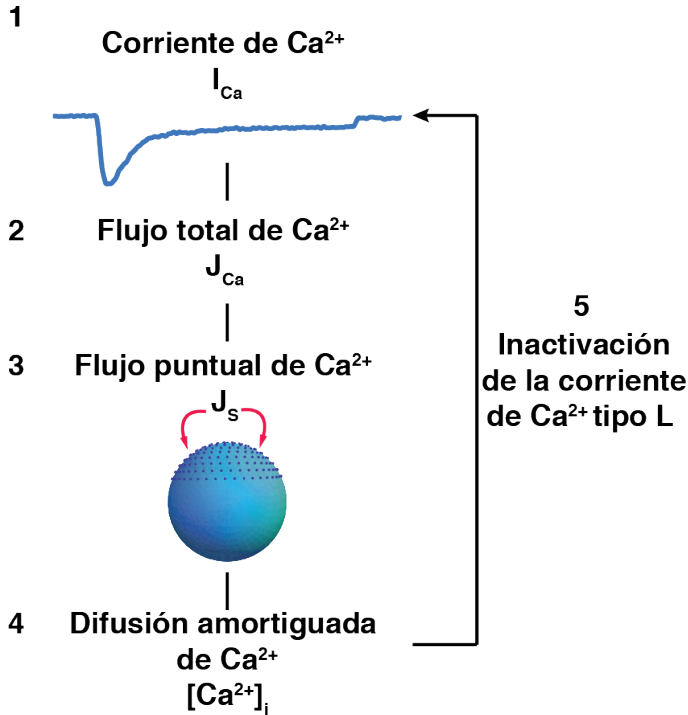
# Capítulo 4

## Metodología

De acuerdo con los objetivos planteados en la Sección 1.3, se busca construir un modelo matemático de la célula  $\beta$  que contemple no solo los componentes que participan en la producción de la actividad eléctrica, sino que nos permita considerar procesos importantes que han sido hasta ahora ignorados, como la distribución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, tomando en cuenta la difusión y amortiguación del  $\text{Ca}^{2+}$ , así como la distribución de los mecanismos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  responsables del flujo a través de la membrana celular. Esto implica la caracterización de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de registros experimentales, la construcción de la representación matemática de cada componente del modelo, el diseño e implementación del modelo de difusión amortiguada en una geometría tridimensional, la construcción y análisis del modelo de la actividad eléctrica, y el acoplamiento entre el componente eléctrico y espacial del modelo. En esta sección se describe detalladamente la metodología seguida en cada uno de estos componentes, que se basa en la metodología usada en los **Artículos 1 y 4 - 6** derivados de este trabajo.

### 4.1. Modelo conceptual

Se construirá un modelo que nos permita evaluar el efecto tanto de la localización de los canales iónicos de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana celular como de los amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  exógenos y endógenos en la distribución espaciotemporal del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante experimentos de fijación de voltaje y en condiciones fisiológicas. Para esto se desarrollaron modelos de las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula  $\beta$  humana (tipo L, T y P/Q) con base en registros electrofisiológicos de estas corrientes. Simultáneamente se implementó un modelo de la difusión amortiguada del  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula tridimensional con geometría esférica para estimar la concentración



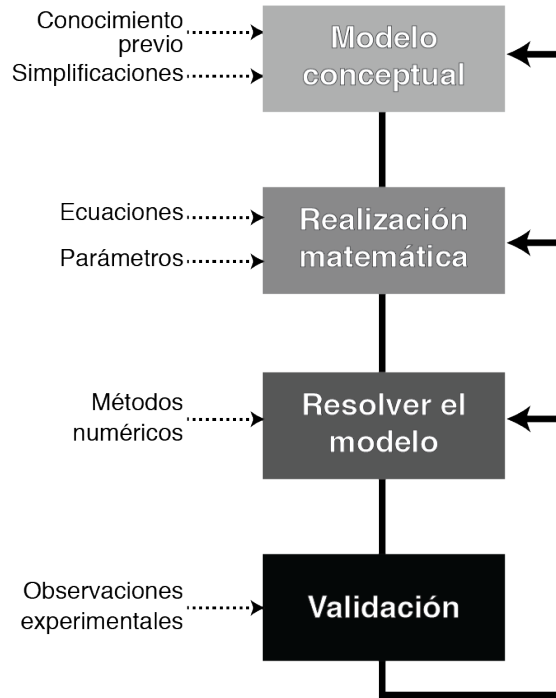
**Figura 4.1:** Modelo conceptual. **A.** Partiendo de las corrientes macroscópicas simuladas se calcula el flujo total de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $J_{\text{Ca}}$ ), mismo que es distribuido a través de  $n_s$  fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$  (245 o 490, ver Sección 4.6.2), dando lugar al flujo puntual  $J_s$ . Del modelo de difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  se obtiene la concentración en el microdominio ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}}$ ), medido a 30 nm de las fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ , que es usado para regular la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y de los mecanismos de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$ . Adaptada de [189].

de  $\text{Ca}^{2+}$  a diferentes distancias de las fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ . El flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  generado por las corrientes simuladas sirve como señal de entrada al modelo, al mismo tiempo que los mecanismos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  se encargan de extraer  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula. Ya que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L son inactivados por el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$ , la concentración en la vecindad inmediata de los canales simulados, estimada por medio del modelo de difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$ , fue utilizada para acoplar la actividad de las corrientes a la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Un diagrama esquemático de este modelo conceptual se muestra en la Fig. 4.1.

## 4.2. Metodología general

Un modelo como el que se plantea en la Sección 4.1 requiere de la construcción de modelos individuales para representar a cada uno de los componentes considerados. Una vez contando con los modelos de todos los componentes, se acoplarán para construir el modelo final.

En todos los casos se siguió la metodología propuesta por Cobelli y Carson [190, 191], esquematizada en la Fig. 4.2, según la cual el proceso de modelado consiste en



**Figura 4.2:** Diagrama de la metodología general del modelado.

tres fases: formulación de un modelo conceptual, realización matemática del modelo y resolución del modelo matemático. Además de las tres fases mencionadas, el proceso de modelado requiere de la validación adecuada para poder dar paso a la fase de simulación, en la que finalmente se podrán sacar conclusiones e incluso predicciones acerca del sistema.

La **formulación del modelo conceptual** es la primera fase de todo modelo matemático y se basa en el conocimiento previo del sistema y la información disponible acerca de este, que determinarán el nivel de simplificación que tendrá el modelo, siempre pensando en función de los objetivos planteados. Una vez producido el modelo conceptual se plantean las ecuaciones y se definen los parámetros necesarios para dar una descripción matemática completa del modelo conceptual, a lo que se le denomina **realización matemática** del modelo. Finalmente, **se resuelve el modelo** matemático mediante algún método numérico apropiado, elegido en función del tipo de ecuaciones a resolver.

Una vez resuelto el modelo es necesario evaluar si este es lo suficientemente bueno de acuerdo con los objetivos planteados, a lo que se le conoce como **validación**. Es

importante considerar que todo modelo es una aproximación de la realidad, y como tal, no será posible, en la mayoría de los casos, reproducir todas las características y comportamientos del sistema real. Es por esto que se deben de seleccionar criterios de validación apropiados de acuerdo con los objetivos del estudio, las simplificaciones realizadas y las características y comportamientos de interés. Es necesario realizar diversas pruebas para comprobar que el modelo resultante cumpla con dichos criterios de validación. De no hacerlo, es necesario regresar a las etapas previas para identificar qué modificaciones son requeridas para obtener el comportamiento buscado.

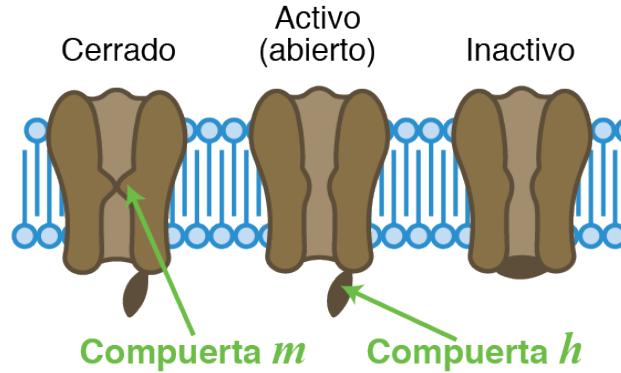
### 4.3. Modelado de las corrientes macroscópicas de $\text{Ca}^{2+}$

Las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron modeladas siguiendo los principios establecidos por Hodgkin y Huxley en su modelo de los potenciales de acción en el axón del calamar gigante[192-195]. Ellos modelaron las corrientes suponiendo la existencia de compuertas independientes que pueden estar abiertas y permitir el paso de algún ion de manera selectiva o bien cerradas, impidiendo el paso de iones a través del canal (Fig. 4.3). En los modelos del tipo Hodgkin-Huxley se asume que existe una compuerta de activación que permite la transición del canal del estado cerrado al estado abierto. Con la letra  $m$  se denota la fracción de canales en estado abierto de una población específica de canales. Además, en corrientes que presentan inactivación, se incluye una compuerta independiente que permite al canal pasar al estado de inactivación. La letra  $h$  representa entonces la proporción de canales que no se encuentran en estado de inactivación. Es importante mencionar que al modelar las corrientes macroscópicas usando el formalismo de Hodgkin y Huxley se asume que los canales son selectivos a un único ion, y que las corrientes no dependen de la concentración de otro tipo iónico. Los detalles de los planteamientos del modelo de Hodgkin y Huxley, así como los aspectos históricos del mismo se pueden consultar en los artículos originales[192-195] o en otros textos al respecto (e.g. referencias [8] y [196]).

Se analizaron registros electrofisiológicos experimentales de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, T y P/Q para obtener las expresiones del tipo Hodgkin-Huxley y los parámetros que caracterizan a estas corrientes. En general, las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron modeladas como:

$$I_X = g_X m_X h_X (V_m - V_{Ca}) \quad (4.1)$$

en donde  $X$  identifica a la corriente ( $X = \text{L, T o P/Q}$ ),  $g_X$  denota la conductancia



**Figura 4.3:** Modelo conceptual de los canales iónicos. Siguiendo los principios de los modelos del tipo Hodgkin-Huxley se asume la existencia de compuertas independientes que determinan el estado del canal.

máxima correspondiente,  $V_m$  es el potencial de membrana,  $V_{Ca}$  es el potencial de equilibrio del  $\text{Ca}^{2+}$ , y  $m_X$  y  $h_X$  son las variables de activación e inactivación dadas por las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dm_X}{dt} = \frac{m_{X,\infty} - m_X}{\tau_{mX}} \quad (4.2a)$$

$$\frac{dh_X}{dt} = \frac{h_{X,\infty} - h_X}{\tau_{hX}} \quad (4.2b)$$

En estas ecuaciones  $m_{x,\infty}$  y  $h_{x,\infty}$  son las funciones de activación e inactivación en estado estacionario, y  $\tau_{mX}$  y  $\tau_{hX}$  son las constantes de tiempo de activación e inactivación respectivamente. Los parámetros que caracterizan a las funciones de activación e inactivación estacionarias, así como las funciones que describen las constantes de tiempo de activación e inactivación fueron obtenidas directamente de los datos experimentales y se describen en el Capítulo 5. Para las corrientes iónicas dependientes únicamente del voltaje, las funciones  $m_{x,\infty}$  y  $h_{x,\infty}$  están dadas por funciones sigmoides de Boltzmann (ver Sección 4.4.2 y Capítulo 5):

$$m_{X,\infty}(V_m) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{mX}}{k_{mX}}\right)} \quad (4.3a)$$

$$h_{X,\infty}(V_m) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{hX}}{k_{hX}}\right)} \quad (4.3b)$$

en donde  $V_{mX}$  ( $V_{hX}$ ) es el voltaje al que la mitad de los canales se encuentran activos (no inactivos) y  $k_{mX}$  ( $k_{hX}$ ) es el parámetro de la pendiente de la función sigmoide de activación (inactivación). Los ajustes de esta función a los datos experimentales se presentan en el Capítulo 5.

Ya que no se realizaron mediciones simultáneas del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante los experimentos de fijación de voltaje, las funciones dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  (e.g. para la corriente tipo L) fueron estimadas al imponer un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  producido por la corriente total experimental promedio al modelo de difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  (ver Sección 5.3).

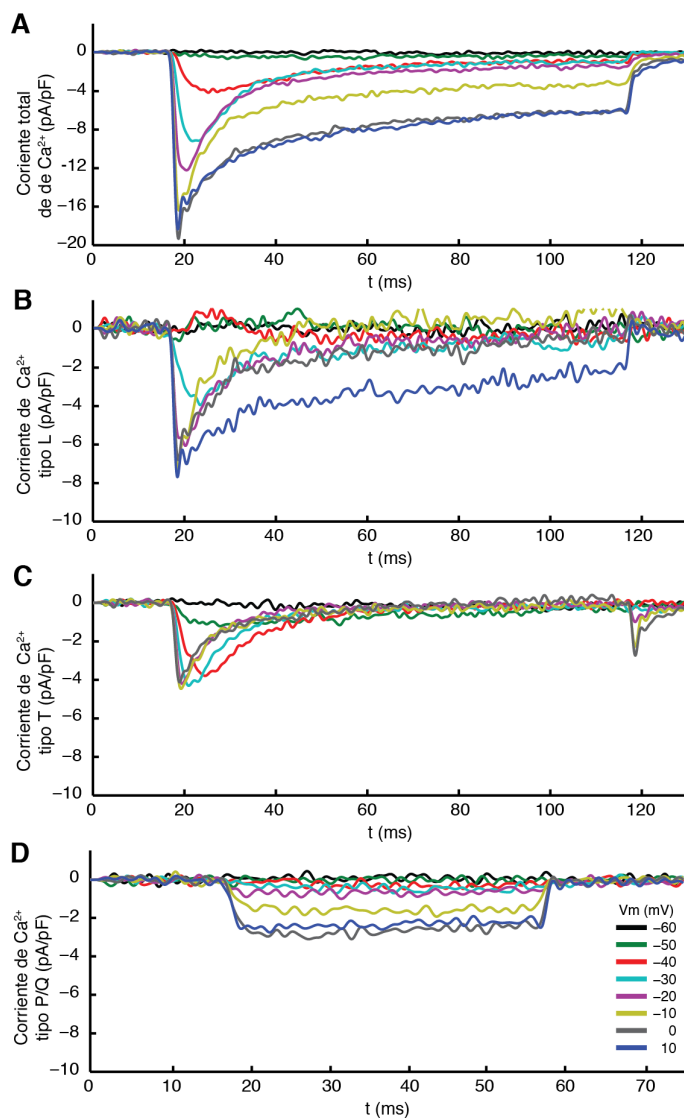
## 4.4. Análisis de los registros experimentales de las corrientes macroscópicas de $\text{Ca}^{2+}$

### 4.4.1. Registros electrofisiológicos de las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$

Se analizó un conjunto de registros electrofisiológicos de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, T y P/Q de células  $\beta$  de humano proporcionado por el Dr. Matthias Braun (Alberta Diabetes Institute, Departamento de Fisiología, Universidad de Alberta, Canada). Un análisis previo de estas corrientes fue publicado por Braun et al. [20]. Los datos experimentales analizados en este trabajo consistieron en 13 registros de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  y de la corriente tipo L, 8 registros de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T y 3 registros de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q, obtenidos de islotes humanos de donadores vivos no diabéticos en el *Diabetes Research and Wellness Foundation Human Islet Isolation Facility*. Ejemplos típicos de cada una de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  experimentales se muestran en la Fig. 4.4. Las magnitudes de las corrientes se muestran normalizadas con respecto a la capacitancia de las células (ver Sección 2.5.1).

Como se describe en su artículo, Braun et al.[20] usaron la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana en la configuración de célula completa para obtener los registros de las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (ver Sección 2.6). Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron aisladas aplicando secuencialmente bloqueadores específicos para cada una de ellas mediante la sustracción de la corriente resultante de la corriente control correspondiente en cada caso. Por ejemplo, para aislar la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, primero se hizo un registro de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$ ; posteriormente se hizo un nuevo registro después de agregar  $10 \mu\text{mol/l}$  de isradipina, un bloqueador específico de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Finalmente se restó este último del registro de la corriente total control para obtener la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L





**Figura 4.4:** Corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  de células  $\beta$  humanas (experimentales) en respuesta a un pulso despolarizante a 10 mV desde un potencial de reposo de -70 mV. **A.** Corriente total. **B.** Corriente tipo L. **C.** Corriente tipo T. **D.** Corriente tipo P/Q. Para todos los casos, con excepción de la corriente tipo P/Q los pulsos tuvieron una duración de 100 ms. En el caso de la corriente P/Q los pulsos de voltaje tuvieron una duración de 50 ms. Notar la diferencia en las escalas entre la corriente total y las corrientes aisladas.

aislada. Procedimientos similares se siguieron para aislar las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T y P/Q, variando únicamente el bloqueador utilizado ( $1 \mu\text{mol/l}$  de T NNC 550396 para la corriente tipo T y  $0.2 \mu\text{mol/l}$   $\omega$ -agatoxina IVA para la corriente tipo P/Q).

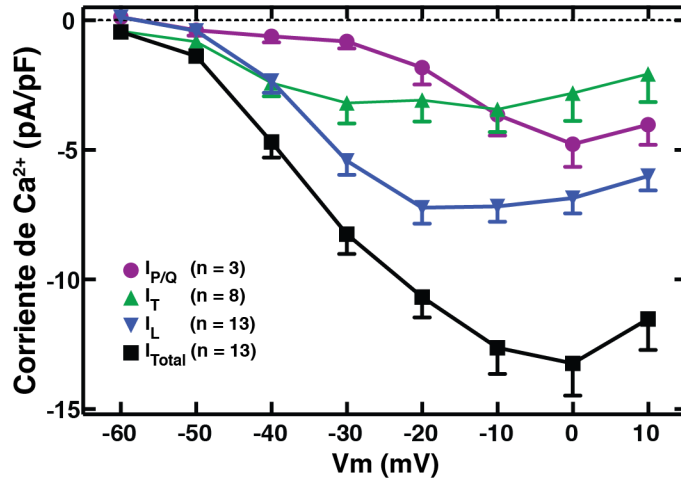
La composición de las soluciones usadas para el registro de las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  fue reportada previamente por Braun et al.[20] y se reproducen a continuación. La solución extracelular empleada fue compuesta de (mmol/l) 138 NaCl, 5.6 KCl, 2.6 CaCl, 1.2  $\text{MgCl}_2$ , 5 HEPES, 10 tetraetilamonio (TEA),  $0.1 \mu\text{g/ml}$  tetrodotoxina (TTX) y 5 glucosa con un pH de 7.4 ajustado con NaOH. Por otro lado, la solución intracelular incluyó (mmol/l) 120 CsCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 10 EGTA, 1  $\text{CaCl}_2$ , 10 HEPES y 3 MgATP (pH 7.2 ajustado con NaOH).

#### 4.4.2. Caracterización de las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ en la célula $\beta$ humana

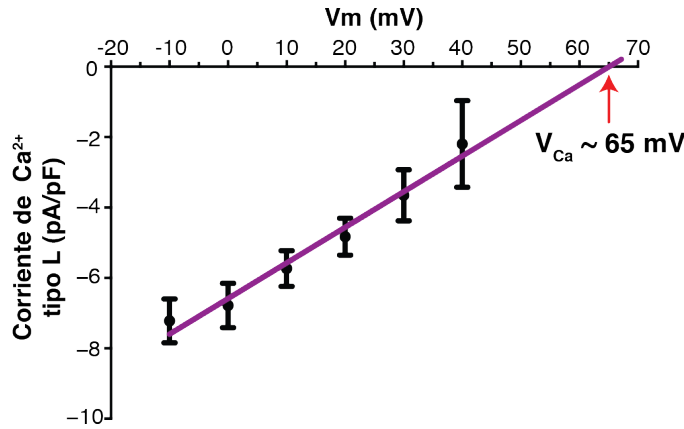
Las relación corriente voltaje, también conocida como curva I-V, es la base de todo análisis de los registros electrofisiológicos de corrientes macroscópicas. Esta curva brinda información de suma importancia, como el tipo iónico que genera la corriente, la magnitud y el rango de voltaje al que la población de canales se encuentra activa. En estudios de fijación de voltaje comúnmente se obtiene la curva I-V graficando la densidad de corriente al pico como función del potencial de prueba, es decir, como función de los valores de voltaje de los pulsos de prueba aplicados durante los experimentos.

Para las 3 corrientes analizadas (corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, T y P/Q) se obtuvieron las curvas I-V que muestran la densidad de corriente al pico (en pA/pF) para pulsos de prueba despolarizantes ( $V_p$ ) de -60 a 10 mV (el rango fisiológico de los potenciales de acción en la célula  $\beta$  humana[10, 20, 49, 53]) en intervalos de 10 mV, partiendo de un potencial de reposo de -70 mV. Las curvas I-V promedio de las corrientes L, T y P/Q aisladas, así como de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  se muestran en la Fig. 4.5.

Se puede observar en la Fig. 4.5 que la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T fue detectable a partir del pulso a -60 mV, mientras que las corrientes tipo P/Q y L se detectaron a partir del pulso a -50 mV. La densidad de corriente máxima para la corriente total fue de  $-13.2 \pm 1.2 \text{ pA/pF}$  y se obtuvo para el pulso a 0 mV. Por su parte, la densidad de corriente máxima para la corriente tipo L fue de  $-7.2 \pm 0.6 \text{ pA/pF}$  obtenida durante el pulso de voltaje a -10 mV, mientras que para el caso de la corriente tipo P/Q se observó una densidad de corriente máxima de  $-4.78 \pm 0.87 \text{ pA/pF}$  para el pulso a 0 mV. Finalmente, la corriente tipo T mostró una densidad de corriente máxima de  $-3.44 \pm 0.88 \text{ pA/pF}$  para el pulso despolarizante a -10 mV, aunque un valor muy cercano ( $-3.2 \pm 0.79 \text{ pA/pF}$ ) se observó para el pulso a -30 mV.



**Figura 4.5:** Curvas corriente voltaje (I-V) experimentales de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  total (negro), tipo L (azul), tipo T (verde) y tipo P/Q (morado). Se muestran las corrientes al pico en todos los casos. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM.



**Figura 4.6:** Estimación por extrapolación del potencial de inversión del  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de la curva I-V experimental de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

El potencial de inversión para el  $\text{Ca}^{2+}$  (ver Sección 2.2) se estimó también a partir del análisis de los datos experimentales. Para esto, se partió de la curva I-V de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, tomando los puntos en el rango de -10 a 40 mV, en donde se puede asumir que el comportamiento de la curva I-V es lineal (ver Fig. 4.6). Mediante la extrapolación del ajuste lineal realizado a estos puntos, se estimó un potencial de inversión ( $V_{Ca}$ ) de 65 mV, que es consistente con lo estimado por otros trabajos[53, 54].

Una vez conocido el potencial de inversión es posible estimar la conductancia para cada valor de voltaje partiendo de las curvas I-V como:

$$g_X(V_p) = \frac{I_X(V_p)}{V_p - V_{Ca}}, \quad (4.4)$$

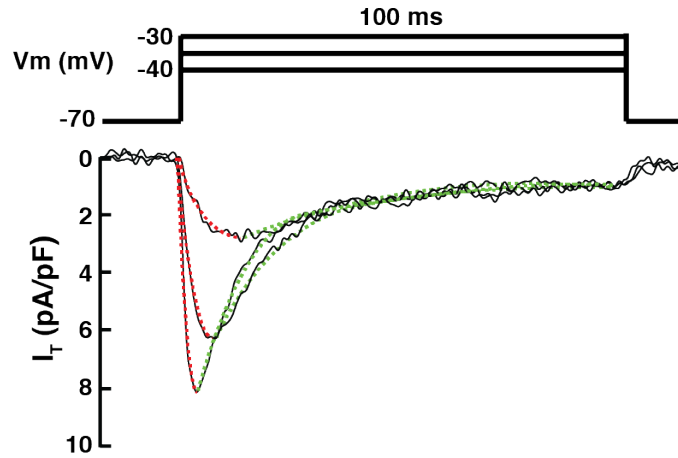
en donde  $I_X(V_m)$  representa la corriente al pico (en donde  $X = \text{L, T o P/Q}$ ) obtenida para para cada voltaje de prueba ( $V_p$ ). Partiendo de esto se estimaron las conductancias máximas para las tres corrientes, siendo los valores obtenidos  $g_{L,\text{max}} = 0.1$  nS/pF (para el pulso a -10 mV),  $g_{T,\text{max}} = 0.046$  nS/pF (para el pulso a -10 mV) y  $g_{PQ,\text{max}} = 0.073$  nS/pF (para el pulso a 0 mV).

Las funciones de activación en estado estacionario ( $m_{X,\infty}$ ) dependientes del voltaje se obtienen al normalizar  $g_X(V_p)$  con respecto a las conductancias máximas estimadas ( $g_{X,\text{max}}$ ); esto es,  $g_X(V_p)/g_{X,\text{max}}$ . Finalmente se hace el ajuste de una función de Boltzmann a los puntos resultantes (Eq. 4.3a)[8].

Como se ve en la Fig. 4.4, las corrientes macroscópicas producidas por un pulso despolarizante de magnitud suficiente no alcanzan su valor máximo de manera instantánea, sino que aumenta en magnitud conforme la proporción de canales abiertos incrementa hasta llegar a un valor máximo. A este proceso se le conoce como proceso de activación. Asimismo, algunas corrientes presentan un decaimiento posterior atribuible al proceso de inactivación de los canales iónicos. Ambos procesos (activación e inactivación) se ilustran en la Fig. 4.7. Es importante para una adecuada caracterización de las corrientes macroscópicas determinar la cinética de ambos procesos. En este trabajo esto se llevó a cabo ajustando funciones exponenciales a los segmentos tanto de activación como de inactivación (ver Capítulo 5) con la finalidad de obtener las constantes de tiempo ( $\tau_{mX}$  y  $\tau_{hX}$  en las ecuaciones 4.2) que describen el curso temporal de estos procesos en función del potencial de membrana y de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (en el caso de la corriente tipo L). Un ejemplo ilustrativo de este procedimiento se muestra en la Fig. 4.7.

## 4.5. Modelado de la difusión amortiguada del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

Dependiendo de las condiciones simuladas (experimentales o fisiológicas) se construyeron diferentes modelos con diferentes composiciones del medio intracelular en términos de los amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  considerados. En primer lugar se realizaron simulaciones de experimentos de fijación de voltaje (Capítulo 5) en las que se buscó reproducir las condiciones experimentales en las que Braun et al. [20] llevaron a cabo el registro de las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula  $\beta$  humana. Ya que en sus experimentos utilizaron una solución intracelular (de la pipeta) con 10 mM de EGTA y 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , las simulaciones de los experimentos de fijación de voltaje se hicieron con un único amortiguador exógeno (EGTA), considerándose por lo tanto tres especies en el modelo de difusión amortiguada:  $\text{Ca}^{2+}$  libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), EGTA libre



**Figura 4.7:** Análisis de la cinética de activación e inactivación de las corrientes macroscópicas. Se determinan los segmentos de activación e inactivación en los trazos de las corrientes macroscópicas a los que se les ajustan funciones exponenciales para obtener las constantes de tiempo que describen estos procesos en función del voltaje. Los segmentos de activación e inactivación se muestran con las líneas discontinuas rojas y verdes respectivamente.

([EGTA]) y el complejo  $[\text{EGTA}\cdot\text{Ca}^{2+}]$ . Posteriormente se evaluó el efecto de incluir un amortiguador endógeno (END) inmóvil en la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que se agregaron dos especies más al modelo: amortiguador endógeno libre ( $[\text{END}]$ ) y el complejo  $[\text{END}\cdot\text{Ca}^{2+}]$ . Es importante mencionar que en este contexto se utiliza el término “especie” para identificar a las variables dependientes del problema de difusión amortiguada (ver Eqs. 4.5).

Posteriormente se hicieron simulaciones en condiciones fisiológicas (Capítulo 6), en las que únicamente se consideró la presencia de amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  endógenos. Inicialmente se incluyó un único amortiguador endógeno inmóvil, contando con tres especies:  $\text{Ca}^{2+}$  libre ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), amortiguador endógeno inmóvil libre ( $[\text{END}]_f$ ) y el complejo  $[\text{END}]_f\cdot\text{Ca}$ . Con la finalidad de evaluar el efecto de los amortiguadores endógenos móviles en los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas condiciones, se agregaron dos especies más al modelo: un amortiguador endógeno móvil libre ( $[\text{END}]_m$ ) y el complejo  $[\text{END}]_m\cdot\text{Ca}$  [185, 197].

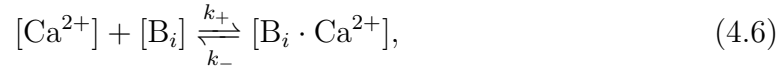
En todos los casos la difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  se simuló utilizando las ecuaciones de difusión estandar:

$$\frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]_i}{\partial t} = D_{\text{Ca}} \nabla^2[\text{Ca}^{2+}]_i - \sum_i R_i \quad (4.5a)$$

$$\frac{\partial[\text{B}_i]}{\partial t} = D_{\text{B}_i} \nabla^2[\text{B}_i] - R_i \quad (4.5b)$$

$$\frac{\partial[\text{B}_i \cdot \text{Ca}^{2+}]}{\partial t} = D_{\text{B}_i} \nabla^2[\text{B}_i \cdot \text{Ca}^{2+}] - R_i \quad (4.5c)$$

en donde  $D_X$  es el coeficiente de difusión para cada especie,  $\nabla$  es el operador de derivadas parciales en tres dimensiones,  $\text{B}_i$  representa el tipo de amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{END}_f$ ,  $\text{END}_m$  o EGTA) y  $R_i$  es el término de reacción dado por el esquema de una reacción de primer orden:



que siguiendo la ley de acción de masas puede ser escrito como:

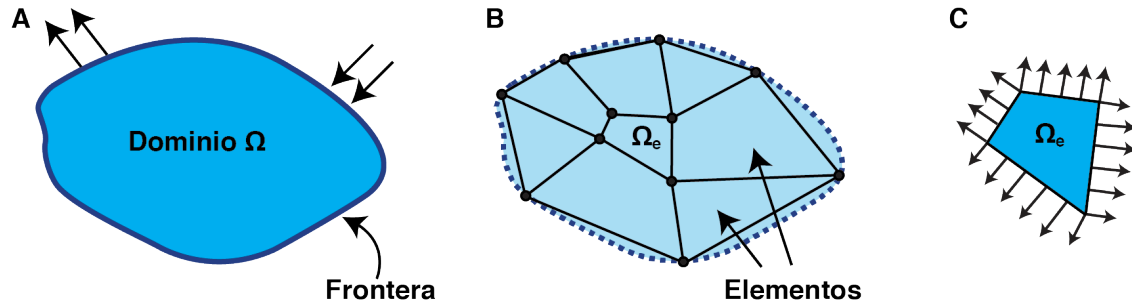
$$R_i = k_+[\text{Ca}^{2+}]_i \cdot [\text{B}_i] - k_-[\text{B}_i \cdot \text{Ca}^{2+}] \quad (4.7)$$

en donde  $k_+$  y  $k_-$  son las constantes de asociación y disociación respectivamente.

## 4.6. Resolución del modelo por medio del método de los elementos finitos (FEM)

El método de los elementos finitos (FEM) es un método numérico que, a diferencia de los métodos basados en diferencias finitas, puede ser usado en problemas que involucran geometrías y condiciones de frontera complejas. En síntesis, en el FEM, el dominio geométrico de interés ( $\Omega$  en la Fig. 4.8A) se representa como una colección de subdominios simples geoméricamente, llamados *elementos finitos* ( $\Omega_e$  en la Fig. 4.8). Lo que se busca con esto es representar la ecuación gobernante (en este caso particular la ecuación de difusión amortiguada) en términos de un sistema de ecuaciones algebraicas mediante la transformación de las ecuaciones continuas en sus similares discretas (considerando las condiciones iniciales y de frontera) con la finalidad de resolverlas computacionalmente. A este proceso se le conoce como discretización. Finalmente se resuelve el sistema de ecuaciones resultante considerando las relaciones de conectividad entre elementos.

Existen diversas fuentes de error a diferentes niveles en este proceso de aproximación. Por ejemplo, en la fase de discretización del dominio geométrico, existe la



**Figura 4.8:** Diagrama del método de los elementos finitos. **A.** El dominio geométrico del problema ( $\Omega$ ) es dividido en una colección de elementos ( $\Omega_e$ , **B**) con el objetivo de obtener la representación discreta de las ecuaciones gobernantes del problema. La solución del problema se obtiene considerando las relaciones de conectividad entre elementos (**C**)

posibilidad de que los elementos finitos no representen el dominio real de manera exacta (Fig. 4.8B). Otro ejemplo de una posible fuente de error en el proceso de aproximación es la selección de las funciones utilizadas para estimar la solución del problema al nivel de los elementos finitos.

El software utilizado para resolver el problema de difusión amortiguada en este trabajo fue COMSOL Multiphysics 4.4 (COMSOL, AB.), que es un paquete comercial que permite la implementación del método de los elementos finitos para la solución de problemas físicos caracterizados por ecuaciones diferenciales parciales.

#### 4.6.1. Implementación computacional en COMSOL Multiphysics

En general, la implementación de un modelo en COMSOL Multiphysics consiste en tres fases principales: preprocesamiento, procesamiento y postprocesamiento:

- Preprocesamiento:** consiste en especificar los elementos de entrada necesarios para resolver el problema. Entre estos se encuentran la geometría (el dominio), las ecuaciones gobernantes, las condiciones iniciales y de frontera, ecuaciones complementarias, parámetros y propiedades. Además, el preprocesamiento consiste en construir la malla (dividir el dominio geométrico en elementos), así como determinar el paso de tiempo, el método de resolución del sistema de ecuaciones algebraicas derivadas del FEM y las tolerancias que nos permitirán controlar el error en el cálculo de la solución.

- **Procesamiento:** es llevado a cabo automáticamente por el software, considerando la información definida durante el preprocesamiento. En esta fase se lleva a cabo la conversión de las ecuaciones gobernantes (Eqs. 4.5) en un sistema de ecuaciones algebraicas y se obtiene la solución del modelo.
- **Postprocesamiento:** Esta fase involucra la visualización de la solución del modelo y la obtención de resultados de interés.

### 4.6.2. Geometría

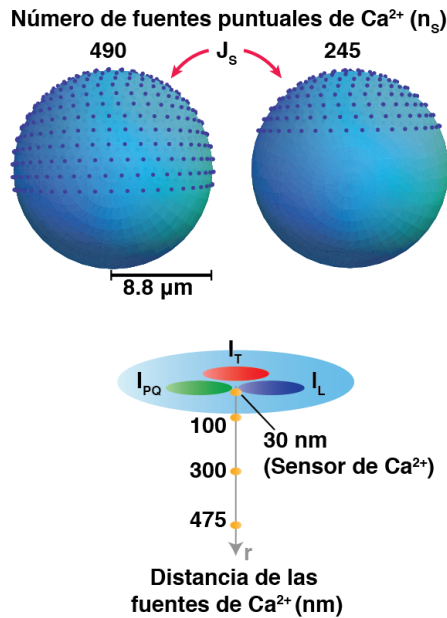
Se asumió que la célula  $\beta$  aislada tiene una forma esférica, lo que es una aproximación razonable cuando esta se estudia de manera aislada (Braun M. comunicación personal, 2013). Se prefirió un enfoque tridimensional en lugar de las simplificaciones bidimensionales o unidimensionales con la finalidad de considerar los aspectos morfológicos de la célula  $\beta$  en el modelo, como la distribución y separación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana celular. Además, a diferencia de las configuraciones geométricas simplificadas (1D y 2D), el hacer uso de una geometría tridimensional hace posible simular los componentes de la difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en la dirección radial como tangencial, lo que es a menudo despreciado en otros modelos de las células  $\beta$ .

Ya que la capacitancia de la membrana es directamente proporcional a la superficie de la membrana celular, con una equivalencia de  $\sim 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $0.01 \text{ pF}/\mu\text{m}^2$ )[15], se obtuvo el radio promedio de la célula  $\beta$  humana partiendo de la capacitancia promedio de la célula  $\beta$  humana reportada por Braun et al.[20] de 9.9 pF, lo que resulta en una superficie estimada de  $990 \mu\text{m}^2$ , correspondiente a una esfera con un radio de  $8.8 \mu\text{m}$  (ver Sección 2.5.1).

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron distribuidos en forma de fuentes puntuales en la membrana celular (Fig. 4.9). Hasta donde se sabe, no se han realizado estudios acerca de la localización de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y los sitios de exocitosis en células  $\beta$  humanas. Por esta razón, las fuentes puntuales se distribuyeron de acuerdo con la información disponible de células  $\beta$  de roedores.

Barg et al.[151] estimaron que la célula  $\beta$  de ratón tiene menos de 500 canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, y que la separación entre ellos es de  $\sim 1.2 \mu\text{m}$ . Para ello usaron el análisis de fluctuaciones no estacionarias, propuesto por Benke et al.[198], que les permitió extraer información de las corrientes unitarias partiendo de las corrientes macroscópicas. Además de esto, mediciones simultáneas del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular usando la fluorescencia de diversos marcadores de  $\text{Ca}^{2+}$  (e.g. Fura-2[137, 199], Fluo-3[200], Indo-1 AM[201]) y de la exocitosis (usando por ejemplo quinacrina[137] o  $\text{Zn}^{2+}$ [201]) indican que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  no se distribuyen uniformemente sobre la totalidad





**Figura 4.9:** Geometría del modelo de la difusión amortiguada del  $\text{Ca}^{2+}$ . **Arriba.** Se simularon dos escenarios con diferentes distribuciones de fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ , variando únicamente en el número de fuentes que participan en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana (245 y 490 fuentes). **Abajo.** Diagrama de una fuente puntual de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se asumió que cada fuente incluye los tres tipos de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (L, T y P/Q). La concentración de las diferentes especies consideradas en el modelo ( $\text{Ca}^{2+}$ , amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , etc.) fue medida a diferentes distancias de las fuentes puntuales.

de la membrana celular, sino que se concentran en la región en la que se encuentran los sitios de secreción[137, 199-202]. De hecho, se estima que la secreción de insulina ocurre solo en una porción que comprende entre 20 y 50 % de la superficie de la célula[201, 203].

Con el objetivo de estimar el rango de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanzadas en el espacio submembranal, se simularon dos casos, que difieren únicamente en el número de fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$  consideradas (ver Fig. 4.9). En el primer caso, se distribuyeron 490 fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  en un polo de la célula, abarcando  $\sim 57$  % de la superficie celular ( $\sim 555 \mu\text{m}^2$ ). En el segundo caso se distribuyeron 245 fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$  en  $\sim 30$  % de la superficie celular ( $\sim 285 \mu\text{m}^2$ ). En ambos casos, las fuentes puntuales se distribuyeron uniformemente sobre un polo de la célula esférica siguiendo el algoritmo propuesto por Saff y Kuijlaars[204], asumiendo una separación aproximada entre las fuentes de  $\sim 1.2 \mu\text{m}$ , siguiendo los reportes experimentales. La densidad de fuentes resultante es menor que 1 fuente/ $\mu\text{m}^2$ , como ha sido estimado en células  $\beta$  de roedor[151, 205]. En este modelo cada fuente puntual representa un grupo de canales compuesto por los tres diferentes canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la célula  $\beta$  humana (Fig. 4.9).

Cuando los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se abren en respuesta a un estímulo de voltaje se forman microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  alrededor de la boca del canal, en donde el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  regula tanto el proceso de inactivación de los

canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, como la actividad de los mecanismos de expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tadross et al.[206] estimaron, partiendo de estudios de microscopía electrónica de la estructura tridimensional de los canales tipo L de músculo esquelético[207], que el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  (calmodulina) de los canales tipo L se encuentra a  $\sim 10$  nm de la membrana celular. En este modelo se define la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}}$ ) como la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  estimada por el modelo de difusión a una distancia de 30 nm de las fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, se obtuvo la concentración de todas las especies consideradas ( $\text{Ca}^{2+}$  libre, amortiguadores libres y complejos amortiguadores- $\text{Ca}^{2+}$ ) a 30, 100, 300 y 475 nm de las fuentes puntuales con la finalidad de evaluar su comportamiento a diferentes profundidades (Fig. 4.9).

### 4.6.3. Condiciones iniciales y de frontera

Las concentraciones iniciales de todas las especies fue determinada por la solución estacionaria del sistema de difusión amortiguada (Eqs. 4.5) en ambos casos. Para las simulaciones de los experimentos de fijación de voltaje se partió de las condiciones experimentales en las que las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron registradas por Braun et al. [20]; esto es, una solución intracelular compuesta por 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  y 10 mM EGTA. De manera similar se obtuvieron las concentraciones iniciales empleadas en las simulaciones de las condiciones fisiológicas, con la diferencia de que se incluyeron 310  $\mu\text{M}$  de amortiguador endógeno inmóvil y 100  $\mu\text{M}$  de amortiguador endógeno móvil[185]. Las condiciones iniciales resultantes para todas las especies se muestran en la Tabla 1. Se utilizaron parámetros cinéticos y de difusión estándar como en otros estudios de simulación[185, 186].

El flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de las fuentes puntuales en la membrana celular es producido por las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ), la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (PMCA) y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX). Así, el flujo total debido a estos mecanismos celulares está dado por:

$$J_{\text{Ca}} = \frac{I_{\text{Ca}}}{zF} - J_{\text{PMCA}} - J_{\text{NCX}} + J_{\text{Leak}} \quad (4.8)$$

en donde el primer término del lado derecho de la ecuación describe el flujo debido a las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $z$  es la valencia del  $\text{Ca}^{2+}$  y  $F$  es la constante de Faraday. El segundo y tercer términos representan el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el medio extracelular debido a la actividad de la bomba PMCA y el intercambiador NCX, que fueron simulados por medio de ecuaciones de Hill como comúnmente se hace en los modelos de células  $\beta$ [49, 208, 209]:

$$J_{\text{PMCA}} = J_{\text{PMCA}}^{\text{max}} \frac{1}{1 + \left( \frac{K_{\text{PMCA}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}}} \right)^2} \quad (4.9a)$$

$$J_{\text{NCX}} = J_{\text{NCX}}^{\text{max}} \frac{1}{1 + \left( \frac{K_{\text{NCX}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}}} \right)^2} \quad (4.9b)$$

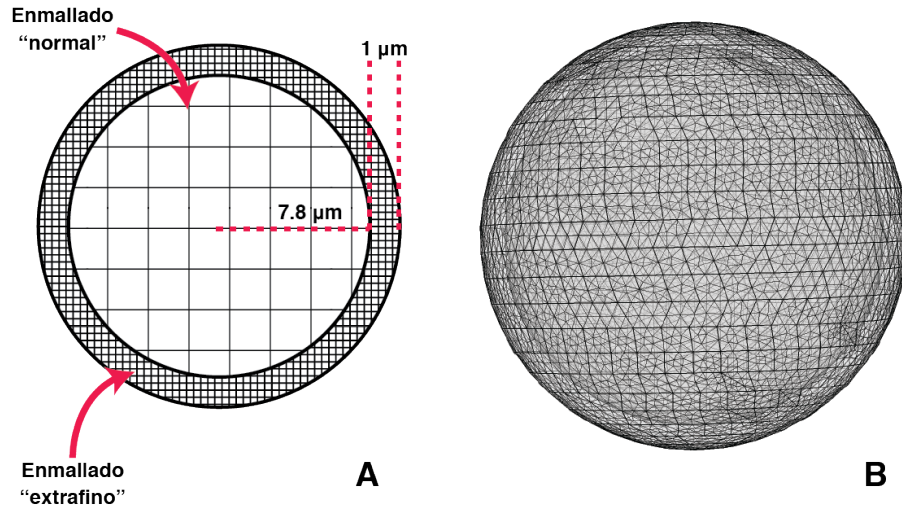
Como en otros estudios de simulación de la difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  [183, 185], se agregó un flujo de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $J_{\text{Leak}}$  en la Eq. 4.8) para asegurar el equilibrio en el estado estacionario basal, es decir, cuando  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}} = [\text{Ca}^{2+}]_0$  (la concentración inicial de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Esto es:

$$J_{\text{Leak}} = -J_{\text{PMCA}} - J_{\text{NCX}} \quad (4.10)$$

El flujo total de  $\text{Ca}^{2+}$  dado por la ecuación 4.8 se distribuyó homogéneamente entre las fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$  consideradas ( $n_S$ ), resultando en un flujo por fuente puntual dado por  $J_S = J_{\text{Ca}}/n_S$  (ver Fig. 4.9). Con excepción de las fuentes puntuales, se impuso una condición de flujo cero en las demás fronteras. Finalmente, se asumió que la concentración total de los amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  se conserva en el medio intracelular.

#### 4.6.4. Enmallado y aspectos computacionales

Se construyó un enmallado para la célula esférica descrita en la Sección 4.6.2 usando elementos tetraedrales para la totalidad de la geometría. Siguiendo los resultados de un estudio de refinamiento del enmallado se construyó un enmallado diferenciado. Esto es, se utilizó un enmallado predefinido en COMSOL como “Extra Fino” para el cascarón esférico exterior de  $1 \mu\text{m}$  de grosor, caracterizado por elementos con tamaños mínimo y máximo de  $0.03$  y  $0.6 \mu\text{m}$  respectivamente. Por otra parte, con la finalidad de reducir los recursos computacionales requeridos para realizar las simulaciones, se utilizó un enmallado predefinido en COMSOL como “Normal” para la esfera interna restante (de  $7.8 \mu\text{m}$  de radio). Los tamaños mínimo y máximo de los elementos en el enmallado “Normal” son  $0.32$  y  $1.77 \mu\text{m}$  respectivamente. El uso de un enmallado con elementos de mayor tamaño en la esfera interior se debe a que los cambios en la concentración de las diferentes especies consideradas únicamente se observaron en el espacio submembranal. Un diagrama del enmallado diferenciado se muestra junto con el enmallado real en la Fig. 4.10.



**Figura 4.10:** **A.** Diagrama del enmallado diferenciado. **B.** Enmallado real generado en COMSOL Multiphysics (ver texto principal).

El modelo fue resuelto utilizando un método iterativo (GMRES) con tolerancias relativa y absoluta de 1E-2 y 1E-3 respectivamente, con un paso de tiempo variable restringido a un máximo de 0.1 ms.

## 4.7. Simulación de experimentos de fijación de voltaje

En el Capítulo 5 se presentan simulaciones de experimentos de fijación de voltaje en la célula  $\beta$  humana en las que se buscó reproducir las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenidas experimentalmente por Braun et al. [20]. Para esto, se aplicaron pulsos de voltaje de 100 ms de duración desde un potencial de reposo de -70 mV hasta voltajes de prueba en el rango de -60 a 10 mV con incrementos de 10 mV. Las corrientes generadas por los pulsos despolarizantes provocarán un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula a través de las fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que causará el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la vecindad de la membrana celular. Este incremento controla la inactivación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y la actividad de los mecanismos de expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Como en otros modelos[183-185], en las simulaciones de los experimentos de fijación de voltaje se incluyó un único mecanismo de expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que significa que  $J_{NCX}^{max} = 0$  M/ms en la ecuación 4.9b. Los parámetros utilizados se muestran en

Parametro	Valor	Ref.	Parametro	Valor	Ref.
$V_{Ca}$	65 mV	Exp	<b>EGTA</b>		
<b><math>I_{PQ}</math></b>			$[EGTA]_{tot}$	10 mM	[20]
$g_{PQ}$	0.07 nS/pF	Exp	$D_{EGTA}$	$200 \mu\text{m}^2/s$	[185, 186]
$V_{mPQ}$	-15 mV	Exp	$K_d$	$0.15 \mu\text{M}$	[185, 186]
$n_{mPQ}$	6.1 mV	Exp	$k_+$	$10 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	[185, 186]
<b><math>I_T</math></b>			$k_-$	1.5 1/s	[185, 186]
$g_T$	0.13 nS/pF	Exp	<b><math>END_f</math></b>		
$V_{mT}$	-40.6 mV	Exp	$[END_f]_{tot}$	0.5 mM	[185, 186]
$n_{mT}$	7.1 mV	Exp	$D_{END_f}$	$0 \mu\text{m}^2/s$	[185, 186]
$v_{hT}$	-65 mV	[20]	$K_d$	$10 \mu\text{M}$	[185, 186]
$n_{hT}$	-8 mV	[20]	$k_+$	$500 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	[185, 186]
<b><math>I_L</math></b>			$k_-$	5000 1/s	[185, 186]
$g_L$	0.13 nS/pF	*	<b>PMCA</b>		
$V_{mL}$	-29.7 mV	Exp	$J_{PMCA}^{max}$	$0.02 \mu\text{M}/\text{ms}$	[54, 209]
$n_{mL}$	7.8 mV	Exp	$K_{PMCA}$	$0.5 \mu\text{M}$	[54, 209]
$K_{hL,245}$	$0.07 \mu\text{M}$	*	<b>Condiciones iniciales</b>		
$K_{hL,490}$	$0.05 \mu\text{M}$	*	$[Ca^{2+}]_0$	16.7 nM	Est
<b><math>Ca^{2+}</math></b>			$[EGTA \cdot Ca]_0$	$999.9 \mu\text{M}$	Est
$[Ca^{2+}]_{Tot}$	1 mM	[20]	$[EGTA]_0$	$\sim 9 \text{ mM}$	Est
$D_{Ca}$	$220 \mu\text{m}^2/s$	[185, 186]			

**Tabla 4.1:** Parámetros usados en las simulaciones de los experimentos de fijación de voltaje. (\* = Ajustado, Est = Estimado, Exp = Experimental).

la Tabla 4.1.

### 4.7.1. Criterios de validación

Los modelos de las corrientes de  $Ca^{2+}$  de la célula  $\beta$  humana durante experimentos de fijación de voltaje se consideraron válidos una vez que fueron capaces de reproducir las siguientes observaciones experimentales:

- Para todas las corrientes (L, T y P/Q), el valor máximo de corriente para cada voltaje de prueba (curvas I-V).
- La cinética de activación dependiente del voltaje (para las corrientes tipo L y T).

- La cinética de inactivación dependiente del voltaje (corriente tipo T) y dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (corriente tipo L).

En este caso, el cumplimiento de estos criterios implicó, en primer lugar, un adecuado tratamiento de los datos experimentales para la obtención de los parámetros correctos. Además, dado que existen parámetros que no han sido medidos experimentalmente, fue necesario estimarlos de tal manera que los trazos de corriente experimental fueran reproducidos por las simulaciones de la mejor manera posible. Tal fue el caso de el parámetro  $K_{hL}$ , que determina la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a la que el 50 % de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L se encuentran en estado de inactivación.

## 4.8. Simulación de la actividad eléctrica en condiciones fisiológicas

Haciendo uso de los modelos de las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenidas de las simulaciones de los experimentos de fijación de voltaje, e incorporando corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  previamente caracterizadas, así como una corriente no específica, se simuló la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana en condiciones fisiológicas, es decir, en presencia de amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  endógenos únicamente (Capítulo 6). Se tomó como base la representación de la membrana celular como un circuito eléctrico equivalente (ver Sección 2.5.2), representada matemáticamente por la ecuación 2.8 que se reproduce a continuación:

$$\frac{dV_m}{dt} = -\frac{I_{\text{ion}}}{C_m} = -\frac{\sum_X I_X}{C_m}. \quad (2.8)$$

Las corrientes incluídas, que darán forma a los cambios en el potencial de membrana se describen a detalle en el Capítulo 6. Salvo en las excepciones que se mencionan a continuación, los parámetros usados en las simulaciones de la actividad eléctrica en condiciones fisiológicas fueron los mismos que en el caso de las simulaciones de los experimentos de fijación de voltaje (Tabla 4.1). Los parámetros adicionales (i.e. de las corrientes iónicas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , así como del amortiguador endógeno móvil) se muestran en la Tabla 4.2.

En estas simulaciones se incorporó al modelo una representación simple del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  como segundo mecanismo de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular. Además, se modificaron ligeramente los parámetros de la bomba PMCA; esto es, el flujo máximo de la bomba ( $J_{PMCA}^{max}$ ) se modificó a  $0.2 \mu\text{M}/\text{ms}$ , y la concentración a la que la bomba alcanza la mitad del flujo máximo ( $K_{PMCA}$ ) se redujo a  $0.1 \mu\text{M}$  [176, 208, 209].

Parametro	Valor	Ref.	Parametro	Valor	Ref.
<b>Potenciales de inversión</b>			<b>I<sub>Kv</sub></b>		
$V_{Na}$	70 mV	[20, 53]	$g_K$	1 nS/pF	[53]
$V_K$	-75 mV	[20, 53]	$V_{mKv}$	0 mV	[20, 53]
<b>END<sub>f</sub></b>			$n_{mKv}$	-10 mV	[20, 53]
$[END_f]_{tot}$	310 $\mu$ M	[185]	$\tau_{mKv,0}$	2 ms	[20, 53]
<b>END<sub>m</sub></b>			<b>I<sub>ERG</sub></b>		
$k_+$	500 $\mu$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	[185, 186]	$g_{ERG}$	0.2 nS/pF	[53, 63]
$k_-$	5000 1/s	[185, 186]	$V_{mERG}$	-30 mV	[53, 63]
$K_d$	10 $\mu$ M	[185, 186]	$V_{hERG}$	-42 mV	[53, 63]
$D_{END_m}$	15 $\mu$ m <sup>2</sup> /s	[185]	$n_{mERG}$	-10 mV	[53, 63]
<b>I<sub>Na</sub></b>			$n_{hERG}$	17.5 mV	[53, 63]
$g_{Na}$	0.4 nS/pF	[53, 63]	$\tau_{mERG}$	100 ms	[53, 210]
$V_{mNa}$	-18 mV	[20, 53]	$\tau_{hERG}$	50 ms	[53, 63]
$V_{hNa}$	-42 mV	[20, 53]	<b>I<sub>TRP</sub></b>		
$\tau_{hNa}$	2 ms	[20, 53]	$g_{TRP}$	0.25 nS/pF	Est
<b>I<sub>KATP</sub></b>			$V_{TRP}$	0 mV	[211]
$g_{KATP}$	0.015 nS/pF	[63]	$K_{dTRP}$	1.7 $\mu$ M	[211]
<b>I<sub>leak</sub></b>			<b>I<sub>KCa</sub></b>		
$V_{leak}$	-30 mV	[53]	$g_{KCa}$	0.15 nS/pF	Est
$g_{leak}$	0.005 nS/pF	*	$K_{KCa}$	1.5 $\mu$ M	[49]
<b>Otros</b>			<b>NCX</b>		
$C_m$	9.9 pF	[20]	$J_{NCX}^{max}$	0.013 $\mu$ M/ms	[208]
			$K_{NCX}$	2.2 $\mu$ M	[208]

**Tabla 4.2:** Parámetros usados en las simulaciones de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  en condiciones fisiológicas. (\* = Ajustado, Est = Estimado).

Número de fuentes de Ca <sup>2+</sup>	Configuración de amortiguadores de Ca <sup>2+</sup>	$K_{hL}$ ( $\mu$ M)
245	END <sub>f</sub>	0.948
245	END <sub>f</sub> + END <sub>m</sub>	0.658
490	END <sub>f</sub>	0.509
490	END <sub>f</sub> + END <sub>m</sub>	0.371

**Tabla 4.3:** Concentración de Ca<sup>2+</sup> a las que el 50 % de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L están en estado de inactivación ( $K_{hL}$ ). Se muestran los valores estimados de  $K_{hL}$  para los diferentes casos simulados.

Se hicieron simulaciones con diferentes configuraciones de amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  para los casos de 245 y 490 fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ . En primer lugar se consideró un único amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  endógeno inmóvil ( $[\text{END}_f]$ ); posteriormente se añadió un amortiguador endógeno móvil. En todos los casos se asumió una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre inicial ( $[\text{Ca}^{2+}]_0$ ) de 100 nM, concentración estimada en las células  $\beta$  en estado de reposo[38]. Con base en esto, las concentraciones iniciales de las demás especies consideradas son:  $[\text{END}_f]_0 = 306.93 \mu\text{M}$ ,  $[\text{END}_f \cdot \text{Ca}^{2+}]_0 = 3.07 \mu\text{M}$ ,  $[\text{END}_m]_0 = 99.01 \mu\text{M}$ ,  $[\text{END}_m \cdot \text{Ca}^{2+}]_0 = 0.99 \mu\text{M}$ .

Debido a la diferencia entre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal en condiciones experimentales (16.67 nM), y las condiciones fisiológicas (100 nM), es poco probable que el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  que regula la inactivación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L tenga la misma sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  en ambas condiciones. De hecho, se ha propuesto que dicho sensor tiene la capacidad de responder de diferente manera a las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un mecanismo aún no del todo conocido[206, 212]. Es por esto que se estimaron valores para la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (i.e. el valor del parámetro  $K_{hL}$ ) para cada caso simulado (ver Tabla 4.3).

#### 4.8.1. Criterios de validación

Los criterios requeridos para considerar válido el modelo de la actividad eléctrica en condiciones fisiológicas consistieron en reproducir las siguientes observaciones experimentales:

- Frecuencia de disparo de los potenciales de acción ( $\sim 4$  Hz[53, 213]).
- Amplitud de los potenciales de acción en el rango de -70 mV a  $\sim 10$  mV[20, 53].

#### 4.8.2. Contribución de las corrientes iónicas a la formación de los potenciales de acción mediante el análisis del potencial director (*lead potential analysis*)

La actividad eléctrica producida por las simulaciones hechas en condiciones fisiológicas se debe a la actividad simultánea de una gran cantidad de corrientes iónicas (ver Capítulo 6). Ya que es prácticamente imposible medir por medios experimentales la contribución de cada corriente en la formación del patrón de actividad eléctrica, se llevó a cabo el análisis del potencial director[214] (LPA por sus siglas en inglés en



*Lead Potential Analysis*) para estudiar la participación de cada corriente en la formación de un potencial de acción. Este método fue usado para el análisis del modelo de Pedersen[53] en el **Artículo 5**[215].

El método LPA se basa en el cálculo del potencial director ( $V_L$ ), que representa el potencial de equilibrio determinado por las variables de activación e inactivación a cada tiempo observado. Está relacionado al potencial de membrana  $V_m$  de tal manera que este último se aproxima a  $V_L$  a cada paso de tiempo, de donde surge su nombre (potencial director), ya que predice los cambios que tendrá  $V_m$ . Si se escribe la expresión de Hodgkin-Huxley para las corrientes  $I_X = g_X m_X h_X (V_m - V_X)$  como  $I_X = G_X (V_m - V_X)$ , es decir, haciendo  $G_X = g_X m_X h_X$  (en donde la probabilidad de apertura está dada por  $PO = m_X h_X$ ), el potencial director es calculado como:

$$V_L = \frac{\sum_X G_X V_X}{\sum_X G_X}, \quad (4.11)$$

en donde  $X$  representa a cada una de las corrientes consideradas, y  $V_X$  el potencial de inversión correspondiente.

Para obtener la contribución relativa de cada corriente ( $r_{e,X}$ ), es necesario calcular  $dV_L/dt$  como:

$$\frac{dV_L}{dt} = \frac{\left( \sum_X \dot{G}_X V_X + \sum_X G_X \dot{V}_X \right) \sum_X G_X - \left( \sum_X G_X V_X \right) \sum_X \dot{G}_X}{\left( \sum_X G_X \right)^2}, \quad (4.12)$$

en donde  $\dot{G}_X$  y  $\dot{V}_X$  son las derivadas con respecto al tiempo de  $G_X$  y  $V_X$  respectivamente. Es necesario también determinar cómo cada corriente  $i$  afecta  $dV_L/dt$ . Para esto se calcula  $dV_{Li,Fix}$ , que se obtiene eliminando la dependencia temporal de cada componente de interés  $i$  de la ecuación anterior, es decir, haciendo  $\dot{G}_i = 0$  y  $\dot{V}_i = 0$ , manteniendo los términos de las demás corrientes intactos. Esto se puede escribir como:

$$\frac{dV_{Li,Fix}}{dt} = \frac{\left( \sum_{X \neq i} \dot{G}_X V_X + \sum_X G_X \dot{V}_X \right) \sum_X G_X - \left( \sum_X G_X V_X \right) \sum_{X \neq i} \dot{G}_X}{\left( \sum_X G_X \right)^2}. \quad (4.13)$$

Haciendo uso de estas expresiones se puede calcular la contribución relativa de cada corriente (cuando  $dV_L/dt \neq 0$ ) como:

$$r_{C,i} = \frac{dV_L/dt - dV_{L_i, \text{Fix}}/dt}{dV_L/dt}. \quad (4.14)$$

Es importante resaltar que la suma de las contribuciones relativas de todas las corrientes debe satisfacer la ecuación:

$$\sum_i r_{C,i} = 1. \quad (4.15)$$

La contribución relativa de cada corriente ( $r_{C,i}$ ) puede ser positiva o negativa. En el primer caso, es decir, cuando  $r_{C,i} > 0$ , la corriente  $i$  está operando para que la pendiente de  $V_L$  ( $dV_L/dt$ ) se incline en la misma dirección. Por otro lado, cuando  $r_{C,i} < 0$ , significa que la corriente  $i$  interfiere con los cambios temporales de  $V_L$ , inclinando la pendiente de  $V_L$  en la dirección opuesta.

El análisis de la contribución de las corrientes iónicas al disparo de los potenciales de acción se llevó a cabo en Mathematica 9 (Wolfram Research Inc., Champagne, IL).

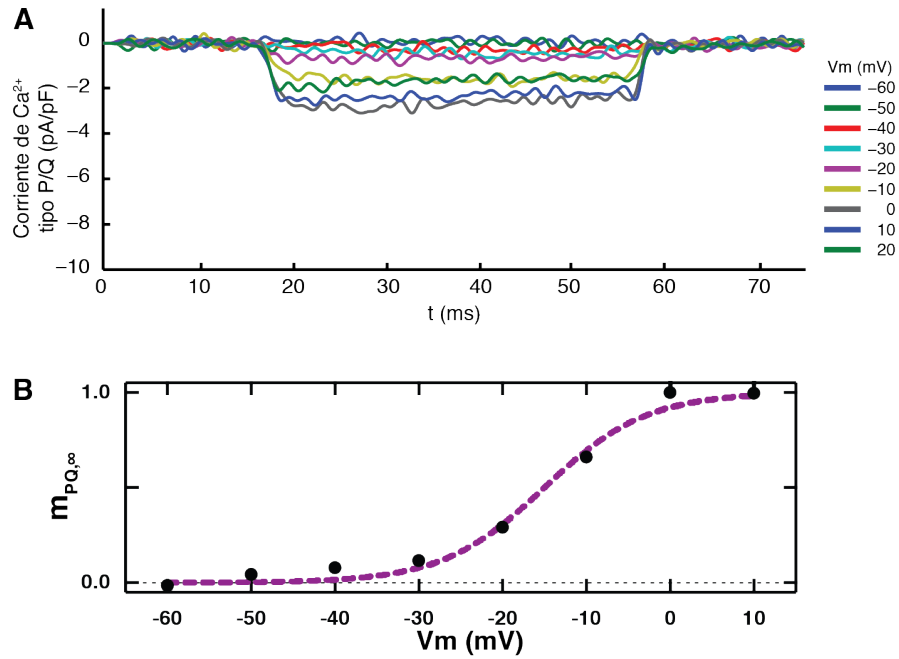
# Capítulo 5

## Simulación de las corrientes macroscópicas de $\text{Ca}^{2+}$ en células $\beta$ humanas en condiciones de fijación de voltaje

En este capítulo, basado en el **Artículo 1**[189], se presenta la caracterización de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, T y P/Q mediante la obtención de expresiones y parámetros con el objetivo de reproducir el comportamiento de estas corrientes durante experimentos de fijación de voltaje. Como se mencionó en las Secciones 4.3 y 4.4.2, es necesario obtener las funciones de activación e inactivación estacionarias, así como las constantes de tiempo para cada corriente como funciones del potencial de membrana o de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio. Ya que los modelos de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  están acoplados al modelo de difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$ , se estimó el rango de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  producidas por los pulsos despolarizantes durante los experimentos de fijación de voltaje en diferentes escenarios.

### 5.1. Corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo P/Q

Como en otros modelos de la célula  $\beta$  humana[53, 54], se asumió que la corriente P/Q activa instantáneamente y que no presenta inactivación durante los pulsos de voltaje simulados de 100 ms de duración. Esto es una suposición razonable dado que se ha observado que el proceso de inactivación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q (de presentarse) es muy lenta en comparación con las otras corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (ver Fig. 5.1A). Esto quiere decir que la función de inactivación  $h_{PQ}$  (ver Eq. 4.1) es



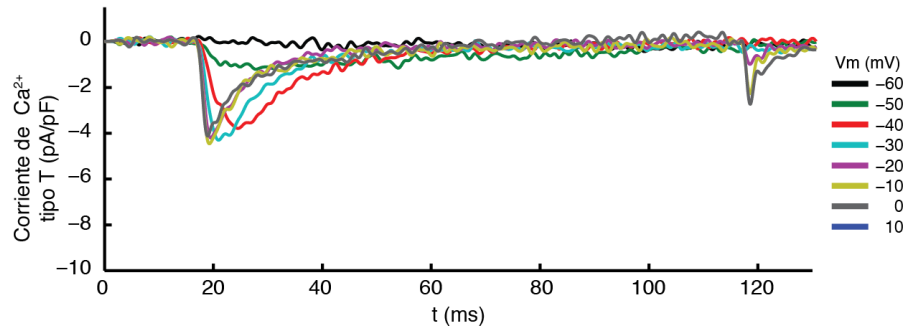
**Figura 5.1:** **A.** Registro experimental típico de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q en condiciones de fijación de voltaje. **B.** Función de activación estacionaria ( $m_{PQ,\infty}$ ) de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q obtenida mediante el ajuste de una función de Boltzmann (línea discontinua morada) a los datos experimentales (puntos negros). Adaptada de [189].

constante con un valor de 1 y que la activación está dada por la función de activación estacionaria ( $m_{PQ,\infty}$ ) con parámetros  $V_{mPQ} = -15 \pm 0.96$  mV y  $k_{mPQ} = 6.1 \pm 0.84$  mV, obtenidos del ajuste de una sigmoide de Boltzmann (Eq. 4.3a) a los datos experimentales ( $R^2 = 0.99$ , Fig. 5.1B). La ecuación que describe la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q ( $I_{PQ}$ ) es entonces:

$$I_{PQ} = g_{PQ} m_{PQ,\infty} (V_m - V_{Ca}). \quad (5.1)$$

## 5.2. Corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T

La corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T, como se puede apreciar en el trazo experimental típico que se muestra en la Fig. 5.2, presenta procesos tanto de activación como de inactivación dependientes de los cambios en el potencial de membrana. Con base en



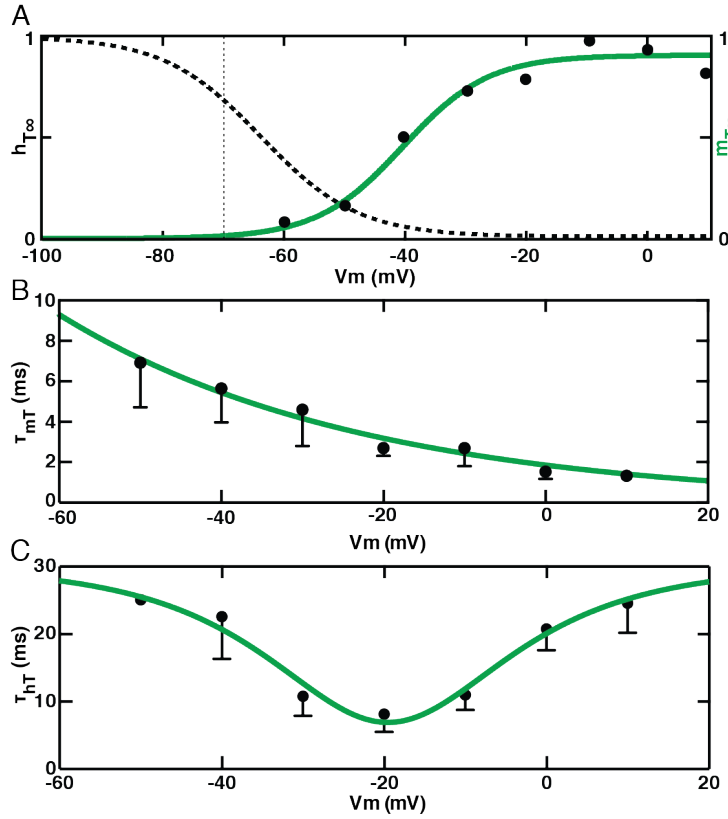
**Figura 5.2:** Registro experimental típico de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T en condiciones de fijación de voltaje.

esto, la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T fue modelada como:

$$I_T = g_T m_T h_T (V_m - V_{Ca}), \quad (5.2)$$

en donde las variables dinámicas de activación e inactivación ( $m_T$  y  $h_T$  respectivamente) están dadas por las Eqs. 4.2. Los parámetros estimados para la función de activación estacionaria ( $m_{T,\infty}$ , Eq. 4.3a) son  $V_{mT} = -40.58 \pm 1.9$  mV y  $k_{mT} = 7.07 \pm 1.68$  mV, obtenidos mediante el ajuste de una sigmoide de Boltzmann a los datos experimentales ( $R^2 = 0.97$ , Fig. 5.3A). Por su parte, los parámetros para la función de inactivación estacionaria  $h_{T,\infty}$  (Fig. 5.3A) fueron dados por Braun et al.[20] ( $V_{hT} = -64 \pm 2$  mV y  $k_{hT} = -8 \pm 1$  mV), y fueron usados sin modificación en este modelo.

Otros modelos de la célula  $\beta$  humana[53, 54] asumen que la corriente tipo T activa de manera instantánea y que inactiva siguiendo una única constante de tiempo. En el modelo de esta corriente que aquí se propone hemos considerado la dependencia del voltaje tanto de las constantes de tiempo de activación como de inactivación ( $\tau_{mT}$  y  $\tau_{hT}$ ), que fueron obtenidas mediante el ajuste de funciones exponenciales a los segmentos de activación e inactivación de los registros electrofisiológicos de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T (ver Sección 4.4.2). Las expresiones que describen la relación entre constantes de tiempo y voltaje se obtuvieron mediante el ajuste de ecuaciones empíricas a las constantes de tiempo promedio para ambos casos. Como se puede ver en la Fig. 5.3B, las constantes de tiempo de activación muestran un comportamiento monótonico en el rango de voltajes de -60 a 10 mV, decreciendo desde un valor de  $6.9 \pm 2.2$  ms hasta  $1.3 \pm 0.22$  ms respectivamente. Este comportamiento fue modelado mediante la función:



**Figura 5.3:** **A.** La función de activación estacionaria ( $m_{T,\infty}$ ) se obtuvo mediante el ajuste de una función de Boltzmann a los datos experimentales. Se muestra la función de inactivación estacionaria ( $h_{T,\infty}$ ) reportada por Braun et al. [20] (línea discontinua negra). **B** y **C.** Ajuste de expresiones empíricas a las constantes de tiempo experimentales de activación (**B**) e inactivación (**C**). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. En todos los casos las expresiones ajustadas se muestran como líneas continuas de color verde y los datos experimentales como puntos en negro. Adaptada de [189]

$$\tau_{mT} = a \exp \left[ \frac{b - V_m}{c} \right] \quad (5.3)$$

con  $a = 1$  ms,  $b = 23.77$  mV y  $c = 37.58$  mV. El ajuste de esta función a los datos experimentales se muestra en la Fig. 5.3B ( $R^2 = 0.98$ ).

Por su parte, las constantes de tiempo de inactivación ( $\tau_{hT}$ ) mostraron un comportamiento decreciente en el rango de voltajes de -50 a -20 mV y creciente de -20 a 10 mV, con un valor mínimo de  $8.15 \pm 2.7$  ms a -20 mV y valores máximos de 25.1 y  $24.6 \pm 4.37$  ms para -50 y 10 mV respectivamente (Fig. 5.3C). Un buen ajuste ( $R^2 = 0.97$ ) a los datos experimentales se obtuvo con la expresión:

$$\tau_{hT} = a - \frac{b}{0.16 \exp \left[ \frac{V_m + c}{d} \right] + 0.16 \exp \left[ \frac{-(V_m + c)}{d} \right]} \quad (5.4)$$

con  $a = 30$  ms,  $b = 7.43$  ms,  $c = 19.52$  mV y  $d = 13.13$  mV.

Como se mencionó en la Sección 4.4.2, la conductancia máxima estimada para la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T fue de 0.046 nS/pF, valor similar al estimado por Pederesen[53]. Sin embargo, como se puede observar en la Fig. 5.3A, en donde se muestra la función de inactivación estacionaria  $h_{T,\infty}$ ,  $\sim 30\%$  de los canales se encuentran en estado de inactivación al potencial de reposo de -70 mV, además de que, cuando la variable de activación ( $m_T$ ) alcanza su valor máximo, el proceso de inactivación se encuentra ya en proceso, de tal manera que la probabilidad de apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T únicamente incrementa a  $\sim 0.55$  cuando se alcanza el pico de corriente. Esto provocó la subestimación de la conductancia máxima de la corriente tipo T, que fue ajustada a un valor de 0.13 nS/pF para reproducir los picos de corriente dados por la curva I-V experimental (Fig. 4.5).

### 5.3. Corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L

La corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L es activada por cambios en el potencial de membrana e inactivada principalmente por el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, aunque también se ha observado en ocasiones un componente de inactivación dependiente del voltaje[216]. Trazos típicos de esta corriente durante un experimento de fijación de voltaje se muestran en la Fig. 5.4. En este modelo la corriente tipo L fue modelada como:

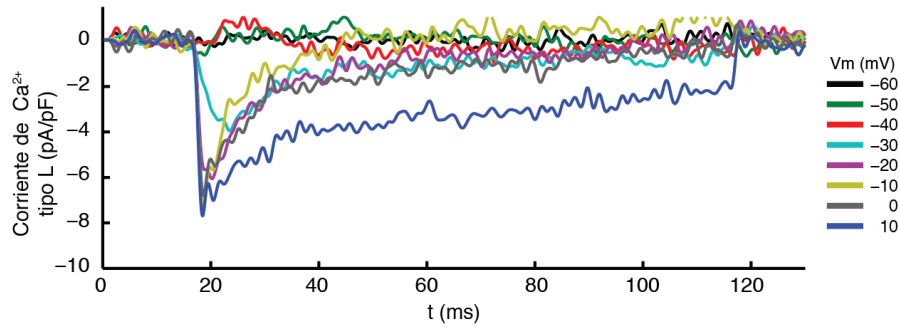
$$I_L = g_L m_L h_L (V_m - V_{Ca}). \quad (5.5)$$

La función de activación ( $m_L$ ) es únicamente dependiente de los cambios en el potencial de membrana, siendo por lo tanto representada por la ecuación 4.2a. Los parámetros estimados para la función de activación estacionaria ( $m_{L,\infty}$ , Eq. 4.3a) son  $V_{mL} = -29.73 \pm 0.68$  mV y  $k_{mL} = 7.77 \pm 0.6$  mV. El ajuste correspondiente se muestra en la Fig. 5.5B ( $R^2 = 0.99$ ). Por su parte las constantes de tiempo de activación decrecieron monotónicamente desde un valor de 3.85 ms a  $0.48 \pm 0.07$  ms para los pulsos despolarizantes en el rango de -40 y 10 mV respectivamente. Este comportamiento se modeló como:

$$\tau_{mL} = a + b \exp \left[ \frac{c - V_m}{d} \right], \quad (5.6)$$

con  $a = 0.25$  ms,  $b = 1$  ms,  $c = -22.9$  mV,  $d = 15$  mV. El ajuste de esta función a los datos experimentales se muestra en la Fig. 5.5B ( $R^2 = 0.97$ ).

Otros modelos han hecho uso de aproximaciones matemáticas para representar la dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de la función de inactivación de la corriente de



**Figura 5.4:** Registro experimental típico de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L en condiciones de fijación de voltaje.

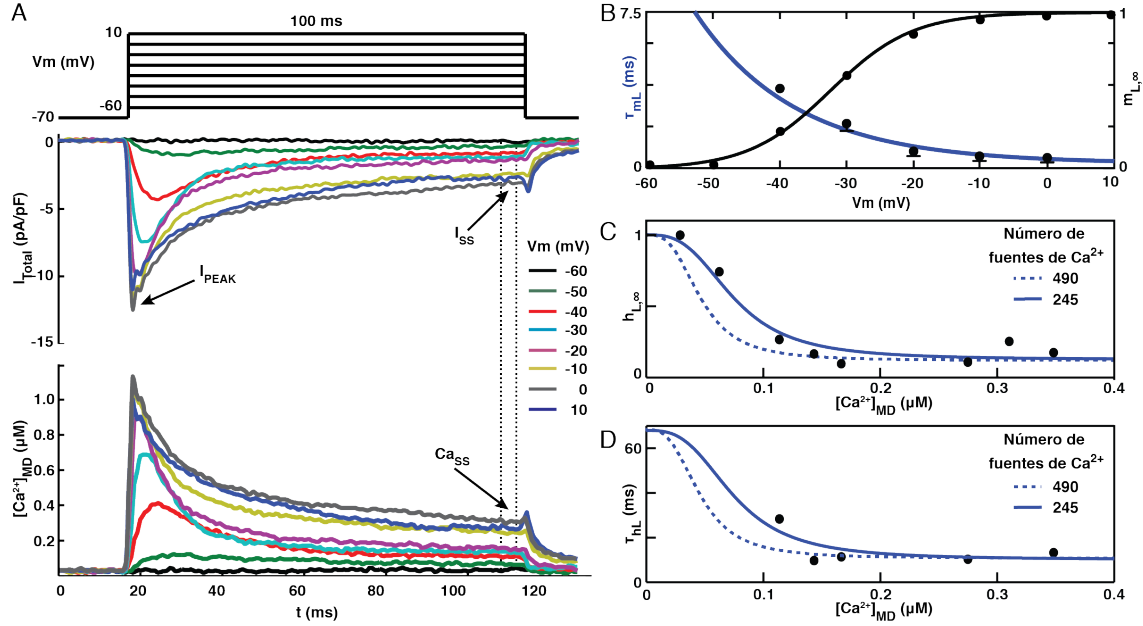
$\text{Ca}^{2+}$  tipo L, por lo general asumiendo que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es proporcional a la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  [53, 54], siguiendo el modelo propuesto por Sherman et al.[217]. Por otro lado, en el modelo de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana de Fridlyand et al.[49] fue despreciado el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en la inactivación de la corriente tipo L, siendo modelada como una corriente dependiente del voltaje.

En el modelo que aquí se propone se consideró la dependencia en los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  tanto de la función de inactivación  $h_L$  como de las constantes de tiempo de inactivación ( $\tau_{hL}$ ). Dada la falta de mediciones experimentales de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  en células  $\beta$  humanas se utilizó el modelo de difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  junto con los registros experimentales de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  para obtener las expresiones de la inactivación de la corriente tipo L en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (ver Fig. 5.5).

Trazos experimentales promedio de la corriente total (panel superior en la Fig. 5.5A,  $n = 10$ ) fueron usados para generar el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la célula  $\beta$  simulada ( $I_{Ca}$  en la Eq. 4.8) para los dos casos considerados (245 y 490 fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Como se puede observar en el panel inferior de la Fig. 5.5A, el curso temporal de  $[\text{Ca}^{2+}]_{MD}$  se asemeja al del trazo promedio de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La función de inactivación estacionaria dependiente de  $[\text{Ca}^{2+}]_{MD}$  fue estimada como el cociente entre la corriente al final del pulso y la corriente al pico ( $I_{SS}/I_{peak}$ , Fig. 5.5A). Posteriormente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio obtenida al final de los pulsos despolarizantes ( $[\text{Ca}^{2+}]_{SS}$ ) fue asociada a los valores de  $h_{L,\infty}$  para obtener la función de inactivación estacionaria en función de  $[\text{Ca}^{2+}]_{MD}$  (Fig. 5.5C). Finalmente, se ajustó una ecuación de Hill a los puntos resultantes:





**Figura 5.5:** **A.** Trazos promedio ( $n = 10$ ) de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  (arriba) se usaron como la señal de entrada al modelo de difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  para calcular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el sensor localizado a 30 nm de las fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$  (abajo). La función de inactivación estacionaria ( $h_{L,\infty}$ ) se estimó primero como  $I_{\text{SS}}/I_{\text{PEAK}}$  y posteriormente fue asociada con las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  calculadas al final de los pulsos despolarizantes ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SS}}$ , abajo) con la finalidad de obtener  $h_{L,\infty}$  en función del  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}}$ ). **B.** Función de activación estacionaria ( $m_{L,\infty}$ ) obtenida mediante el ajuste de una función de Boltzmann (línea negra) a los datos experimentales (círculos negros). Se muestran las constantes de tiempo de activación experimentales (círculos negros, presentados como medias  $\pm$  SEM) junto con el ajuste de la Eq. 5.6 (curva azul). **C.** La función de inactivación estacionaria dependiente de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}}$  ( $h_{L,\infty}$ ) se obtuvo al ajustar una función de Hill (Eq. 5.7) a los datos experimentales (círculos negros). Se muestran dos ajustes, con diferentes sensibilidades al  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{hL}$ ) correspondientes a las geometrías con 245 (línea azul continua) y 490 (línea azul punteada) fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ . **D.** Constantes de tiempo de inactivación dependientes de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}}$ . Se realizó el ajuste (líneas azules) de la Eq. 5.8 a los datos experimentales (círculos negros) con los mismos valores de  $K_{hL}$  utilizados en **C**.

$$h_{L,\infty} = 0.12 + \frac{1 - 0.12}{1 + \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]_{MD}}{K_{hL}}\right)^3}, \quad (5.7)$$

en donde  $K_{hL}$  es la constante de disociación en unidades de concentración y denota la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a la que la mitad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L se encuentran en estado de inactivación en estado estacionario. Para el caso de 245 fuentes puntuales, los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]_{SS}$  estuvieron en el rango de 0.03 a 0.35  $\mu\text{M}$ , resultando un valor estimado para  $K_{hL,245} = 0.074\mu\text{M}$ . Como se asume comunmente en modelos de la corriente tipo L (ver por ejemplo ref. [216]), la misma constante de disociación  $K_{hL}$  fue utilizada en la expresión que describe las constantes de tiempo de inactivación en función de  $[\text{Ca}^{2+}]_{MD}$ :

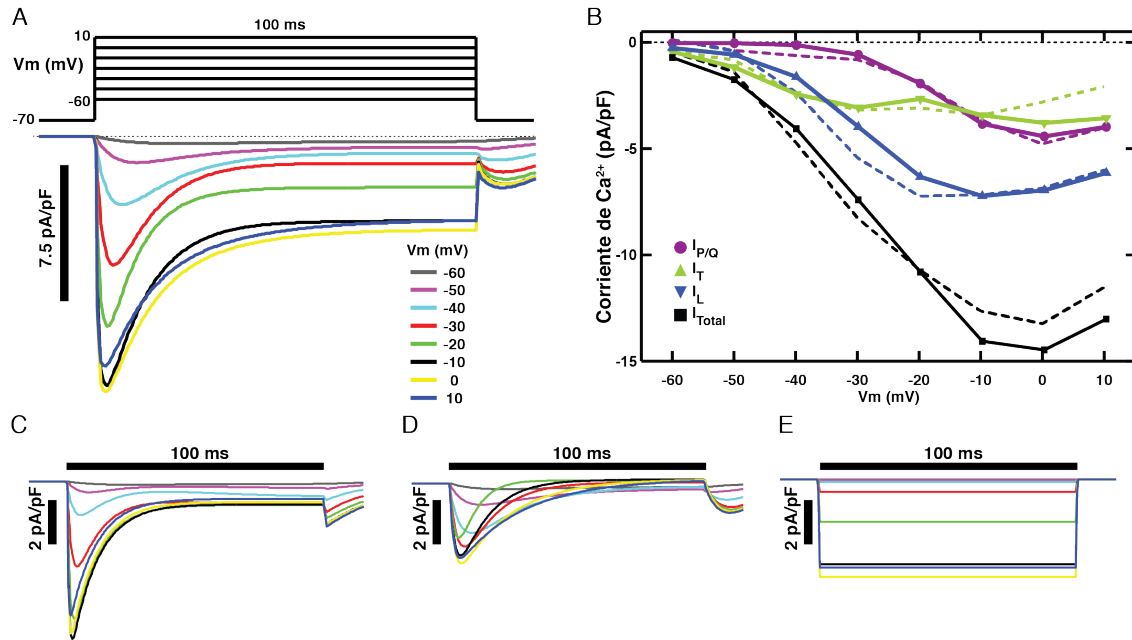
$$\tau_{hL} = a + \frac{b}{0.017 \left(1 + \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{MD}}{K_{hL}}\right)^3} \quad (5.8)$$

en donde  $a = 10.34$  ms y  $b = 1$  ms. El ajuste de esta función a los datos experimentales se muestra en la Fig. 5.5D ( $R^2 = 0.95$ ). Las mismas funciones (Eqs. 5.7 y 5.8) fueron utilizadas para el caso de 490 fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para este caso  $[\text{Ca}^{2+}]_{SS}$  se estimó en el rango de  $\sim 0.02$  a 0.18  $\mu\text{M}$ , por lo que ambas curvas ( $h_{L,\infty}$  y  $\tau_{hL}$ ) fueron desplazadas hacia la izquierda ( $K_{hL,490} = 0.046\mu\text{M}$ ) para reflejar el rango de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  resultante del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un mayor número de fuentes puntuales (Fig. 5.5C-D).

La conductancia máxima estimada para la corriente tipo L ( $g_L = 0.1$  nS/pF, ver sección 4.4.2) fue ligeramente subestimada dado que el proceso de inactivación debido a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra en progreso cuando la variable de activación ( $m_L$ ) alcanza su valor máximo. Por lo tanto,  $g_L$  fue ajustada a un valor de 0.13 nS/pF para reproducir las magnitudes al pico de las corrientes observadas experimentalmente (ver Fig. 4.5). Un valor similar de 0.14 nS/pF fue estimado por Pedersen[53].

## 5.4. Corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ simuladas en condiciones de fijación de voltaje

Usando los modelos de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  descritos en las secciones anteriores se realizaron simulaciones para reproducir los protocolos experimentales seguidos por Braun et al.[20], que consisten en pulsos despolarizantes de 100 ms de duración desde un potencial de reposo de -70 mV a valores de voltaje desde -60 a 10 mV con incrementos de 10 mV. Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  simuladas se muestran en la Fig. 5.6.



**Figura 5.6:** Simulación de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones de fijación de voltaje. **A.** Corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  producida por pulsos despolarizantes de -60 a 10 mV con incrementos de 10 mV desde un potencial de reposo de -70 mV. **B.** Las curvas I-V obtenidas de las simulaciones son comparadas con las curvas I-V experimentales mostradas en la Fig. 4.5 (líneas punteadas) para todas las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (total y tipo L, T y P/Q). **C-E.** Simulaciones de las corrientes tipo L (**C**), T (**D**) y P/Q (**E**) aisladas, obtenidas en respuesta a los pulsos despolarizantes que se muestran en **A**.

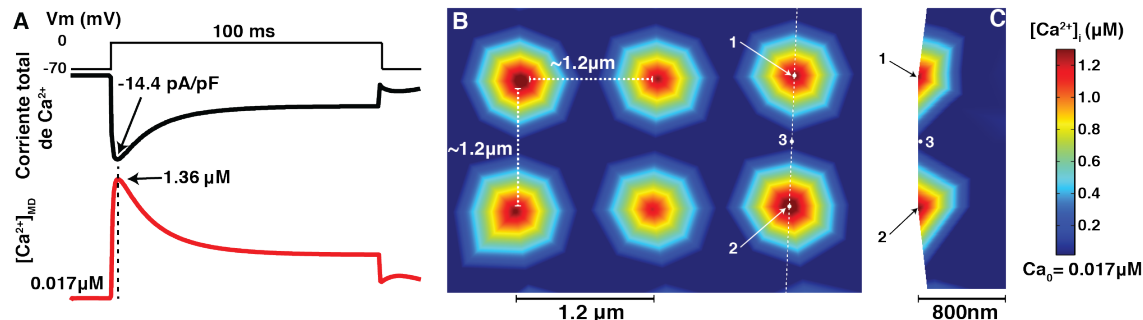
Al comparar estos resultados con los trazos experimentales mostrados anteriormente (i.e. Fig. 4.4, o Figs. 5.4, 5.2 y 5.1), podemos decir que este modelo reproduce satisfactoriamente tanto la dinámica como la magnitud de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . En la Fig. 5.6B se compara la curva I-V simulada con la curva I-V experimental para las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, T y P/Q, así como para la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como se puede observar, la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  simulada difiere ligeramente de la corriente total experimental en el rango de -10 a 10 mV. Esto se explica por el hecho de que las corrientes aisladas no son bloqueadas completamente por los agentes farmacológicos utilizados en los experimentos, resultando por lo tanto en una sobreestimación de las corrientes aisladas. De hecho, Braun et al.[20] mostraron que el uso de una combinación de bloqueadores específicos de las corrientes tipo L, T y P/Q (isradipina, T NNC 550396 y w-agatoxina IVA respectivamente) solo inhibieron  $\sim 91\%$  de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que indica la presencia de una corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  residual. En contraste, en este modelo la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  fue obtenida directamente de la suma de las corrientes individuales; esto es,  $I_{Ca} = I_L + I_T + I_{PQ}$ .

## 5.5. Dinámica del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en condiciones de fijación de voltaje

### 5.5.1. Dominios submembranales de $\text{Ca}^{2+}$ en la célula $\beta$ humana

La distribución del  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio intracelular durante los experimentos de fijación de voltaje fue simulada acoplando los modelos de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Secciones 5.1, 5.2 y 5.3) con el modelo de la difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula esférica (Sección 4.5). Una de las ventajas de usar una geometría tridimensional es que nos permite considerar la distribución y separación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana celular y observar el proceso de difusión tanto en la dirección radial como tangencial.

Usando este modelo se evaluó si los microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  formados en la vecindad de las fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$  se traslapan para formar dominios submembranales de  $\text{Ca}^{2+}$ . En la Fig. 5.7 se muestra la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  en ambas direcciones (radial y tangencial) en el instante de tiempo en el que la concentración en el microdominio ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}}$ ), debida a la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  producida por un pulso despolarizante a 0 mV, alcanza su máximo valor para el caso de 245 fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se puede observar que a pesar de la alta concentración de amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  incluida (10 mM EGTA), se generan gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en la dirección



**Figura 5.7:** No se producen dominios submembranales de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones de fijación de voltaje. Al tiempo en el que se alcanza la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  máxima (línea vertical punteada), obtenida para el pulso a 0 mV (**A**), las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  de las fuentes puntuales no se traslapan, como se muestra en **B**, en donde se muestran seis fuentes puntuales seleccionadas arbitrariamente. **C**. Un corte transversal a través de la línea punteada blanca que se muestra en **B** y el centro de la célula.

tangencial (Fig. 5.7B) como radial (Fig. 5.7C). Asumiendo que los tres tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se agrupan en cada fuente puntual y que la distancia entre estas es de  $1.2 \mu\text{m}$ , como estimaron Barg et al. [151] en células  $\beta$  de roedor, se puede ver que en condiciones de fijación de voltaje los microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  no se traslapan. Por ejemplo, para el caso de 245 fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras en los puntos 1 y 2 que se muestran en la Fig. 5.7B y C,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}}$  fue superior a  $1.3 \mu\text{M}$ , en el punto 3, localizado a distancias iguales de los puntos 1 y 2, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  no incrementó significativamente del nivel basal. Los mismos resultados se obtuvieron para el caso de 490 fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (no se muestran los resultados), aunque el  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio tuvo un valor máximo de  $\sim 0.69 \mu\text{M}$  debido a que el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  total es distribuido entre un mayor número de fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto, en condiciones de alta amortiguación de  $\text{Ca}^{2+}$ , los microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  no formaron dominios submembranales de  $\text{Ca}^{2+}$  en los experimentos de fijación de voltaje simulados debido a que no hay traslape de microdominios contiguos. Esto nos permite concluir que se generan microdominios similares en la vecindad de todas las fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que indica que en estas condiciones sería posible reducir la geometría del modelo y enfocarse en una sola fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  en vista de que esta no se ve afectada por las fuentes vecinas. Como consecuencia de esto se reducirían considerablemente los recursos computacionales requeridos para llevar a cabo las simulaciones.

Otros estudios de simulación en células cromafines[185] sugieren que dominios submembranales de  $\text{Ca}^{2+}$  son formados debido al traslape de los microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  producidos en la boca de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, en dicho estudio los

canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen una separación de 300 nm, además de que la concentración de los amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  incluidos en el modelo fue mucho menor (500  $\mu\text{M}$  de fura-2). Considerando que la separación estimada entre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula  $\beta$  es de  $\sim 1.2\mu\text{m}$ [151] (cuatro veces mayor que en el modelo de Klingauf et al. de las células cromafines[185]), es entendible que en el caso de las simulaciones de la célula  $\beta$  humana no se formen dominios submembranales de  $\text{Ca}^{2+}$  similares.

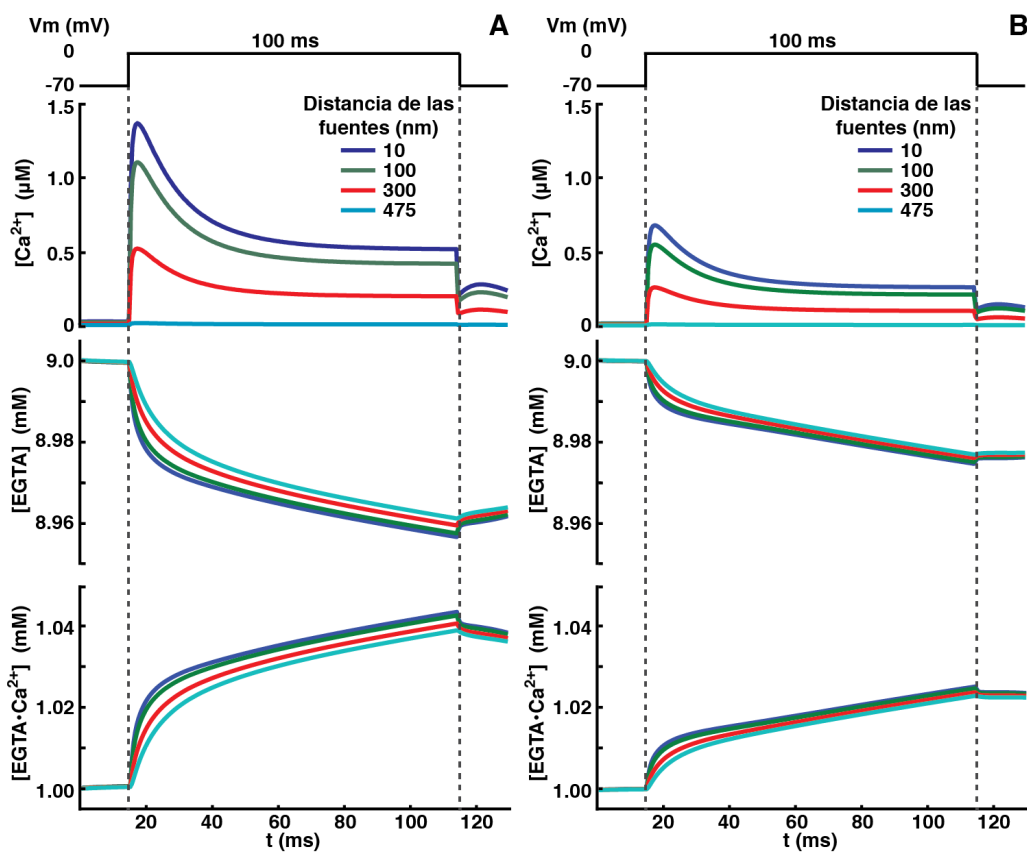
### 5.5.2. Distribución espaciotemporal del $\text{Ca}^{2+}$ en la vecindad de la membrana celular

Gil et al. [186] mostraron que la forma del estímulo que produce el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula tiene implicaciones importantes tanto en la magnitud como en la localización temporal del pico de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . En este sentido, con la finalidad de simular la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de la mejor manera posible, se emplearon como estímulo los modelos de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula  $\beta$  humana, que como se mostró en la Sección 5.4, reproducen aceptablemente los trazos de corrientes experimentales (ver. Fig. 5.6).

Los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  producidos por el pulso de voltaje a 0 mV en presencia de 10 mM de EGTA se muestran en la Fig. 5.8 para los casos de 245 (Fig. 5.8A) y 490 (Fig. 5.8B) fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se pueden distinguir dos fases en la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$ , que se asemejan al curso temporal de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$ . Durante la primera fase,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  incrementa hasta el pico de concentración de donde decrece para dar paso a la segunda fase, en la que un gradiente de concentración es sostenido debido al flujo continuo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Sin importar la alta concentración de EGTA libre ( $\sim 9$  mM), la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  genera un incremento considerable en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la vecindad inmediata de la membrana celular. Para el caso de 245 fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  máxima a 30, 100 y 300 nm de las fuentes fue de 1.36, 1.1 y 0.53  $\mu\text{M}$  respectivamente. Por otro lado, para el caso de 490 fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ , las concentraciones máximas estimadas a las mismas distancias de las fuentes fueron de 0.69, 0.56 y 0.27  $\mu\text{M}$  respectivamente. En ambos casos, la concentración máxima estimada a 100 y 300 nm representa una reducción de alrededor del 19 y 61 % respectivamente en comparación con los valores estimados en el microdominio (Figs. 5.9A y B).

Se puede observar que la formación de  $[\text{EGTA}\cdot\text{Ca}^{2+}]$  no es lo suficientemente rápida como para seguir el curso temporal de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 5.8). Como resultado, el complejo  $[\text{EGTA}\cdot\text{Ca}^{2+}]$  incrementa durante la duración del pulso en todos los puntos de medición, debido al flujo continuo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto resulta en un



**Figura 5.8:** Simulación del transitorio producido por un pulso despolarizante a 0 mV en presencia de 10 mM de EGTA para el caso de 245 (**A**) y 490 (**B**) fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para ambos casos se muestran la distribución espaciotemporal del  $\text{Ca}^{2+}$  libre (arriba), [EGTA] (medio) y el complejo [EGTA· $\text{Ca}^{2+}$ ] (abajo).

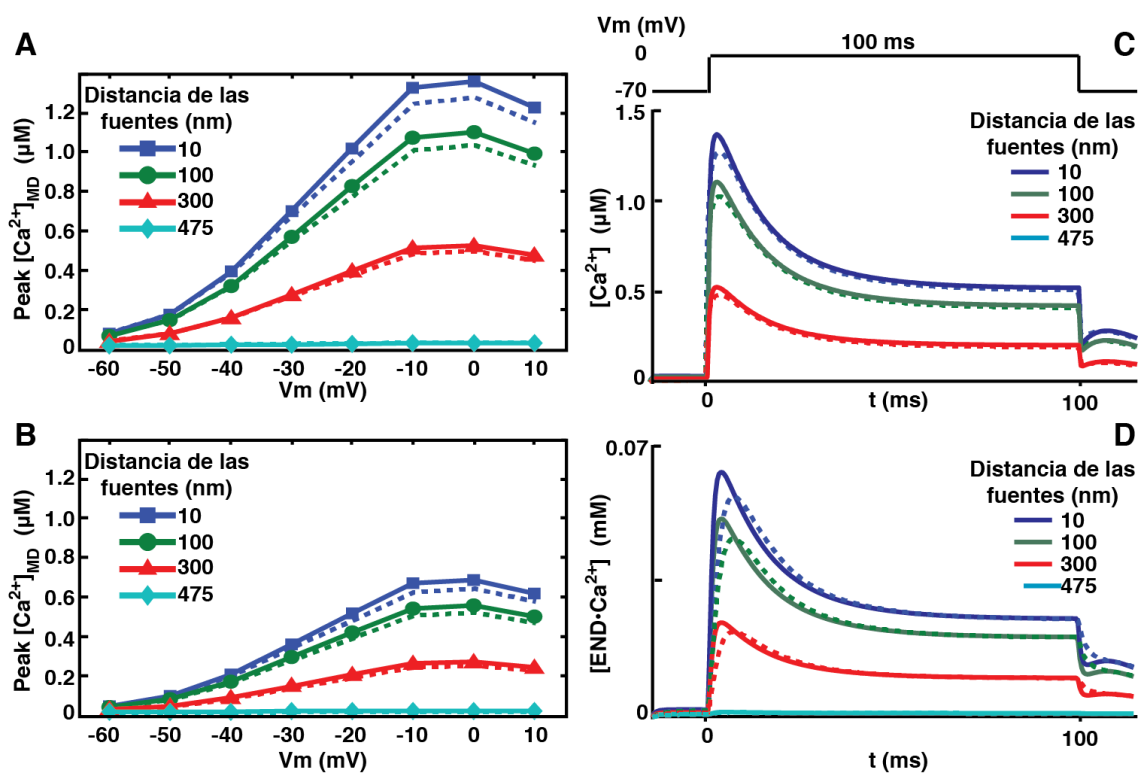
gradiente sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$  cerca del final del pulso, en donde, para el caso de 245 fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular decreció de  $0.53 \mu\text{M}$  a 30 nm a  $0.43$  y  $0.21 \mu\text{M}$  a 100 y 300 nm respectivamente (Fig. 5.8A). De la misma manera, para el caso de 490 fuentes, se formó el gradiente sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$  al final del pulso en el que se obtuvo una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $0.27 \mu\text{M}$  a 30 nm que disminuyó a  $0.22$  y  $0.11 \mu\text{M}$  a 100 y 300 nm respectivamente (Fig. 5.8B).

Es importante mencionar que la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa) incluida en el modelo como mecanismo de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  al exterior de la célula no tuvo un efecto relevante en los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  durante las simulaciones de los pulsos de voltaje de 100 ms de duración. Esto fue también observado en otros estudios computacionales, como lo reportaron Sala et al. [183] y Nowycky et al.[184]. De hecho, Sala et al.[183] en su modelo de la neurona esférica observaron un efecto de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  en los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  solo al incrementar diez veces la velocidad máxima de expulsión.

### 5.5.3. Efecto de amortiguadores de $\text{Ca}^{2+}$ endógenos fijos en la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$

En los experimentos de fijación de voltaje en microáreas de membrana en la configuración de célula completa, el medio intracelular es dializado (ver Sección 2.6), removiendo los amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  móviles del medio intracelular. Por otro lado, se ha observado en células neuroendócrinas que amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  endógenos fijos permanecen al interior de la célula en estas condiciones[18, 19]. Klingauf y Neher[185] caracterizaron estos amortiguadores endógenos mediante una constante de asociación ( $k_+$ ) más rápida en comparación con la de amortiguadores exógenos como el EGTA. Para evaluar el efecto de los amortiguadores endógenos fijos tanto en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  máxima como en la dinámica de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula  $\beta$  humana en condiciones de fijación de voltaje, se realizaron simulaciones incluyendo 10 mM EGTA junto con 0.5 mM de un amortiguador endógeno fijo (END). Se utilizaron parámetros cinéticos estándar reportados en otros trabajos[185, 186] (ver Tabla 2). Debido a la alta concentración de EGTA, la inclusión del amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  endógeno no tuvo efectos significativos en la concentración máxima de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se utilizaron los parámetros cinéticos estándar. Únicamente se observó una reducción significativa en la concentración máxima de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto para el caso de 490 como de 245 fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se utilizó una constante de asociación lenta ( $k_+ = 50\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), como se muestra en las Figs. 5.9C y D. Esto se observa claramente en las Figs. 5.9A y B, en las que se muestran las concentraciones máximas obtenidas en respuesta a pulsos de voltaje de -60 a 10 mV en presencia





**Figura 5.9: A y B.** Concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  máximas estimadas a diferentes distancias de las fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$  durante experimentos de fijación de voltaje al aplicar pulsos despolarizantes de -60 a 10 mV con incrementos de 10 mV para los casos de 245 (A) y 490 (B) fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . **C.** Efecto de incluir 0.5 mM de un amortiguador endógeno inmóvil (END) con una constante de asociación lenta ( $k_+ = 50\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) en la distribución espacio-temporal del  $\text{Ca}^{2+}$  en los microdominios generados por la corriente total debida a un pulso despolarizante a 0 mV para el caso de 245 fuentes puntuales. En A-C las líneas continuas corresponden a las simulaciones en presencia de 10 mM de EGTA como único amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las líneas punteadas indican los resultados de las simulaciones cuando 10 mM de EGTA y 0.5 mM de un amortiguador endógeno inmóvil con una constante de asociación lenta ( $k_+ = 50\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) fueron incluidos en el modelo. **D.** Comparación de la dinámica de  $[\text{END}\cdot\text{Ca}^{2+}]$  simulada con diferentes constantes de asociación  $k_+ = 500\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (línea continua) y  $k_+ = 50\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (línea punteada). Condiciones iniciales para el amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  inmóvil:  $[\text{END}]_{\text{total}} = 0.5 \text{ mM}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_0 = 16.66\mu\text{M}$ ,  $[\text{END}\cdot\text{Ca}^{2+}]_0 = 0.083 \mu\text{M}$ ,  $[\text{END}]_0 = [\text{END}]_{\text{total}} - [\text{END}\cdot\text{Ca}^{2+}]_0$ ,  $[\text{EGTA}]_{\text{total}} = 10 \text{ mM}$ ,  $[\text{EGTA}\cdot\text{Ca}^{2+}]_0 = 999.9\mu\text{M}$ ,  $[\text{EGTA}]_0 = [\text{EGTA}]_{\text{total}} - [\text{EGTA}\cdot\text{Ca}^{2+}]_0$ .

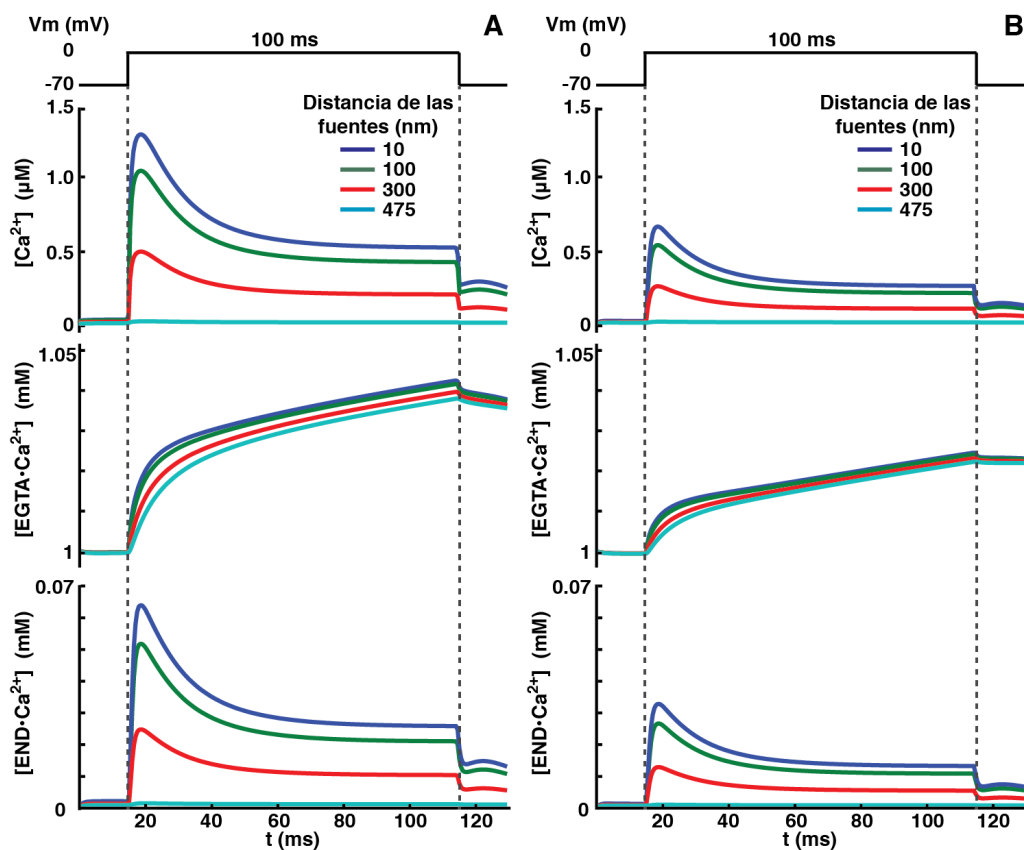
y ausencia del amortiguador endógeno fijo. Para la corriente máxima, obtenida con el pulso a 0 mV, la concentración máxima de  $\text{Ca}^{2+}$  decreció  $\sim 6\%$  en comparación con el valor obtenido cuando únicamente se incluyó EGTA en ambos casos (245 y 490 fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Específicamente, para el caso de 245 fuentes, la concentración máxima de  $\text{Ca}^{2+}$  decreció de 1.36 a 1.26  $\mu\text{M}$  a 30 nm, de 1.10 a 1.04  $\mu\text{M}$  a 100 nm y de 0.53 a 0.50  $\mu\text{M}$  a 300 nm al incluir el amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  endógeno al modelo. De la misma manera, para el caso de 490 fuentes, la concentración máxima de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuyó de 0.69 a 0.65  $\mu\text{M}$  a 30 nm, de 0.56 a 0.53  $\mu\text{M}$  a 100 nm y de 0.27 a 0.26  $\mu\text{M}$  a 300 nm. Es importante destacar que este efecto en la concentración máxima de  $\text{Ca}^{2+}$  solo se observó con una constante de asociación del amortiguador endógeno fijo diez veces menor que el valor estándar (es decir, reduciéndola de  $k_+ = 500$  a  $50\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). El curso temporal de la formación de  $[\text{END}\cdot\text{Ca}^{2+}]$  para ambos valores de  $k_+$  (Fig. 5.9D) indica que se requiere un enlace lento del  $\text{Ca}^{2+}$  al amortiguador endógeno fijo para producir un efecto significativo en la concentración máxima de  $\text{Ca}^{2+}$ . Vale la pena mencionar que al utilizar una constante de asociación diez veces mayor al valor estándar (es decir,  $k_+ = 500\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), tampoco se observaron cambios relevantes en la concentración máxima de  $\text{Ca}^{2+}$  en comparación con los resultados del modelo que incluyó al EGTA como único amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Al incluir los amortiguadores endógenos fijos, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la segunda fase de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  no se modificó significativamente (comparar Figs. 5.8 y 5.10), viéndose afectada únicamente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  máxima como se vió en la Fig. 5.9. Esto se explica por la mayor velocidad de captura del amortiguador endógeno, lo que le permite seguir los cambios rápidos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Como en el caso en el que el EGTA fue el único amortiguador incluido en el modelo, al agregar el amortiguador endógeno, el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular solo se observó a una distancia máxima de  $\sim 450$  nm de las fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que refleja el efecto de la alta concentración de EGTA. A distancias mayores la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se mantuvo a niveles basales durante la duración de los experimentos de fijación de voltaje simulados.

#### 5.5.4. Comparación con mediciones experimentales del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en células $\beta$

Concentraciones similares a las obtenidas de las simulaciones han sido medidas experimentalmente en células  $\beta$  de roedores. Por ejemplo, Theler et al.[199] midieron una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  submembranal menor a 1  $\mu\text{M}$  en células  $\beta$  de ratas estimuladas con glucosa. Valores ligeramente mayores ( $\sim 2$   $\mu\text{M}$ ) fueron medidos en el dominio submembranal de células MIN6 por Pinton et al.[218] al despolarizar con



**Figura 5.10:** Simulación del transitorio producido por un pulso despolarizante a 0 mV en presencia de 10 mM de EGTA y 0.5 mM de un amortiguador endógeno inmóvil para el caso de 245 (A) y 490 (B) fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para ambos casos se muestran la distribución espaciotemporal del  $\text{Ca}^{2+}$  libre (arriba), [EGTA] (medio) y el complejo  $[\text{EGTA}\cdot\text{Ca}^{2+}]$  (abajo).

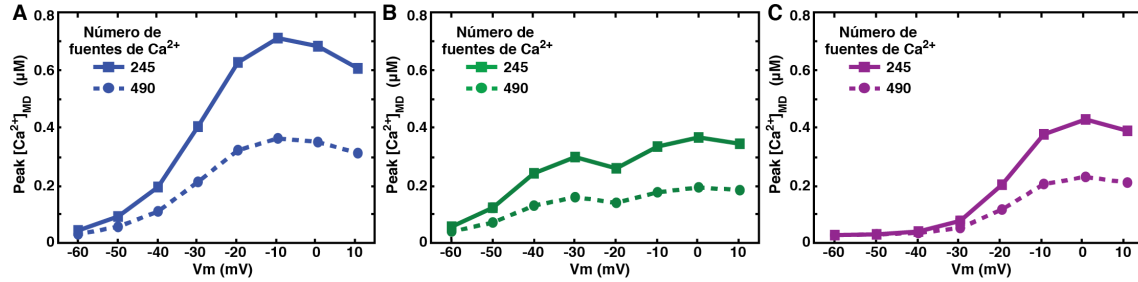
KCl. Por otro lado, Bokvist et al.[137] estimaron una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  submembranal máxima de  $\sim 2.3 \mu\text{M}$  en respuesta a despolarizaciones de 200 ms en células  $\beta$  de ratón.

Otros estudios han reportado concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mayores. Tal es el caso de lo reportado por Quesada et al.[200], quienes midieron una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $6.7 \mu\text{M}$  a 500 nm de la membrana y estimaron que podría alcanzar los  $10 \mu\text{M}$  en el espacio submembranal. Por otra parte, Ammala et al. [72] midieron una concentración promedio citosólica menor que  $2 \mu\text{M}$  en respuesta a despolarizaciones cortas de 20 ms.

Podemos decir que las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  estimadas a través de este modelo concuerdan con las mediciones experimentales. Sin embargo, es importante mencionar que los estudios experimentales mencionados fueron realizados en presencia de bajas concentraciones de amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  exógenos. Por ejemplo, Bokvist et al.[137] utilizaron 0.01 mM de EGTA junto con  $0.2 \mu\text{M}$  de Fura-2, mientras que Theler et al.[199] emplearon únicamente  $0.5 \mu\text{M}$  de Fura-2. Esto explicaría los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ligeramente mayores medidos experimentalmente en comparación con los estimados por medio de las simulaciones.

### 5.5.5. Concentraciones de $\text{Ca}^{2+}$ máximas producidas por las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ aisladas

Se simuló el efecto de bloqueadores específicos de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  con la finalidad de estimar la contribución de cada una de las corrientes a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio. Esto se llevó a cabo haciendo la conductancia máxima correspondiente ( $g_X$  en las Eqs. 5.5, 5.2 y 5.5) igual a 0 nS/pF. En la Fig. 5.11 se muestran las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  máximas producidas por cada una de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones de alta amortiguación (10 mM EGTA) durante experimentos de fijación de voltaje. Para el caso de 245 fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanzó valores máximos de 0.7, 0.37 y  $0.42 \mu\text{M}$  para las corrientes L, T y P/Q respectivamente. Del mismo modo, para el caso de 490 fuentes, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  máxima alcanzó valores máximos de 0.36, 0.19 y  $0.22 \mu\text{M}$  para las corrientes tipo L, T y P/Q respectivamente.



**Figura 5.11:** Concentraciones máximas debidas a las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo L (A), tipo T (B) y tipo P/Q (C) aisladas durante experimentos de fijación de voltaje para los casos de 245 (líneas sólidas) y 490 (líneas punteadas) fuentes puntuales de  $Ca^{2+}$ .

## 5.6. Efecto de las corrientes tipo T y P/Q en la corriente tipo L

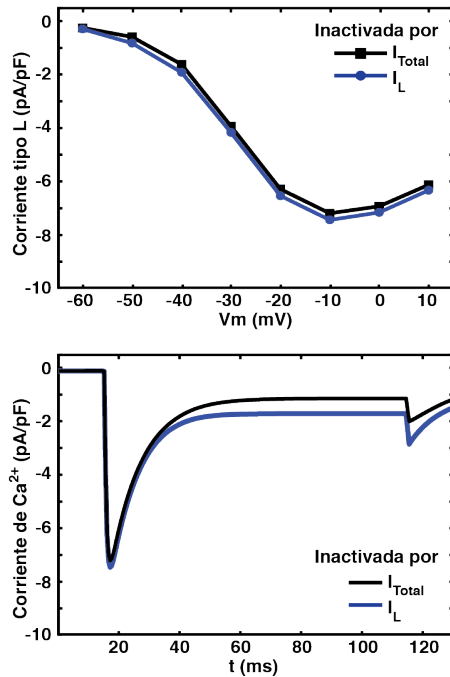
Experimentalmente, la corriente de  $Ca^{2+}$  tipo L es aislada al sustraer el registro de corriente obtenido después de agregar isradipina (el bloqueador específico de la corriente tipo L) del registro de corriente obtenida antes de agregar el bloqueador, es decir, la corriente total de  $Ca^{2+}$ . Esto significa que la inactivación de la corriente tipo L dependiente del  $Ca^{2+}$  se debe al incremento en  $[Ca^{2+}]_{MD}$  producido por la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los tres canales (tipo L, T y P/Q).

El efecto de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales tipo T y P/Q en la inactivación de la corriente tipo L se muestra en la Fig. 5.12. Se puede observar que cuando  $I_T$  e  $I_{PQ}$  son bloqueadas completamente, el pico de  $I_L$  incrementó ligeramente de -7.2 a -7.4 pA/pF para un pulso de voltaje a -10 mV. Un incremento similar se obtuvo para todos los pulsos de voltaje (en el rango de -60 a 10 mV). Sin embargo, el efecto principal de la entrada de  $Ca^{2+}$  debida a los canales T y P/Q en la corriente tipo L se observó cerca del final del pulso de voltaje (Fig. 5.12) en donde  $I_L$  disminuyó de -1.7 pA/pF (para la corriente tipo L aislada) a -1.13 pA/pF cuando se permitió el flujo de  $Ca^{2+}$  a través de los canales tipo T y P/Q.

## 5.7. Conclusiones

De los resultados obtenidos de las simulaciones de las corrientes de  $Ca^{2+}$  de la célula  $\beta$  humana en condiciones de fijación de voltaje se puede concluir lo siguiente:

- Se caracterizaron las corrientes macroscópicas de  $Ca^{2+}$  de la célula  $\beta$  humana



**Figura 5.12:** Efecto de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a las corrientes tipo T y P/Q en la inactivación de la corriente tipo L. **A.** Comparación de las curvas I-V de la corriente tipo L inactivada por la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  (líneas negra sólidas) y por la misma corriente tipo L (líneas azules). **B.** Influencia de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a las corrientes tipo T y P/Q en el curso temporal de la corriente tipo L en respuesta a un pulso despolarizante a 0 mV.

considerando su dependencia tanto en el potencial de membrana como en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

- Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  reproducen razonablemente los correspondientes registros experimentales.
- De acuerdo con el modelo, a pesar de la alta concentración de EGTA comúnmente usada en los experimentos de fijación de voltaje (10 mM), las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  producen microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto en la dirección radial como tangencial en la vecindad de los canales.
- Los microdominios formados son perceptibles incluso a una distancia de  $\sim 450$  nm en ambas direcciones.
- Debido a las condiciones de alta amortiguación, no se observó la formación de dominios submembranales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Es decir, los microdominios formados en la vecindad de una fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  no se traslapan con los microdominios formados por fuentes vecinas.
- Como resultado de las simulaciones, se estima que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  máxima alcanzada durante experimentos de fijación de voltaje está en el rango

de 0.69 a 1.36  $\mu\text{M}$ , medida a 30 nm de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a un pulso de voltaje a 0 mV, lo que concuerda con las mediciones experimentales.

- Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, T y P/Q aisladas producen un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio en el rango de 0.36-0.7  $\mu\text{M}$ , 0.19-0.37  $\mu\text{M}$  y 0.22-0.42  $\mu\text{M}$  respectivamente.
- El principal efecto del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales tipo T y P/Q en el proceso de inactivación de la corriente tipo L ocurre en la parte final del pulso despolarizante y se ve reflejado en un mayor nivel de inactivación.
- La magnitud y el curso temporal de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio intracelular son afectados por la distribución de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la superficie de la membrana celular.





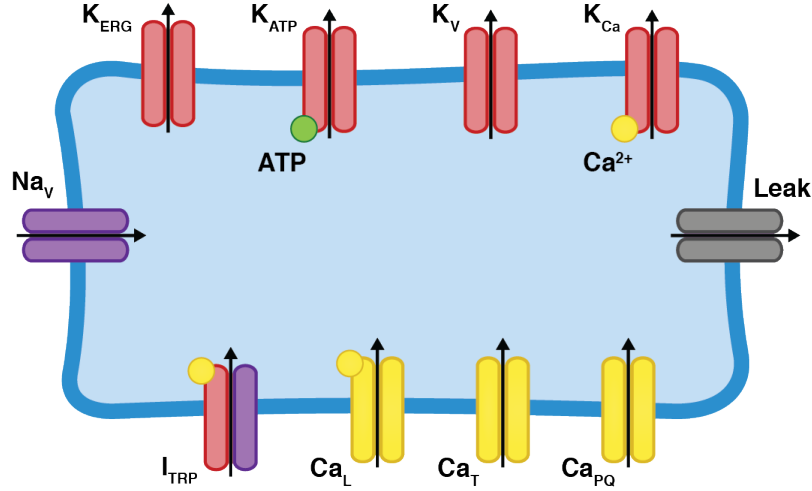
# Capítulo 6

## Simulación de la actividad eléctrica de la célula $\beta$ humana aislada en condiciones fisiológicas

Con la finalidad de simular la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en condiciones fisiológicas, se desarrolló un modelo de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana, basado en la representación de la membrana celular como un circuito eléctrico equivalente (ver Sección 2.5). En él se incluyeron, además de los modelos de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, T y P/Q obtenidos en las Secciones 5.1, 5.2 y 5.3, corrientes de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  (caracterizadas en su mayoría por Pedersen[53]), así como una corriente no específica (TRP). Como en el caso de las simulaciones de los experimentos de fijación de voltaje, el modelo de la actividad eléctrica fue acoplado con el modelo tridimensional de la célula  $\beta$  humana descrito en la Sección 4.5 con el objetivo de simular las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  producidas en la vecindad de la membrana celular en respuesta a la actividad eléctrica en forma de disparo de potenciales de acción. Se evaluó el efecto de amortiguadores endógenos tanto fijos como móviles en la dinámica y amplitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  producidos por los potenciales de acción. En general, en este capítulo se propone una nueva metodología que permite incorporar los aspectos espaciales a los modelos de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$ .

### 6.1. Modelo de la célula completa

La actividad eléctrica, es decir, los cambios en el potencial de membrana, se obtienen al resolver la ecuación diferencial (Eq. 2.8) resultante del análisis del circuito equivalente descrito en la Sección 2.5:



**Figura 6.1:** Diagrama del modelo de actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana. Se incluyen canales de  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_v$ ),  $\text{K}^+$  ( $K_v$ ,  $K_{\text{ERG}}$ ,  $K_{\text{ATP}}$ ,  $K_{\text{Ca}}$ ) y  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_L$ ,  $\text{Ca}_T$ ,  $\text{Ca}_{\text{PQ}}$ ), además de una corriente de fuga (Leak) y una corriente no específica a través de los canales receptores del potencial transitorio ( $I_{\text{TRP}}$ ).

$$\frac{dV_m}{dt} = -\frac{1}{C_m} \sum_X I_X, \quad (2.8)$$

una vez que las corrientes iónicas ( $I_X$ ) consideradas han sido caracterizadas, esto es, se han obtenido las expresiones y parámetros necesarios para reproducir cada corriente. Este modelo incluye en total diez corrientes iónicas: la corriente de  $\text{K}^+$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$  de alta conductancia ( $I_{\text{KCa}}$ ), la corriente de  $\text{K}^+$  del tipo rectificador tardío ( $I_{\text{Kv}}$ ), una corriente de  $\text{Na}^+$  dependiente del voltaje ( $I_{\text{Na}}$ ), la corriente de  $\text{K}^+$  sensible al ATP ( $I_{\text{KATP}}$ ), la corriente de  $\text{K}^+$  tipo HERG (human ether a-go-go related gene,  $I_{\text{KERG}}$ ), tres corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_L$ ,  $I_T$  e  $I_{\text{PQ}}$ ), una corriente no específica a través de canales TRP (receptores de potencial transitorio,  $I_{\text{TRP}}$ ), y una corriente de fuga ( $I_{\text{leak}}$ ). De estas,  $I_{\text{Na}}$ ,  $I_{\text{Kv}}$ ,  $I_{\text{KERG}}$  e  $I_{\text{KATP}}$  fueron adoptadas del modelo de Pedersen[53], mientras que las corrientes  $I_{\text{KCa}}$  e  $I_{\text{TRP}}$  fueron modeladas como dependientes de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio. Un esquema del modelo de la actividad eléctrica se muestra en la Fig. 6.1.

Al considerar estas corrientes, la Eq. 2.8 queda como:

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{1}{C_m} (I_{\text{KCa}} + I_{\text{Kv}} + I_{\text{Na}} + I_{\text{KATP}} + I_L + I_T + I_{\text{PQ}} + I_{\text{TRP}} + I_{\text{leak}} + I_{\text{KERG}}). \quad (6.1)$$

A continuación se describen brevemente cada una de las corrientes consideradas. Los parámetros del modelo de la actividad eléctrica se pueden consultar en la Tabla 3. Para una descripción más detallada de las características de las corrientes iónicas presentes en la célula  $\beta$  humana se recomienda consultar otros trabajos al respecto[10, 34, 44, 49].

### 6.1.1. Corriente de $K^+$ activada por $Ca^{2+}$ ( $I_{KCa}$ )

La corriente  $I_{KCa}$  es producida por el flujo de iones a través de los canales BK de alta conductancia, cuya activación depende del incremento del  $Ca^{2+}$  intracelular. Es crítica para la repolarización de los potenciales de acción en la célula  $\beta$  humana[10].

A diferencia de Pedersen[53], quien modeló la dependencia del  $Ca^{2+}$  de esta corriente mediante el uso de un factor de escalamiento que permite hacer la activación de esta corriente proporcional a la corriente total de  $Ca^{2+}$ , en este modelo la activación es determinada directamente por la concentración de  $Ca^{2+}$  en el microdominio mediante una ecuación de Hill con exponente 2:

$$m_{KCa} = \frac{[Ca^{2+}]_{MD}^2}{[Ca^{2+}]_{MD}^2 + K_{KCa}^2}, \quad (6.2)$$

en donde  $K_{KCa}$  representa la constante de disociación, que se interpreta como la concentración de  $Ca^{2+}$  a la que el 50% de los canales  $KCa$  se encuentran activos. Se utilizó un valor para este parámetro de  $K_{KCa} = 1.5 \mu M$ , como fue estimado por Fridlyand et al.[49]. Por su parte, el valor de la conductancia máxima ( $g_{KCa}$ ) fue estimado para reproducir la magnitud de la corriente al pico observada experimentalmente, tomando un valor de 1.5 nS/pF, que es ligeramente mayor a la conductancia máxima estimada de los experimentos hecho por Braun et al.[20] ( $\sim 0.4$  nS/pF). Un valor mayor ( $\sim 2.5$  nS/pF) fue estimado por Fridlyand et al.[49].

Al igual que Pedersen[53], se asumió que  $I_{KCa}$  no inactiva, siendo entonces esta corriente simulada como:

$$I_{KCa} = g_{KCa} m_{KCa} (V_m - V_K). \quad (6.3)$$

El valor utilizado para el potencial de equilibrio del  $K^+$  ( $V_K$ ) fue de -75 mV[53, 54].

### 6.1.2. Corriente de $K^+$ del tipo rectificador tardío ( $I_{Kv}$ )

La corriente  $I_{Kv}$  es completamente dependiente del voltaje y se cree que participa, aunque en menor medida que la corriente  $I_{KCa}$ , en la repolarización de los potenciales

de acción[10]. En este modelo se emplearon sin modificación las expresiones que caracterizan a  $I_{Kv}$  obtenidas por Pedersen[53]. Es decir, esta corriente fue modelada como:

$$I_{Kv} = g_{Kv}m_{Kv}(V_m - V_K), \quad (6.4)$$

con la variable de activación  $m_{Kv}$  dada por la ecuación diferencial 4.2a (ver Sección 4.3), y una conductancia máxima ( $g_{Kv}$ ) de 1 nS/pF. La función de activación en estado estacionario  $m_{Kv,\infty}$  está dada por una sigmoide de Boltzmann (Eq. 4.3a) con parámetros  $V_{mKv} = 0$  mV y  $n_{mKv} = -10$  mV. Por su parte, la función que determina el valor de la constante de tiempo de activación ( $\tau_{mKv}$ ) en función del voltaje es:

$$\tau_{mKv} = \begin{cases} \tau_{mKv,0} + 30 \text{ ms} & : V_m < 26.6 \text{ mV} \\ \tau_{mKv,0} + 10 \text{ ms} \cdot \exp\left(\frac{-20 \text{ mV} - V_m}{6 \text{ mV}}\right) & : V_m \geq 26.6 \text{ mV} \end{cases} \quad (6.5)$$

en donde el parámetro  $\tau_{mKv,0}$  toma el valor de 2 ms[53]. Debido a que la inactivación de la corriente  $I_{Kv}$  es muy lenta en comparación con la dinámica de activación[20, 53], se asumió que esta corriente no inactiva, es decir, la función de inactivación  $h_{Kv}$  tiene un valor constante igual a 1. Una descripción más completa se puede encontrar en el trabajo original de Pedersen[53].

### 6.1.3. Corriente de $\text{Na}^+$ dependiente del voltaje ( $I_{Na}$ )

La corriente de  $\text{Na}^+$  es completamente dependiente del voltaje y participa en el disparo inicial del potencial de acción[10]. Ya que tiene una activación rápida[20], es razonable asumir que activa instantáneamente (es decir,  $m_{Na} = m_{\infty,Na}$ ). Fue modelada por Pedersen[53] como:

$$I_{Na} = g_{Na}m_{\infty,Na}h_{Na}(V_m - V_{Na}), \quad (6.6)$$

en donde  $m_{\infty,Na}$  es la función de activación en estado estacionario (Eq. 4.3a), caracterizada por los parámetros  $V_{mNa} = -18$  mV y  $n_{mNa} = -5$  mV;  $h_{Na}$  es la variable de inactivación dependiente del voltaje dada por la Eq. 4.2b en la que la constante de tiempo de inactivación ( $\tau_{hNa}$ ) toma el valor de 2 ms. El potencial de inversión para el  $\text{Na}^+$  ( $V_{Na}$ ) fue estimado en 100 mV y la conductancia máxima,  $g_{Na}$ , tiene un valor de 0.4 nS/pF (ver ref. [53]).

### 6.1.4. Corriente de $\text{K}^+$ sensible al ATP ( $I_{KATP}$ )

Los canales  $K_{ATP}$  son de suma importancia en la célula  $\beta$  humana, al igual que en la célula de roedor, ya que participan en el control de la actividad eléctrica al

acoplar el metabolismo celular con los cambios en la conductancia de la membrana plasmática. Ya que en este caso se busca simular el comportamiento de la célula  $\beta$  humana en estado estacionario, lo que podría entenderse como la actividad eléctrica producida a un nivel de glucosa constante, las expresiones utilizadas por Pedersen[53] para simular la corriente de  $K^+$  sensible al ATP fueron usadas sin modificación alguna. Esto es:

$$I_{KATP} = g_{KATP}(V_m - V_K). \quad (6.7)$$

En la ecuación anterior, la conductancia máxima de los canales  $K_{ATP}$  ( $g_{KATP}$ ), toma el valor de 0.015 nS/pF.

### 6.1.5. Corriente no específica dependiente del $Ca^{2+}$ ( $I_{TRP}$ )

Rorsman y Braun[10] han propuesto que los canales inespecíficos TRP podrían generar una corriente despolarizante con un papel importante en la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana, tal y como se ha propuesto para las células  $\beta$  de roedor[34]. Ya que la activación de los canales TRP depende del  $Ca^{2+}$  intracelular[211, 219, 220], se empleó una ecuación de Hill con exponente 2 para describir la proporción de canales TRP abiertos. Esto es:

$$P_{o,TRP} = \frac{1}{1 + \left( \frac{K_{d,TRP}}{[Ca^{2+}]_{MD}} \right)^2}. \quad (6.8)$$

El parámetro  $K_{d,TRP}$  indica la concentración de  $Ca^{2+}$  a la que el 50% de canales TRP se encuentran en estado activo, y toma un valor de 1.7  $\mu$ M [211].

Se estima que el potencial de inversión para esta corriente no específica ( $V_{TRP}$ ) se encuentra alrededor de los 0 mV[220], y que tienen una conductancia unitaria  $\overline{g_{TRP}}$  de 25 pS. Asumiendo que la célula cuenta con  $n_{TRP}$  canales TRP, la expresión que describe a esta corriente es:

$$I_{TRP} = \overline{g_{TRP}} n_{TRP} P_{o,TRP} (V_m - V_{TRP}). \quad (6.9)$$

Hasta donde se sabe, el número de canales TRP en la célula  $\beta$  humana es desconocido, por lo que se ha asumido que cuenta con 100 canales, resultando en una conductancia máxima para la corriente macroscópica de 0.25 nS/pF.

### 6.1.6. Corriente de K<sup>+</sup> tipo HERG ( $I_{ERG}$ )

Canales de K<sup>+</sup> voltaje dependiente tipo HERG (*human ether a-go-go related gene*) han sido encontrados y caracterizados en células  $\beta$  humanas[10, 62, 63]. Se piensa que los canales HERG participan en la repolarización de los potenciales de acción, aunque con una importancia menor[10]. Sin embargo, se ha observado que al bloquear experimentalmente estos canales aumentan tanto la frecuencia de disparo de los potenciales de acción como la secreción de insulina[63].

La corriente de K<sup>+</sup> tipo HERG ( $I_{ERG}$ ) se simuló mediante la expresión dada por Pedersen[53]:

$$I_{ERG} = g_{ERG}m_{ERG}h_{ERG}(V_m - V_K), \quad (6.10)$$

en donde  $m_{ERG}$  y  $h_{ERG}$  son las variables de activación e inactivación correspondientes, determinadas por las ecuaciones 4.2a y 4.2b, con constantes de tiempo de activación ( $\tau_{m,ERG}$ ) e inactivación ( $\tau_{h,ERG}$ ) de 50 ms y 100 ms respectivamente[53, 63]. Los parámetros de las funciones de activación e inactivación estacionarias ( $m_{ERG,\infty}$  y  $h_{ERG,\infty}$ ) son  $V_{m,ERG} = -30$  mV,  $n_{m,ERG} = -10$  mV,  $V_{h,ERG} = -42$  mV y  $n_{h,ERG} = 17.5$  mV, con una conductancia máxima de  $g_{ERG} = 0.2$  nS/pF[53].

### 6.1.7. Corriente de fuga ( $I_{Leak}$ )

La corriente de fuga representa a todas las corrientes que no pueden ser modeladas explícitamente, como pueden ser las corrientes de Cl<sup>-</sup>, o alguna corriente no selectiva que no ha sido caracterizada. Para modelar esta corriente se utilizó la expresión:

$$I_{Leak} = g_{Leak}(V_m - V_{Leak}), \quad (6.11)$$

en donde la conductancia máxima,  $g_{Leak}$ , toma el valor estimado de 0.005 nS/pF y el potencial de equilibrio de la corriente de fuga,  $V_{Leak}$ , de -30 mV[53].

### 6.1.8. Otras corrientes

Recientemente, Riz y Pedersen[54] investigaron el papel de la corriente de K<sup>+</sup> activada por Ca<sup>2+</sup> de baja conductancia ( $I_{SK}$ ) en la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana, encontrando que esta no tiene un papel relevante en el disparo de potenciales de acción, aunque sus resultados sugieren que puede ser importante para la actividad eléctrica en salvas. Asimismo, en otro trabajo reciente, Riz y Pedersen caracterizaron la corriente producida por los canales de K<sup>+</sup> con rectificación interna ( $I_{Kir}$ ) expresados en la célula  $\beta$  humana. Con base en un estudio de simulación han

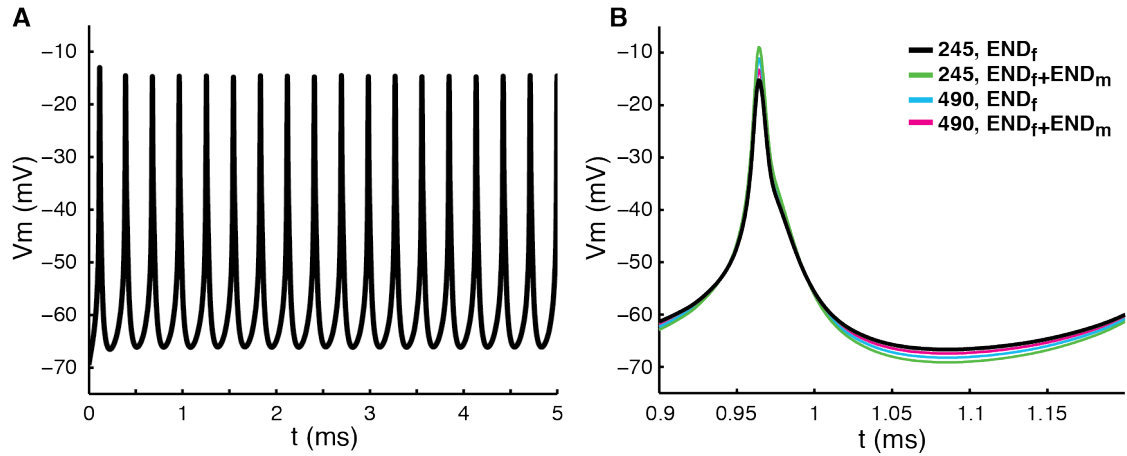
propuesto que esta corriente participa en el control del intervalo entre potenciales de acción, aunque al parecer no es determinante para la producción de actividad eléctrica. Es importante mencionar que las corrientes  $I_{SK}$  e  $I_{Kir}$  no fueron consideradas en este modelo.

## 6.2. Actividad eléctrica en forma de disparo de potenciales de acción

Se llevaron a cabo simulaciones de la actividad eléctrica en forma de potenciales de acción para los 2 casos considerados en el Capítulo 5 (245 y 490 fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Se evaluaron dos diferentes configuraciones de amortiguadores endógenos: el primer caso en el que se incluyeron únicamente 310  $\mu\text{M}$  de un amortiguador endógeno inmóvil y un segundo caso en el que además se agregaron 100  $\mu\text{M}$  de un amortiguador endógeno móvil. Las concentraciones de los amortiguadores endógenos fueron estimadas por Klingauf y Neher[185] en su estudio sobre la difusión amortiguada de  $\text{Ca}^{2+}$  en células neuroendócrinas.

Un registro típico de la actividad eléctrica simulada con el modelo descrito en la sección anterior se muestra en la Fig. 6.2. Este consiste en disparos de potenciales de acción con una frecuencia de 3.6 Hz, que concuerda con las observaciones experimentales[53, 213]. Por otro lado, se observó que la amplitud de los potenciales de acción depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio, como era de esperarse debido principalmente a la influencia de esta en la inactivación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Esto se muestra en la Fig. 6.2B, en la que se puede observar que para el caso de 245 fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de un amortiguador endógeno fijo únicamente ( $[\text{END}_f]$ ), en el que  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}}$  alcanzó un valor máximo de 3.24  $\mu\text{M}$  (ver Fig. 6.9), el potencial de acción tuvo un mínimo de -66.7 mV y un máximo de -15.2 mV. En contraste, para el caso de 490 fuentes puntuales en presencia de el amortiguador endógeno fijo, además del móvil ( $[\text{END}_m]$ ), en el que  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{MD}}$  llegó a un máximo de 1.43  $\mu\text{M}$ , el potencial de acción tuvo -69 mV como valor mínimo y -9.6 como valor máximo (ver Fig. 6.9). Independientemente de esto, el modelo reproduce satisfactoriamente la amplitud de los potenciales de acción comúnmente observados experimentalmente[10, 20, 54].

El patrón de actividad eléctrica es formado debido a la interacción entre los diferentes canales iónicos considerados en el modelo (Fig. 6.1). Experimentalmente es extremadamente difícil, si no imposible, observar cómo las diferentes corrientes iónicas participan en la formación de los potenciales de acción, ya que por lo regular, los estudios electrofisiológicos experimentales involucran el uso de bloqueadores específi-

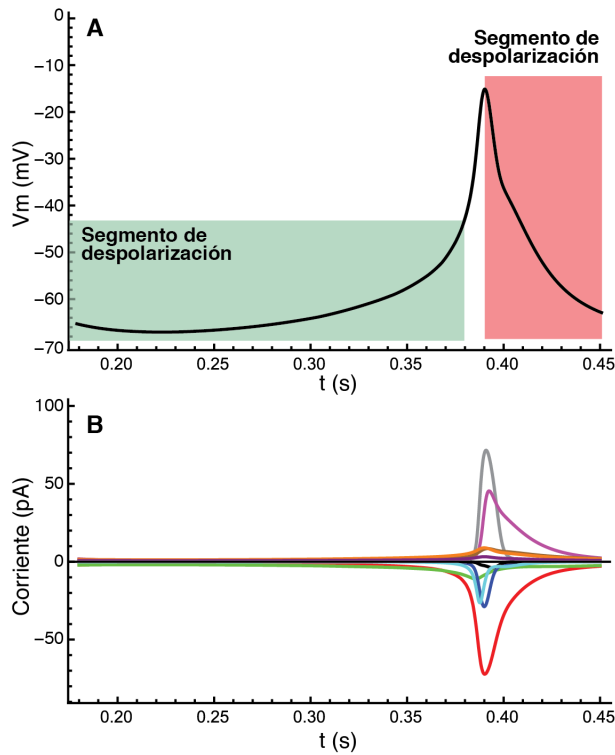


**Figura 6.2:** **A.** Simulación de la actividad eléctrica en forma de potenciales de acción para el caso de 245 fuentes puntuales en presencia de  $310 \mu\text{M}$  de un amortiguador endógeno inmóvil. **B.** Acercamiento a un potencial de acción para los 4 casos simulados. Se observa la dependencia de la amplitud del potencial de acción en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio.

cos de los diferentes canales iónicos (para una revisión al respecto ver ref. [221]), lo que conlleva una alteración al funcionamiento de los demás canales debida al efecto del bloqueo de los canales en el potencial de membrana. Por otro lado, los modelos matemáticos, aunque nos permiten analizar cualitativamente la interacción entre todos los mecanismos de transporte iónico que participan en la formación del patrón de actividad eléctrica, no es posible realizar un análisis cuantitativo de la contribución de estos mecanismos directamente.

Por lo anterior, se usó el método del análisis del potencial director (*Lead Potential Analysis, LPA*), propuesto por Cha et al[214], para obtener una descripción cuantitativa de la contribución de las diferentes corrientes en la formación de los potenciales de acción. El análisis hecho al modelo aquí propuesto es similar al realizado al modelo de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana de Riz y Pedersen[54] en el **Artículo 5**[215] derivado de este trabajo. El método LPA fue descrito con mayor detalle en la Sección 4.8.2.



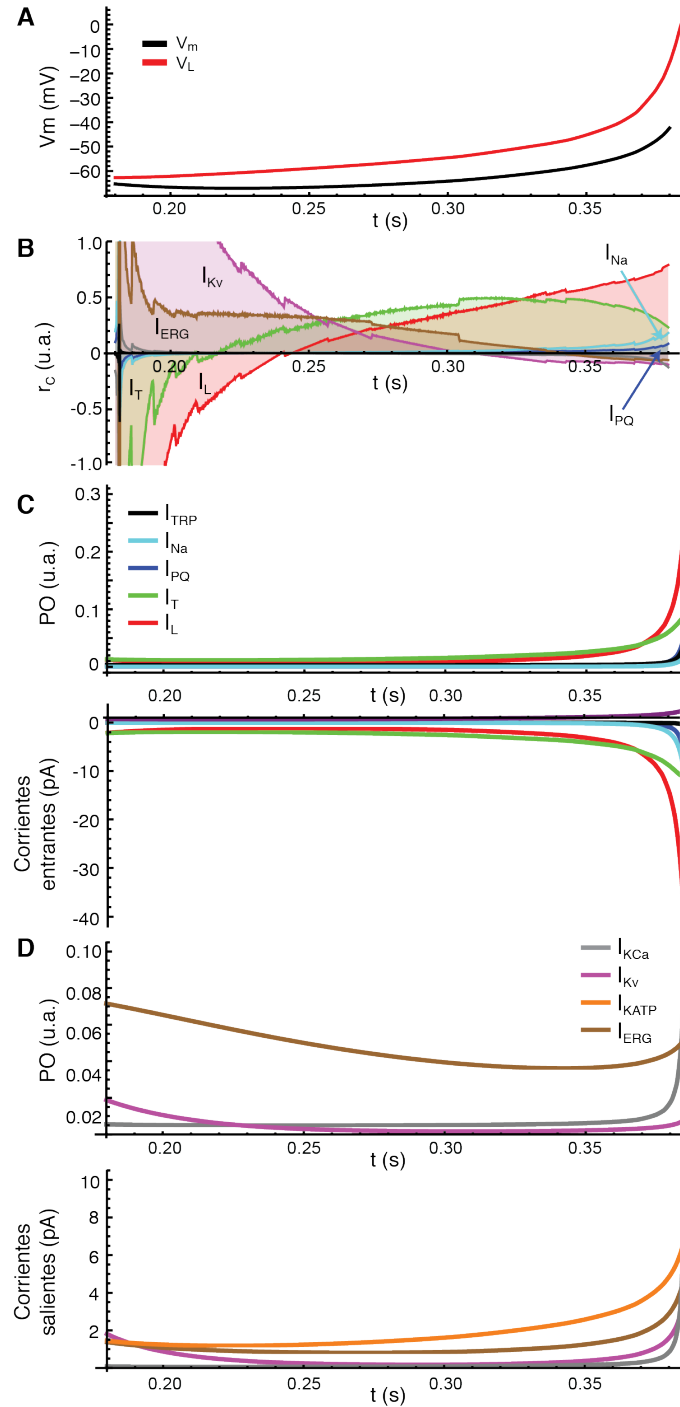


**Figura 6.3:** **A.** Segmentos de despolarización (verde) y repolarización (rojo) analizados con el método LPA. **B.** Corrientes que participan en la formación del potencial de acción.

### 6.2.1. Contribución de las corrientes iónicas a la formación de los potenciales de acción

En la Fig. 6.3 se muestra un potencial de acción junto con las corrientes entrantes y salientes que participan en su formación. Se analizaron por separado los segmentos de despolarización y repolarización del potencial de acción, como se muestra en la Fig. 6.3A. El segmento de despolarización comprende los cambios en  $V_m$  en el intervalo de tiempo que va desde  $t = 0.18$  s a  $t = 0.38$  s, con una duración de 200 ms. Por su parte, el segmento de repolarización analizado tiene una duración de 60 ms, al comprender los cambios en  $V_m$  en el intervalo de tiempo entre  $t = 0.39$  s y  $t = 0.45$  s.

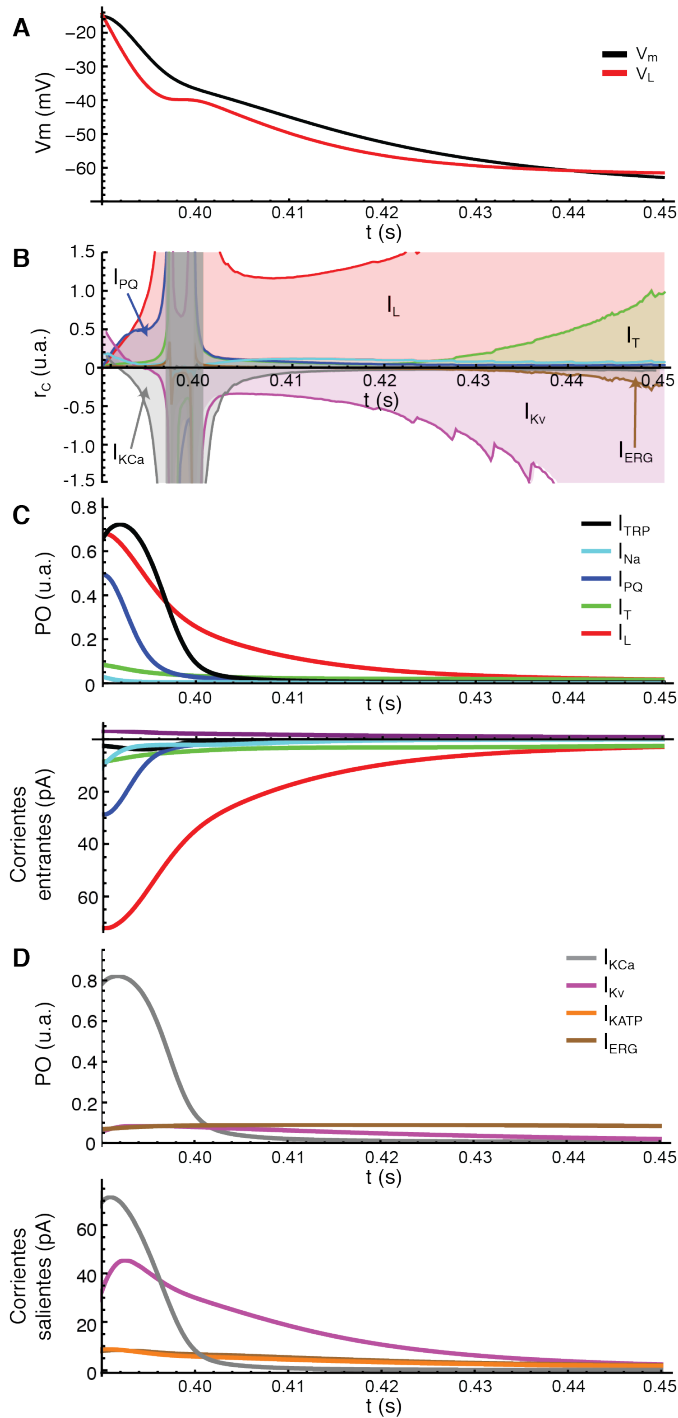
El potencial de membrana y el potencial director durante el segmento de despolarización se muestran en la Fig. 6.4A, acompañados de las corrientes iónicas entrantes (Fig. 6.4C) y salientes (Fig. 6.4D), y sus respectivas probabilidades de apertura ( $PO$ ). La contribución relativa  $r_C$  de cada corriente al segmento de despolarización se muestran en la Fig. 6.4B, en donde se puede observar que en la primera mitad del segmento de despolarización los cambios en  $V_m$  están determinados principalmente



**Figura 6.4:** Análisis del segmento de despolarización mediante el método LPA. **A.** Potencial de membrana ( $V_m$ , negro) y el potencial director ( $V_L$ , rojo). **B.** Contribución relativa ( $r_C$ ) de cada corriente al segmento de despolarización del potencial de acción. **C.** Probabilidad de apertura ( $PO$ , arriba) y trazos de las corrientes entrantes (abajo). **D.** Probabilidad de apertura ( $PO$ , arriba) y trazos de las corrientes salientes (abajo).

por las corrientes  $I_{K_v}$  e  $I_L$ , aunque también participan de manera importante las corrientes  $I_T$  e  $I_{ERG}$ . Ya que la contribución relativa ( $r_C$ ) de las corrientes  $I_{K_v}$  e  $I_{ERG}$  es positiva (Fig. 6.4B), y que su probabilidad de apertura disminuye (Fig. 6.4D), ambas corrientes tienen un efecto positivo en la despolarización debido al cierre de ambas poblaciones de canales ( $K_v$  y  $K_{ERG}$ ). Por otro lado, la contribución de las corrientes  $I_T$  e  $I_L$  es negativa ( $r_C < 0$ , Fig. 6.4B), lo que indica que ambas corrientes se oponen a la despolarización inicial, al menos durante la primera mitad del segmento de despolarización. Esto se explica por la ligera pero importante disminución en la amplitud de ambas corrientes (Fig. 6.4C) generada por la disminución de la probabilidad de apertura de ambas poblaciones de canales. En el intervalo de tiempo que va desde  $t = 0.21$  a  $0.24$  s, la contribución relativa tanto de  $I_T$  como de  $I_L$  cambia de negativa a positiva, ejerciendo ahora un efecto positivo para la despolarización del potencial de membrana debido a que la magnitud de las corrientes comienza a aumentar (así como la probabilidad de apertura de ambas poblaciones de canales), que, acompañados del cierre de los canales de  $K^+$  ( $K_v$  y  $K_{ERG}$ ) generan una despolarización mayor. En la fase final del segmento de despolarización ( $t > 0.30$  s) la importancia de las corrientes de  $K^+$  se vuelve menor, mientras que las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo L y T se convierten en las principales causantes del disparo del potencial de acción, aunque se observa también un aumento en la proporción de canales de  $Na^+$  y de  $Ca^{2+}$  tipo P/Q, que se ve reflejado en un aumento en la magnitud de ambas corrientes. Ya que  $r_C > 0$  tanto para  $I_{Na}$  como  $I_{PQ}$ , se puede concluir que participan en la fase final del disparo del potencial de acción, contribuyendo a alcanzar el pico máximo de  $V_m$ . Al mismo tiempo,  $I_{KCa}$  (junto con  $I_{K_v}$  e  $I_{ERG}$ ) comienza a ejercer un efecto opuesto a la despolarización ( $r_C < 0$ ) debido a que su magnitud se incrementa al aumentar la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$ .

El potencial de membrana y el potencial director durante el segmento de repolarización, así como las corrientes iónicas, la probabilidad de apertura y la contribución relativa de cada corriente se muestran en la Fig. 6.5. En los primeros instantes de este segmento ( $t > 0.39$  s), las corrientes  $I_L$  e  $I_{PQ}$  contribuyen positivamente a la repolarización ( $r_C > 0$ , Fig. 6.5B), ya que han comenzado a inactivar, lo que se ve reflejado en la disminución de su magnitud (Fig. 6.5C). Simultáneamente, las corrientes  $I_{K_v}$  e  $I_{KCa}$  se oponen a la repolarización ( $r_C < 0$ ) ya que la proporción de canales abiertos comienza a decaer (Fig. 6.5D), lo que se ve reflejado en la disminución de la magnitud de estas corrientes. En el intervalo que va desde  $t = 0.38$  a  $0.40$  s, es imposible determinar la contribución de las corrientes mediante el método LPA (ver Fig. 6.5B) debido a que la pendiente ( $dV_L/dt$ ) del potencial director (ver Fig. 6.5A) se aproxima a 0, y por lo tanto la ecuación que determina a  $r_C$  (Eq. 4.14 en la Sección 4.8.2) no está definida en este intervalo de tiempo. Por otro lado, para

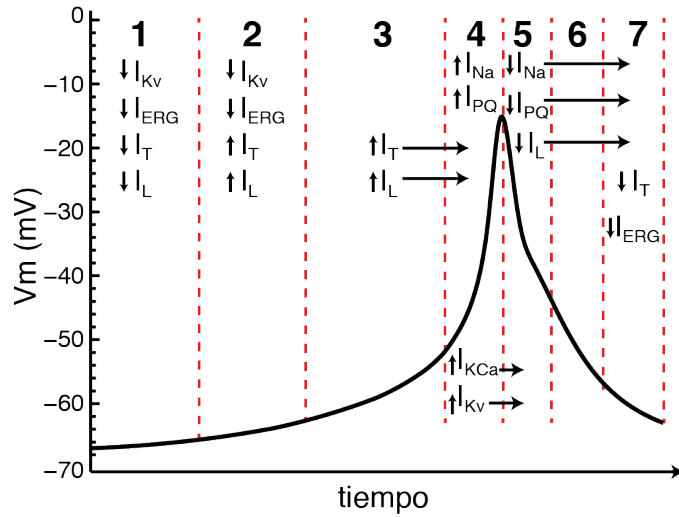


**Figura 6.5:** Análisis del segmento de repolarización mediante el método LPA. **A.** Potencial de membrana ( $V_m$ , negro) y el potencial director ( $V_L$ , rojo). **B.** Contribución relativa ( $r_C$ ) de cada corriente al segmento de despolarización del potencial de acción. **C.** Probabilidad de apertura ( $PO$ , arriba) y trazos de las corrientes entrantes (abajo). **D.** Probabilidad de apertura ( $PO$ , arriba) y trazos de las corrientes salientes (abajo).

$t > 0.4$  s se puede observar claramente que la repolarización es dominada, en primer lugar, por el cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y P/Q, así como por el cierre de los canales  $\text{Na}^+$  (ver que  $r_C > 0$  para estas corrientes en la Fig. 6.5), acompañado por el cierre de los canales de  $\text{K}^+$  ( $K_v$  y  $K_{Ca}$ ), que se ve reflejado en la contribución relativa negativa para estas corrientes ( $r_C < 0$ ). La magnitud de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T, que durante la mayor parte del segmento de repolarización disminuye lentamente, comienza a cobrar importancia conforme la magnitud de las demás corrientes ha disminuído lo suficiente. Es claro que al final del segmento de repolarización el comportamiento de  $V_m$  es determinado principalmente por el cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y T ( $r_C > 0$ ), a pesar de la contribución negativa de los canales de  $\text{K}^+$  tipo ERG y  $K_v$  ( $r_C < 0$ ).

### 6.2.2. Modelo cualitativo del disparo del potencial de acción

Los resultados del análisis realizado en la sección anterior hace posible construir un modelo cualitativo que describe la participación de cada corriente en la formación del potencial de acción. Un diagrama de dicho modelo se muestra en la Fig. 6.6, en la que se puede observar que el cierre de los canales  $K_v$  y  $K_{ERG}$  genera en mayor medida la despolarización inicial al mismo tiempo que las corrientes  $I_L$  e  $I_T$  decrecen ligéramente (**1**). Debido a la despolarización alcanzada, las corrientes  $I_L$  e  $I_T$  comienzan a aumentar en magnitud, lo que junto con el cierre de los canales  $K_v$  y  $K_{ERG}$  genera una despolarización mayor (**2**). Al dejar de influir las corrientes  $I_{Kv}$  e  $I_{ERG}$ , las corrientes  $I_L$  e  $I_T$  son responsables casi en su totalidad de la despolarización (**3**), lo que provoca la eventual activación de las corrientes de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q (**4**). Al mismo tiempo, debido a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, la corriente  $I_{KCa}$  comienza a incrementarse junto con las corrientes  $I_{Kv}$  e  $I_{ERG}$  que juntas limitan el disparo del potencial de acción (**4**) y dan inicio a la repolarización del potencial de membrana. El efecto repolarizante del cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y P/Q y de los canales de  $\text{Na}^+$  supera el efecto despolarizante que provoca la disminución en la magnitud de las corrientes de  $\text{K}^+$ , provocando una repolarización mayor (**5 y 6**). Finalmente, una vez que las corrientes  $I_L$ ,  $I_{PQ}$  e  $I_{Na}$ , han disminuído lo suficiente, el cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T y de los canales de  $\text{K}^+$  tipo ERG cobran importancia para la repolarización (**7**).



**Figura 6.6:** Modelo cualitativo de la participación de las corrientes iónicas en la formación del potencial de acción. Las flechas verticales indican si la corriente aumenta o disminuye. Las flechas horizontales indican que la corriente sigue participando en la fase señalada.

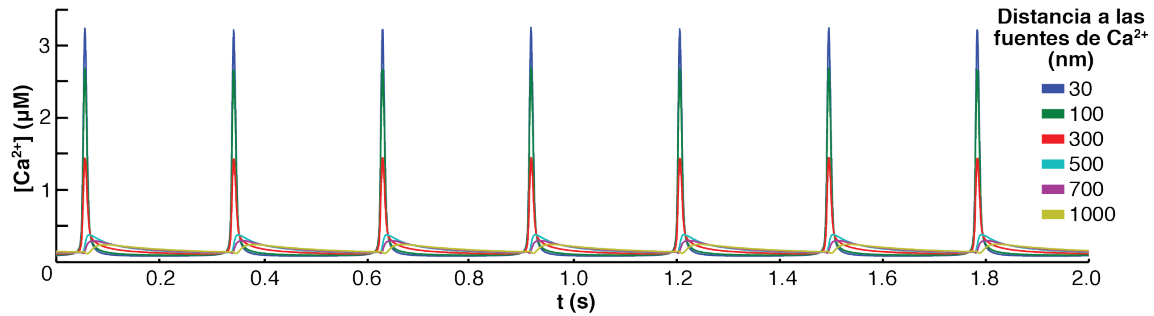
### 6.3. Dinámica del $Ca^{2+}$ intracelular producida por el disparo de potenciales de acción

La actividad eléctrica producida por el modelo descrito y analizado en las secciones anteriores, da lugar a transitorios de  $Ca^{2+}$  debidos al flujo de  $Ca^{2+}$  a través de los canales iónicos localizados en las fuentes puntuales en el modelo de la difusión amortiguada de  $Ca^{2+}$ . En esta sección se analizan estos transitorios a diferentes distancias de las fuentes, así como el efecto de diferentes configuraciones de amortiguadores de  $Ca^{2+}$  endógenos en la propagación de la señal de  $Ca^{2+}$  en el medio intracelular.

#### 6.3.1. Dinámica de $Ca^{2+}$ intracelular en presencia de un amortiguador endógeno de $Ca^{2+}$ inmóvil

Al incluir únicamente  $310 \mu M$  de un buffer endógeno fijo (i.e. que no difunde) al modelo de la célula  $\beta$  con 245 fuentes puntuales de  $Ca^{2+}$ , el disparo de potenciales de acción generó transitorios de  $Ca^{2+}$  con la misma frecuencia que  $V_m$  (Fig. 6.7), que fueron observables hasta una distancia de  $1 \mu m$ .

En la Fig. 6.8A se muestra un acercamiento a un transitorio de  $Ca^{2+}$ , así como los cambios en la concentración del amortiguador endógeno libre ( $[END_f]$ , Fig. 6.8B) y del complejo  $[END_f \cdot Ca]$  (Fig. 6.8C). Para este caso, la concentración de  $Ca^{2+}$  alcanzó un valor máximo de  $3.24 \mu M$  a  $30 \text{ nm}$  de distancia de las fuentes puntuales de  $Ca^{2+}$ . La concentración máxima de  $Ca^{2+}$ , medida a  $100, 300, 500, 700$  y  $1000 \text{ nm}$ , fue de  $2.68, 1.45, 0.4, 0.31$  y  $0.26 \mu M$  respectivamente (ver Fig. 6.9A). El proceso de

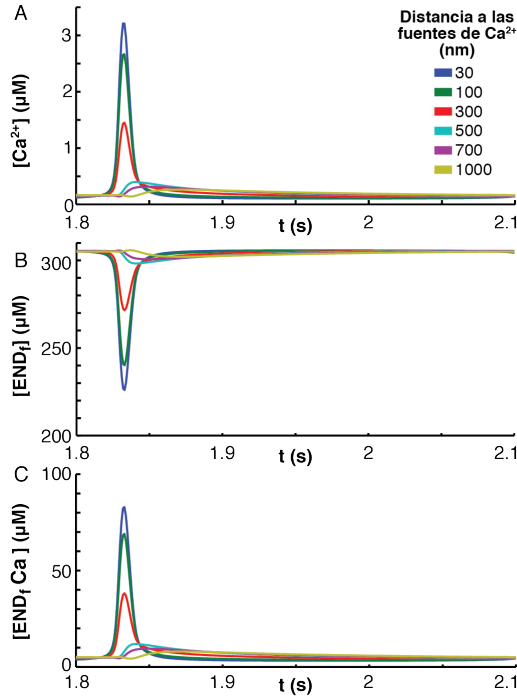


**Figura 6.7:** Transitorios de  $Ca^{2+}$  producidos por la actividad eléctrica en forma de potenciales de acción

difusión y captura de  $Ca^{2+}$  debido a la presencia del amortiguador de  $Ca^{2+}$  endógeno es evidente al observar cómo el pico de concentración de  $Ca^{2+}$  se ve desplazado hacia la derecha conforme la distancia a la que se mide respecto a las fuentes puntuales aumenta (6.8A). Interesantemente, la concentración de  $Ca^{2+}$  medida a 10, 100 y 300 nm de las fuentes de  $Ca^{2+}$  decae rápidamente a valores cercanos a la concentración basal debido principalmente a la activación de los mecanismos de expulsión de  $Ca^{2+}$  (PMCA y NCX), mientras que el  $Ca^{2+}$  medido a mayores profundidades ( $\geq 500$  nm) alcanza valores mayores una vez que el potencial de acción ha terminado.

Los transitorios de  $Ca^{2+}$  producidos por el disparo de potenciales de acción generan una disminución en la concentración del amortiguador de  $Ca^{2+}$  libre ( $[END_f]$ , 6.8B), lo que se ve reflejado en la formación del complejo  $[END_f \cdot Ca]$  (6.8C). Para el caso de 245 fuentes puntuales, la entrada de  $Ca^{2+}$  producida por el potencial de acción generó la formación de  $\sim 83 \mu M$  de  $[END_f \cdot Ca]$  a 30 nm de las fuentes de  $Ca^{2+}$ , quedando  $\sim 226 \mu M$  de amortiguador de  $Ca^{2+}$  libre, lo que indica que a pesar del incremento importante en  $[Ca^{2+}]_i$ , existe una gran capacidad de amortiguación que permitiría una mayor entrada de  $Ca^{2+}$ . A mayores profundidades, como era de esperarse, la formación del complejo  $[END_f \cdot Ca]$  es menor, lo que equivale a una mayor concentración de amortiguador fijo libre. Las concentraciones máximas de  $Ca^{2+}$ , y  $[END_f \cdot Ca]$ , así como la concentración mínima de  $[END_f]$  se muestran en la Fig. 6.9.

En lo que respecta al caso con 490 fuentes puntuales de  $Ca^{2+}$ , se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para el caso de 245 fuentes, con la diferencia de que la concentración de  $Ca^{2+}$  máxima alcanzada se ve disminuida (ver Fig. 6.9A) debido a que el mismo flujo de  $Ca^{2+}$  ocurre a través de un mayor número de fuentes. A pesar de esto, se obtiene una concentración de  $Ca^{2+}$  máxima de  $2.43 \mu M$  a 30 nm de las fuentes puntuales de  $Ca^{2+}$ , acompañada de la formación de  $\sim 53 \mu M$  de complejo  $[END_f \cdot Ca]$ , y la caída en la concentración de  $[END_f]$ , alcanzando un valor



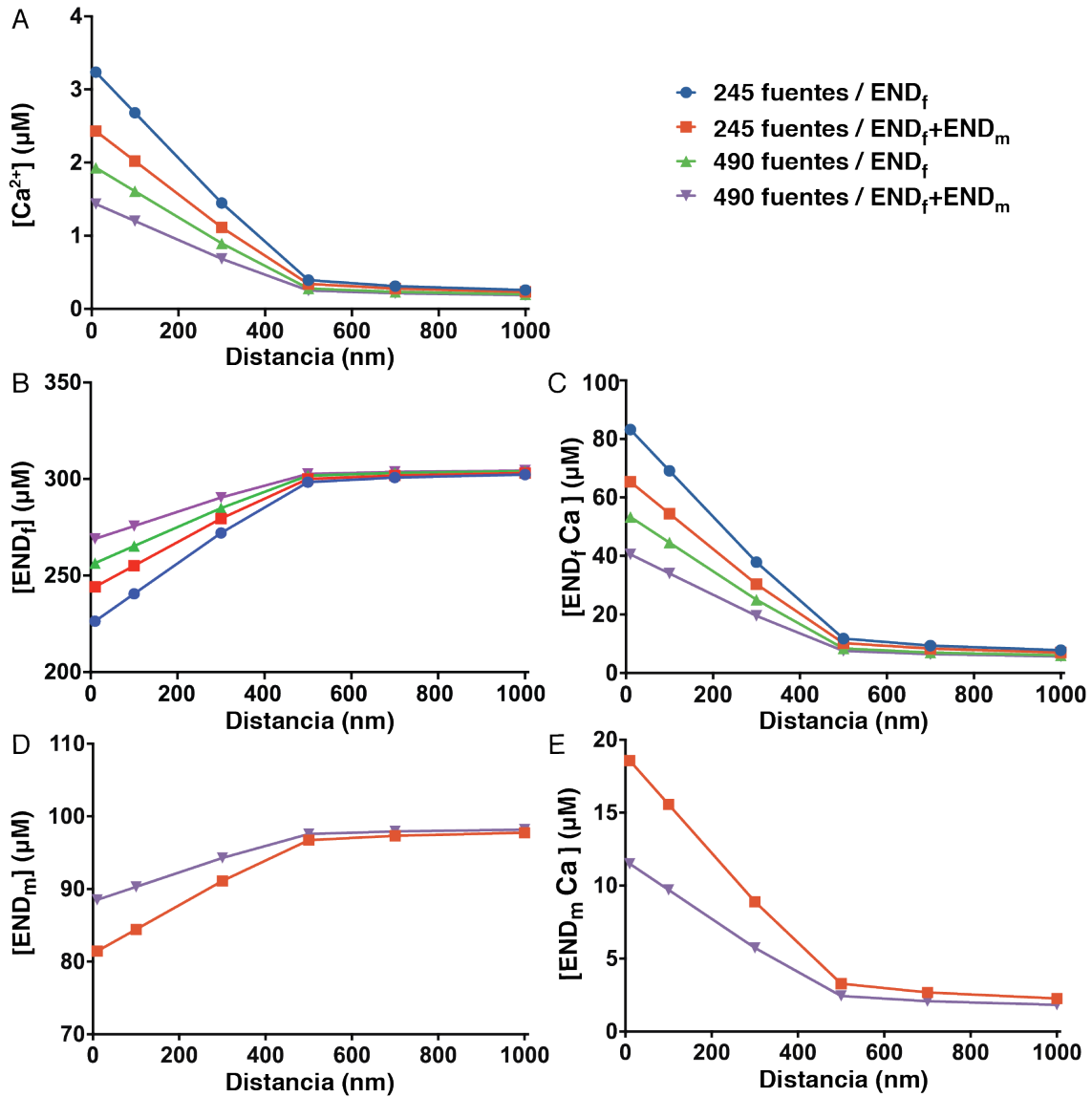
**Figura 6.8:** Transitorios de  $Ca^{2+}$ ,  $[END_f]$  y  $[END_f \cdot Ca]$  producidos por un potencial de acción en presencia de  $310 \mu M$  de un amortiguador endógeno inmóvil para el caso de 245 fuentes puntuales de  $Ca^{2+}$ . Se muestran la distribución espaciotemporal del  $Ca^{2+}$  libre (A),  $[END_f]$  (B) y el complejo  $[END_f \cdot Ca]$  (C).

mínimo de  $\sim 256 \mu M$ . De la misma manera que en el caso anterior, las concentraciones máximas de  $Ca^{2+}$  y  $[END_f \cdot Ca]$ , así como la concentración mínima de  $[END_f]$  para el caso de 490 fuentes puntuales de  $Ca^{2+}$ , se muestran en la Fig. 6.9.

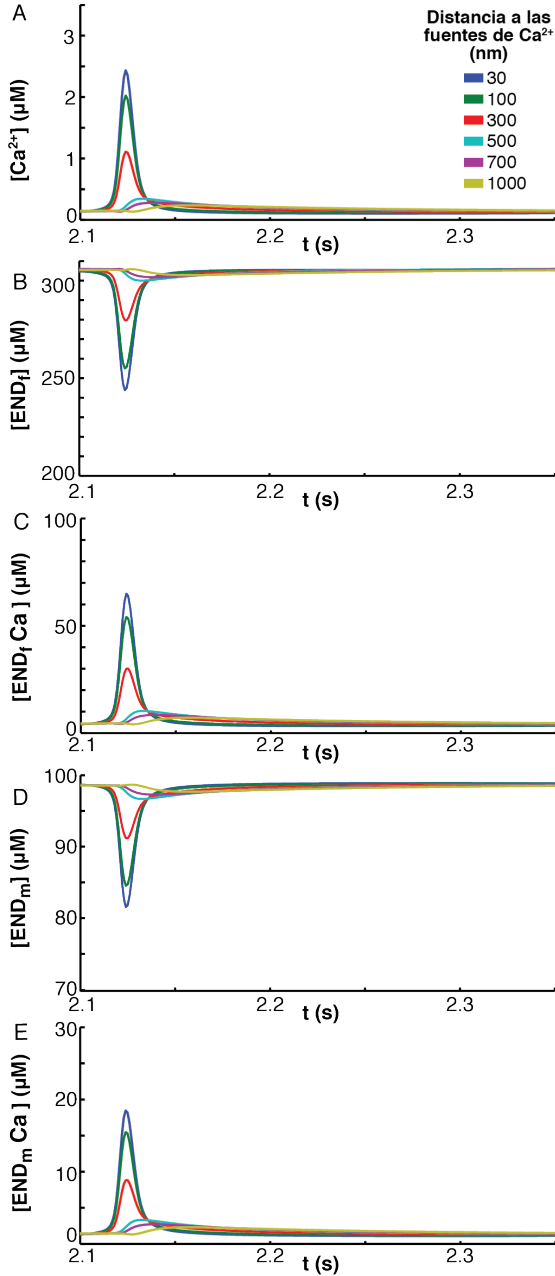
### 6.3.2. Efecto de los amortiguadores de $Ca^{2+}$ móviles en los transitorios de $Ca^{2+}$

Al agregar dos especies más al modelo de difusión amortiguada de  $Ca^{2+}$ , correspondientes al amortiguador endógeno móvil ( $[END_m]$  y  $[END_m \cdot Ca]$ ), la concentración de  $Ca^{2+}$  máxima, alcanzada durante un transitorio producido por el disparo de un potencial de acción, disminuyó de manera considerable, lo que era de esperarse ante la mayor capacidad de amortiguación de  $Ca^{2+}$  que se obtiene al incorporar  $100 \mu M$  del amortiguador de  $Ca^{2+}$  endógeno móvil. A  $30 \text{ nm}$  de las fuentes de  $Ca^{2+}$ , la concentración máxima alcanzó los  $2.43 \mu M$  (ver Figs. 6.10A y 6.9A), lo que representa una disminución de  $0.8 \mu M$  con respecto al caso en el que solo se incluyó el amortiguador endógeno fijo (Sección 6.3.1). El incremento de  $Ca^{2+}$  se ve limitado por la captura de  $Ca^{2+}$  debida a la presencia de los amortiguadores endógenos. Por ejemplo, a la misma distancia ( $30 \text{ nm}$ ), se formaron  $65.3 \mu M$  y  $18.6 \mu M$  de los





**Figura 6.9:** Concentraciones máximas y mínimas para todas las especies durante un transitorio producido por un potencial de acción a diferentes distancias de las fuentes de  $Ca^{2+}$ . Para los casos de 245 y 490 fuentes puntuales se muestran las concentraciones máximas de  $Ca^{2+}$  (A),  $[END_f \cdot Ca]$  (C) y  $[END_m \cdot Ca]$  (E) y las concentraciones mínimas de  $[END_f]$  (B) y  $[END_m]$  (D).



**Figura 6.10:** Transitorios de  $Ca^{2+}$ ,  $[END_f]$ ,  $[END_f \cdot Ca]$ ,  $[END_m]$  y  $[END_m \cdot Ca]$  producidos por un potencial de acción en presencia de  $310 \mu M$  de un amortiguador endógeno inmóvil y  $100 \mu M$  de un amortiguador endógeno móvil para el caso de 245 fuentes puntuales de  $Ca^{2+}$ . Se muestran la distribución espaciotemporal del  $Ca^{2+}$  libre (**A**),  $[END_f]$  (**B**),  $[END_f \cdot Ca]$  (**C**),  $[END_m]$  (**D**) y  $[END_m \cdot Ca]$  (**E**).

complejos  $[END_f \cdot Ca]$  y  $[END_m \cdot Ca]$  respectivamente (Figs. 6.10C y E), con las correspondientes disminuciones en las concentraciones de amortiguadores libres (Figs. 6.10B y D). Las concentraciones máximas de  $Ca^{2+}$ ,  $[END_f \cdot Ca]$  y  $[END_m \cdot Ca]$ , así como las concentraciones mínimas de  $[END_f]$  y  $[END_m]$  se muestran en la Fig. 6.9.

### 6.3.3. Dominios submembranales de $Ca^{2+}$ en condiciones fisiológicas

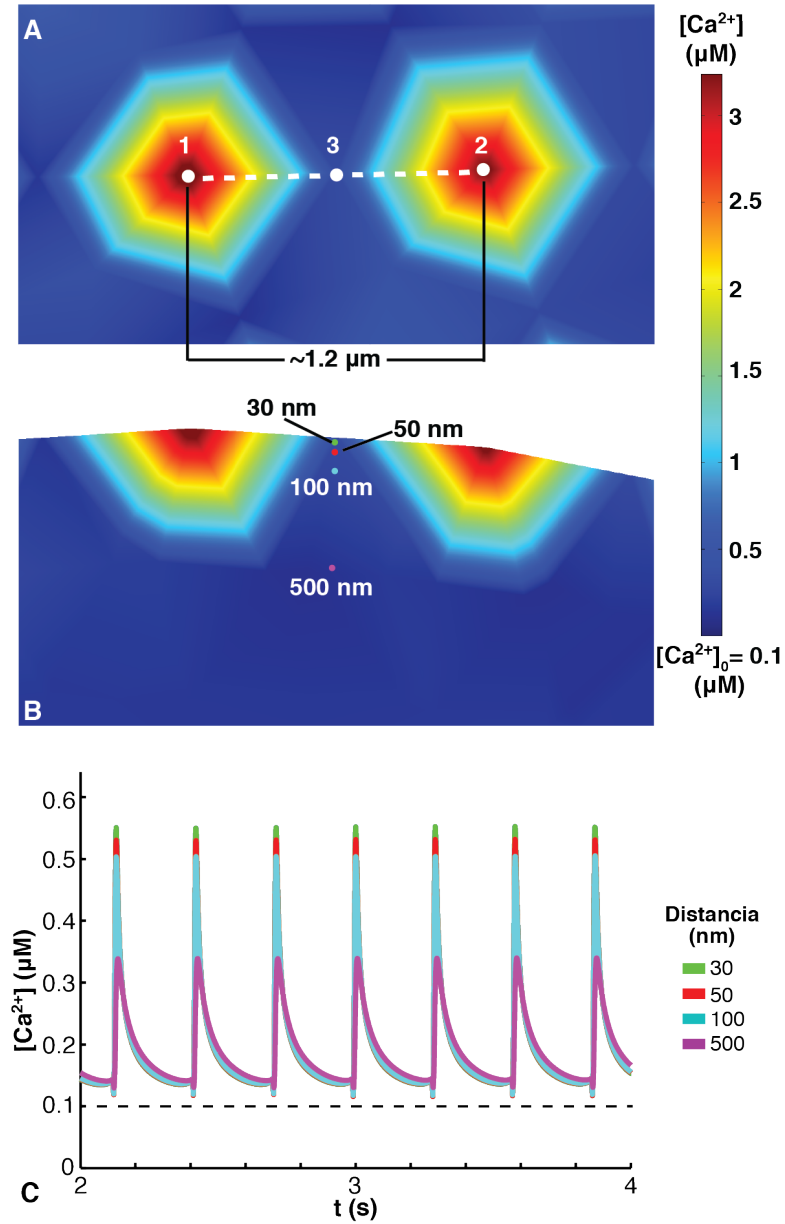
A diferencia de las simulaciones de los experimentos de fijación de voltaje, en las que los incrementos de  $Ca^{2+}$  producidos en cada fuente puntual no afectaron a fuentes de  $Ca^{2+}$  vecinas, es decir, no se observó un traslape en los microdominios (ver Sección 5.5.1), en las simulaciones de la dinámica de  $Ca^{2+}$  producida por disparos de potenciales de acción en presencia de amortiguadores endógenos de  $Ca^{2+}$  únicamente, se observó un claro traslape de los microdominios de  $Ca^{2+}$  generados en la vecindad de las fuentes puntuales. Un ejemplo de esto se muestra en la Fig. 6.11A y B, en la que se presentan dos fuentes puntuales seleccionadas arbitrariamente para el caso de 245 fuentes puntuales de  $Ca^{2+}$  en presencia de 310  $\mu M$  de un amortiguador endógeno fijo y 100  $\mu M$  de un amortiguador endógeno móvil. Se hicieron mediciones de la concentración de  $Ca^{2+}$  en diferentes puntos para evaluar la formación de dominios submembranales de  $Ca^{2+}$  (Fig. 6.11A y B). Los puntos de medición fueron seleccionados de manera que fueran equidistantes a las dos fuentes puntuales de  $Ca^{2+}$  seleccionadas, localizadas en los puntos **1** y **2** en la Fig. 6.11A. Los puntos de medición se situaron a 30, 100, 300 y 500 nm de la membrana celular (Fig. 6.11B).

En los puntos de medición equidistantes de las dos fuentes de  $Ca^{2+}$  seleccionadas se observaron transitorios de  $Ca^{2+}$  con concentraciones máximas que van desde 0.3 hasta 0.55  $\mu M$  (Fig. 6.11C), producidos por los incrementos de  $Ca^{2+}$  generados por la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de fuentes vecinas.

### 6.3.4. Comparación con mediciones experimentales del $Ca^{2+}$ en células $\beta$

Hasta donde se conoce, no existen mediciones simultáneas del  $Ca^{2+}$  intracelular y actividad eléctrica en células  $\beta$  humanas. Sin embargo, existen algunas estimaciones de la concentración de  $Ca^{2+}$  en células  $\beta$  de roedor.

Los resultados obtenidos de las simulaciones de la actividad eléctrica en forma de disparo de potenciales de acción hechas con el modelo propuesto en esta tesis, sugieren que un potencial de acción produce un incremento en la concentración de



**Figura 6.11:** Dominios submembranales de  $Ca^{2+}$  producidos por el disparo de potenciales de acción. **A, B:** Se muestran los gradientes de  $Ca^{2+}$  producidos en la vecindad de dos fuentes puntuales de  $Ca^{2+}$  seleccionadas arbitrariamente (puntos **1** y **2**) en el instante en el que la concentración de  $Ca^{2+}$  alcanza su valor máximo. **A.** Gradientes de  $Ca^{2+}$  en la dirección tangencial. **B.** Gradientes de  $Ca^{2+}$  en la dirección radial. **C.** Transitorios de  $Ca^{2+}$  medidos en los puntos de medición localizados a 10, 50, 100 y 500 nm del punto **3** que se muestra en **A**.

$\text{Ca}^{2+}$  intracelular perceptible hasta a  $\sim 1 \mu\text{m}$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , alcanzando un valor máximo en el rango de  $\sim 1.4$  a  $3.2 \mu\text{M}$ . Este rango concuerda con los reportes experimentales[72, 137, 199, 218], en los que se estimaron concentraciones similares, aunque es importante señalar que las mediciones hechas en los experimentos no se realizaron en condiciones fisiológicas, sino en presencia de amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  exógenos.

## 6.4. Conclusiones

De los resultados obtenidos de las simulaciones de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana y los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  asociados se puede concluir lo siguiente:

- El modelo construído reproduce razonablemente la actividad eléctrica en forma de disparo de potenciales de acción, al producir potenciales de acción con una frecuencia de  $\sim 3.6$  Hz y una amplitud dada por un valor mínimo de  $-68$  mV y un máximo de  $-9$  mV.
- La amplitud de los potenciales de acción depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio.
- La despolarización inicial de los potenciales de acción es provocada por el cierre de los canales de  $\text{K}^+$  ( $K_v$  y  $K_{HERG}$ ) y la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y T, mientras que las corrientes de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q contribuyen en la parte final de la despolarización.
- La repolarización del potencial de acción es producida conjuntamente por la activación de los canales de  $\text{K}^+$  sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  y los canales de  $\text{K}^+$  dependientes del voltaje, y el cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ .
- Un potencial de acción produce un incremento máximo en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio en el rango de  $1.4$  a  $3.2 \mu\text{M}$ .
- El disparo de potenciales de acción produce microdominios observables hasta una distancia de  $1 \mu\text{m}$  de las fuentes puntuales de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- A diferencia de las simulaciones de fijación de voltaje, en condiciones fisiológicas el modelo predice la formación de dominios submembranales de  $\text{Ca}^{2+}$  debido al traslape de los microdominios formados en fuentes vecinas.



# Capítulo 7

## Conclusiones generales y perspectivas

Se puede concluir que se alcanzaron todos los objetivos planteados en este proyecto (ver Sección 1.3). Además de las conclusiones específicas presentadas en los capítulos de resultados (Secciones 5.7 y 6.4), se llegó a las siguientes conclusiones generales:

- La metodología propuesta, al conjuntar los modelos de la actividad eléctrica con los modelos de la difusión amortiguada del  $\text{Ca}^{2+}$ , representa un avance significativo en el campo del modelado de la célula  $\beta$  y de las células excitables en general.
- La incorporación de los aspectos morfológicos a los modelos de la célula  $\beta$ , tales como el número, separación y localización de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en una geometría tridimensional, hace posible evaluar el comportamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  (y de los amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$ ) en todo el medio intracelular, en contraste con los modelos tradicionales en los que, al ser construídos siguiendo una lógica compartamental, se asume que los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular son uniformes e instantáneos.
- La caracterización detallada de las corrientes iónicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , considerando tanto la dependencia de los cambios en el potencial de membrana, como en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio, permitieron simular los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  producidos tanto en condiciones experimentales como fisiológicas.
- Se complementaron los estudios electrofisiológicos de las corrientes macroscópicas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula  $\beta$  humana a través del modelo propuesto, al hacer

posible estimar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  producidas tanto por la corriente total como por las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  aisladas durante experimentos de fijación de voltaje.

- El modelo de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  humana en condiciones fisiológicas reproduce el patrón eléctrico observado experimentalmente, consistente en el disparo de potenciales de acción, y es capaz de simular la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular producida por dicha actividad eléctrica.
- Los modelos matemáticos de la actividad eléctrica pueden ser de gran utilidad para el estudio de la contribución de las corrientes iónicas a la producción del patrón de actividad eléctrica.

## 7.1. Perspectivas

El modelo que se propone en esta tesis incluye aspectos nunca antes considerados en los modelos matemáticos de la célula  $\beta$ . En contraste con los modelos tradicionales, este modelo, además de permitir el estudio de la actividad eléctrica y de los mecanismos celulares que la producen, es también de utilidad para el estudio de los aspectos morfológicos de la célula, las propiedades de los amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  endógenos y exógenos, los procesos celulares que participan en el transporte del  $\text{Ca}^{2+}$  al exterior de la célula, etc. Otros mecanismos celulares, como los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , el metabolismo y la secreción de insulina, no han sido considerados en este modelo, debido, principalmente, a la falta de datos experimentales de células  $\beta$  de humano que permitan construir e integrar modelos de dichos procesos. Además, otros aspectos a considerar en un futuro son los relacionados al acoplamiento eléctrico entre las células  $\beta$ [222, 223], y su interacción con otras células dentro de los islotes de Langerhans[224]. Es importante mencionar que la metodología propuesta permitirá integrar a este modelo estos y otros procesos importantes conforme surja la evidencia experimental necesaria. En este sentido, es importante que el trabajo de modelado futuro se lleve a cabo en conjunción con el trabajo experimental, lo que permitirá no solo caracterizar directamente los mecanismos celulares de interés, sino evaluar y validar las predicciones del modelo en el sistema real. Así, este modelo tendrá la capacidad de simular una gran cantidad de procesos celulares involucrados en la secreción de insulina y, de esta manera, contribuir a alcanzar un mayor entendimiento del sistema de regulación de la glucosa a nivel celular, y como consecuencia, identificar los mecanismos celulares que posiblemente participan en el establecimiento de enfermedades como la diabetes tipo 2.



# Referencias

1. Kanat, M. *et al.* Distinct  $\beta$ -cell defects in impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance. *Diabetes* **61**, 447-453 (2012).
2. Rosengren, A. H. *et al.* Reduced insulin exocytosis in human pancreatic  $\beta$ -cells with gene variants linked to type 2 diabetes. *Diabetes* **61**, 1726-1733 (2012).
3. Alejandro, E. U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Méneur, C. y Bernal-Mizrachi, E. Natural history of  $\beta$ -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Molecular Aspects of Medicine* (2014).
4. Ferrannini, E. y Mari, A.  $\beta$ -Cell function in type 2 diabetes. *Metabolism* **63**, 1217-1227 (2014).
5. Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C. y Shaw, J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* **94**, 311-321 (2011).
6. Gutierrez, J. P. *et al.* Encuesta nacional de salud y nutrición 2012. *Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública* (2012).
7. Johnston, D., Wu, S. M.-S. y Gray, R. *Foundations of Cellular Neurophysiology* (MIT press Cambridge, MA: 1995).
8. Hille, B. *et al.* *Ion channels of excitable membranes* (Sinauer Sunderland, MA, 2001).
9. Ashcroft, F. M. *Ion channels and disease* (Academic press, 1999).
10. Rorsman, P. y Braun, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annual Review of Physiology* **75**, 155-179 (2013).
11. Atwater, I., Ribalet, B. y Rojas, E. Cyclic changes in potential and resistance of the  $\beta$ -cell membrane induced by glucose in islets of Langerhans from mouse. *The Journal of Physiology* **278**, 117-139 (1978).
12. Meissner, H., Henquin, J. y Preissler, M. Potassium dependence of the membrane potential of pancreatic B-cells. *FEBS Letters* **94**, 87-89 (1978).

13. Ashcroft, F. M. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 2047 (2005).
14. Ashcroft, F. M. y Rorsman, P.  $K_{ATP}$  channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nature Reviews Endocrinology* **9**, 660-669 (2013).
15. Rorsman, P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* **40**, 487-495 (1997).
16. Molleman, A. *Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology* (John Wiley & Sons, 2003).
17. Sakmann, B. y Neher, E. *Single-channel recording* (Springer New York, 2009).
18. Neher, E y Augustine, G. Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *The Journal of Physiology* **450**, 273-301 (1992).
19. Thayer, S. A. y Miller, R. J. Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *The Journal of Physiology* **425**, 85-115 (1990).
20. Braun, M. *et al.* Voltage-gated ion channels in human pancreatic  $\beta$ -cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* **57**, 1618-1628 (2008).
21. Félix-Martínez, G. J. y Godínez-Fernández, J. R. Mathematical models of electrical activity of the pancreatic  $\beta$ -cell: A physiological review. *Islets* **6**, e949195 (2014).
22. Shrayyef, M. Z. y Gerich, J. E. en *Principles of Diabetes Mellitus* 19-35 (Springer, 2010).
23. Rizza, R. A. *et al.* Control of blood sugar in insulin-dependent diabetes: comparison of an artificial endocrine pancreas, continuous subcutaneous insulin infusion, and intensified conventional insulin therapy. *New England Journal of Medicine* **303**, 1313-1318 (1980).
24. Wahren, J., Felig, P. y Hagenfeldt, L. Physical exercise and fuel homeostasis in diabetes mellitus. *Diabetologia* **14**, 213-222 (1978).
25. Consoli, A., Kennedy, F., Miles, J. y Gerich, J. Determination of Krebs cycle metabolic carbon exchange in vivo and its use to estimate the individual contributions of gluconeogenesis and glycogenolysis to overall glucose output in man. *Journal of Clinical Investigation* **80**, 1303 (1987).

26. Tominaga, M. *et al.* Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* **22**, 920-924 (1999).
27. Mitrakou, A. *et al.* Hierarchy of glycemic thresholds for counterregulatory hormone secretion, symptoms, and cerebral dysfunction. *American Journal of Physiology* **260**, E67-E74 (1991).
28. Klinger, S. y Thorens, B. en *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* 315-334 (Springer, 2008).
29. Meyer, C., Dostou, J., Nadkarni, V. y Gerich, J. Effects of physiological hyperinsulinemia on systemic, renal, and hepatic substrate metabolism. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **275**, F915-F921 (1998).
30. Øster-Jørgensen, E., Pedersen, S. y Larsen, M. The influence of induced hyperglycaemia on gastric emptying rate in healthy humans. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* **50**, 831-836 (1990).
31. Lund, A., Bagger, J. I., Christensen, M., Knop, F. K. y Vilsbøll, T. Glucagon and Type 2 Diabetes: the Return of the Alpha Cell. *Current Diabetes Reports* **14**, 1-7 (2014).
32. Wilding, J. P. The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors. *Metabolism* **63**, 1228-1237 (2014).
33. MacDonald, P. E. y Rorsman, P. Oscillations, intercellular coupling, and insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells. *PloS Biology* **4**, e49 (2006).
34. Hiriart, M. y Aguilar-Bryan, L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **295**, E1298-E1306 (2008).
35. Henquin, J. C., Ravier, M., Nenquin, M., Jonas, J. C. y Gilon, P. Hierarchy of the  $\beta$ -cell signals controlling insulin secretion. *European Journal of Clinical Investigation* **33**, 742-750 (2003).
36. Henquin, J. C. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in  $\beta$ -cells. *Diabetes Research and Clinical Practice* **93**, S27-S31 (2011).
37. Henquin, J. C. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* **52**, 739-751 (2009).
38. Henquin, J. C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* **49**, 1751-1760 (2000).

39. Seino, S., Shibasaki, T. y Minami, K.  $\beta$ -Cell biology of insulin secretion. *International Textbook of Diabetes Mellitus, Fourth Edition, Fourth Edition*, 96-107.
40. Maechler, P. *et al.* Role of Mitochondria in  $\beta$ -Cell Function and Dysfunction. *Islets of Langerhans*, 633-657 (2015).
41. Basu, A., Pedersen, M. G. y Cobelli, C. Prediabetes: Evaluation of  $\beta$ -Cell Function. *Diabetes* **61**, 270-271 (2012).
42. Bennett, K., James, C. y Hussain, K. Pancreatic  $\beta$ -cell  $K_{ATP}$  channels: hypoglycaemia and hyperglycaemia. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **11**, 157-163 (2010).
43. Tarasov, A. I., Griffiths, E. J. y Rutter, G. A. Regulation of ATP production by mitochondrial  $Ca^{2+}$ . *Cell Calcium* **52**, 28-35 (2012).
44. Drews, G., Krippeit-Drews, P. y Düfer, M. en *Islets of Langerhans* 249-303 (Springer, 2015).
45. Ashcroft, F. M. y Rorsman, P. Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **54**, 87-143 (1989).
46. Meissner, H. y Schmelz, H. Membrane potential of beta-cells in pancreatic islets. *Pflügers Archiv* **351**, 195-206 (1974).
47. Rorsman, P., Eliasson, L., Kanno, T., Zhang, Q. y Gopel, S. Electrophysiology of pancreatic  $\beta$ -cells in intact mouse islets of Langerhans. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **107**, 224-235 (2011).
48. Misler, S. *et al.* Stimulus-secretion coupling in  $\beta$ -cells of transplantable human islets of langerhans: evidence for a critical role for  $Ca^{2+}$  entry. *Diabetes* **41**, 662-670 (1992).
49. Fridlyand, L. E., Jacobson, D. A. y Philipson, L. Ion channels and regulation of insulin secretion in human  $\beta$ -cells: a computational systems analysis. *Islets* **5**, 1-15 (2013).
50. Bertram, R., Previte, J., Sherman, A., Kinard, T. A. y Satin, L. S. The phantom burster model for pancreatic  $\beta$ -cells. *Biophysical Journal* **79**, 2880-2892 (2000).
51. Fridlyand, L. E., Tamarina, N. y Philipson, L. H. Bursting and calcium oscillations in pancreatic  $\beta$ -cells: specific pacemakers for specific mechanisms. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **299**, E517-E532 (2010).

52. Beauvois, M. C. *et al.* Glucose-induced mixed  $[Ca^{2+}]_c$  oscillations in mouse  $\beta$ -cells are controlled by the membrane potential and the SERCA3  $Ca^{2+}$ -ATPase of the endoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **290**, C1503-C1511 (2006).
53. Pedersen, M. G. A biophysical model of electrical activity in human  $\beta$ -cells. *Biophysical Journal* **99**, 3200-3207 (2010).
54. Riz, M., Braun, M. y Pedersen, M. G. Mathematical modeling of heterogeneous electrophysiological responses in human  $\beta$ -Cells. *PLoS Computational Biology* **10**, e1003389 (2014).
55. Misler, S., Gee, W. M., Gillis, K. D., Scharp, D. W. y Falke, L. C. Metabolite-regulated ATP-sensitive  $K^+$  channel in human pancreatic islet cells. *Diabetes* **38**, 422-427 (1989).
56. Cook, D. L. y Hales, N. Intracellular ATP directly blocks  $K^+$  channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**, 271-273 (1984).
57. Ashcroft, F. M., Harrison, D. E. y Ashcroft, S. J. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* **312**, 446-448 (1984).
58. Yang, S.-N. y Berggren, P.-O. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic  $\beta$ -cell physiology and pathophysiology. *Endocrine reviews* **27**, 621-676 (2006).
59. Yang, S.-N. *et al.* Ionic mechanisms in pancreatic  $\beta$  cell signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71**, 4149-4177 (2014).
60. Zhang, Q. *et al.*  $Na^+$  current properties in islet  $\alpha$ -and  $\beta$ -cells reflect cell-specific *Scn3a* and *Scn9a* expression. *The Journal of physiology* **592**, 4677-4696 (2014).
61. Herrington, J. *et al.* Biophysical and pharmacological properties of the voltage-gated potassium current of human pancreatic  $\beta$ -cells. *The Journal of physiology* **567**, 159-175 (2005).
62. Hardy, A. B. *et al.* Characterization of Erg  $K^+$  channels in  $\alpha$ -and  $\beta$ -cells of mouse and human islets. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 30441-30452 (2009).
63. Rosati, B. *et al.* Glucose-and arginine-induced insulin secretion by human pancreatic  $\beta$ -cells: the role of HERG  $K^+$  channels in firing and release. *The FASEB Journal* **14**, 2601-2610 (2000).

64. Riz, M., Braun, M., Wu, X. y Pedersen, M. G. Inwardly rectifying Kir2.1 currents in human  $\beta$ -cells control electrical activity: Characterisation and mathematical modelling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2015).
65. Jacobson, D. A. *et al.* Calcium-activated and voltage-gated potassium channels of the pancreatic islet impart distinct and complementary roles during secretagogue induced electrical responses. *The Journal of physiology* **588**, 3525-3537 (2010).
66. Tamarina, N. A. *et al.* Small-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels are expressed in pancreatic islets and regulate glucose responses. *Diabetes* **52**, 2000-2006 (2003).
67. Bertram, R., Sherman, A. y Satin, L. S. Metabolic and electrical oscillations: partners in controlling pulsatile insulin secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* **293**, E890-E900 (2007).
68. Santos, R. M. *et al.* Widespread synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflügers Archiv* **418**, 417-422 (1991).
69. Valdeolmillos, M., Santos, R. M., Contreras, D., Soria, B. y Rosario, L. M. Glucose-induced oscillations of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Letters* **259**, 19-23 (1989).
70. Gilon, P. y Henquin, J. C. Influence of membrane potential changes on cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 20713-20720 (1992).
71. Gilon, P., Chae, H. Y., Rutter, G. A. y Ravier, M. A. Calcium signaling in pancreatic  $\beta$ -cells in health and in Type 2 diabetes. *Cell Calcium* **56**, 340-361 (2014).
72. Ammälä, C *et al.* Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic B-cells. *The Journal of Physiology* **472**, 665-688 (1993).
73. Gilon, P., Shepherd, R. M. y Henquin, J. C. Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  as evidences in single pancreatic islets. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 22265-22268 (1993).

74. Hellman, B. *et al.* Glucose induces oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and insulin release in human pancreatic beta cells. *Diabetologia* **37**, S11-S20 (1994).
75. Chen, L., Koh, D. S. e Hille, B. Dynamics of calcium clearance in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* **52**, 1723-1731 (2003).
76. Herchuelz, A., Kamagate, A., Ximenes, H. y Van Eylen, F. Role of Na/Ca Exchange and the Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in  $\beta$  Cell Function and Death. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1099**, 456-467 (2007).
77. Berridge, M. J., Bootman, M. D. y Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 517-529 (2003).
78. Strehler, E. E. Plasma membrane calcium ATPases: From generic  $\text{Ca}^{2+}$  sump pumps to versatile systems for fine-tuning cellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biochemical and biophysical research communications* **460**, 26-33 (2015).
79. Herchuelz, A., Nguidjoe, E., Jiang, L. y Pachera, N. en *Sodium Calcium Exchange: A Growing Spectrum of Pathophysiological Implications* 385-394 (Springer, 2013).
80. Kamagate, A., Herchuelz, A., Bollen, A y Van Eylen, F. Expression of multiple plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases in rat pancreatic islet cells. *Cell Calcium* **27**, 231-246 (2000).
81. Herchuelz, A., DIAZ-HORTA, O. y Eylen, F. Na/Ca Exchange in Function, Growth, and Demise of  $\beta$ -Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **976**, 315-324 (2002).
82. Hovnanian, A. en *Calcium Signalling and disease* 337-363 (Springer, 2007).
83. Varadi, A, Molnar, E, Ostenson, C y Ashcroft, S. Isoforms of endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase are differentially expressed in normal and diabetic islets of Langerhans. *Biochemical Journal* **319**, 521-527 (1996).
84. Arredouani, A. *et al.* SERCA3 ablation does not impair insulin secretion but suggests distinct roles of different sarcoendoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pumps for  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* **51**, 3245-3253 (2002).
85. Arredouani, A., Henquin, J. C. y Gilon, P. Contribution of the endoplasmic reticulum to the glucose-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  response in mouse pancreatic islets. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **282**, E982-E991 (2002).

86. Gilon, P., Arredouani, A., Gailly, P., Gromada, J. y Henquin, J. C. Uptake and release of  $\text{Ca}^{2+}$  by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration triggered by  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the electrically excitable pancreatic B-cell. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 20197-20205 (1999).
87. Tamarina, N. A., Kuznetsov, A., Rhodes, C. J., Bindokas, V. P. y Philipson, L. H. Inositol (1, 4, 5)-trisphosphate dynamics and intracellular calcium oscillations in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* **54**, 3073-3081 (2005).
88. Islam, M. S. The ryanodine receptor calcium channel of  $\beta$ -cells molecular regulation and physiological significance. *Diabetes* **51**, 1299-1309 (2002).
89. Hellman, B. y Gylfe, E. Mobilization of different intracellular calcium pools after activation of muscarinic receptors in pancreatic beta-cells. *Pharmacology* **32**, 257-267 (1986).
90. Islam, M. S. en *Islets of Langerhans* 605-632 (Springer, 2015).
91. Li, F. y Zhang, Z.-M. Comparative identification of  $\text{Ca}^{2+}$  channel expression in INS-1 and rat pancreatic  $\beta$  cells. *World journal of gastroenterology: WJG* **15**, 3046 (2009).
92. Johnson, J. D., Kuang, S., Mislser, S. y Polonsky, K. S. Ryanodine receptors in human pancreatic  $\beta$  cells: localization and effects on insulin secretion. *The FASEB journal* **18**, 878-880 (2004).
93. Denton, R. M. y McCormack, J. G. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. *FEBS Letters* **119**, 1-8 (1980).
94. Heart, E., Corkey, R. F., Wikstrom, J. D., Shirihai, O. S. y Corkey, B. E. Glucose-dependent increase in mitochondrial membrane potential, but not cytoplasmic calcium, correlates with insulin secretion in single islet cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **290**, E143-E148 (2006).
95. Magnus, G. y Keizer, J. Minimal model of  $\beta$ -cell mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  handling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **42**, C717 (1997).
96. Tarasov, A. I. *et al.* The mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter MCU is essential for glucose-induced ATP increases in pancreatic  $\beta$ -cells. *PloS One* **7**, e39722 (2012).
97. Palty, R. *et al.* NCLX is an essential component of mitochondrial  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 436-441 (2010).



98. Alam, M. R. *et al.* Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake 1 (MICU1) and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter (MCU) contribute to metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic  $\beta$ -cells. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 34445-34454 (2012).
99. Maechler, P. Mitochondrial function and insulin secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology* **379**, 12-18 (2013).
100. Wiederkehr, A. y Wollheim, C. B. Impact of mitochondrial calcium on the coupling of metabolism to insulin secretion in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Cell Calcium* **44**, 64-76 (2008).
101. Wiederkehr, A. y Wollheim, C. B. Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Molecular and Cellular Endocrinology* **353**, 128-137 (2012).
102. Prentki, M., Matschinsky, F. M. y Madiraju, S. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metabolism* **18**, 162-185 (2013).
103. Li, J., Shuai, H., Gylfe, E. y Tengholm, A. Oscillations of sub-membrane ATP in glucose-stimulated beta cells depend on negative feedback from Ca<sup>2+</sup>. *Diabetologia* **56**, 1577-1586 (2013).
104. Takahashi, N. *et al.* Post-priming actions of ATP on Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in pancreatic beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 760-765 (1999).
105. Wiederkehr, A. *et al.* Mitochondrial matrix calcium is an activating signal for hormone secretion. *Cell Metabolism* **13**, 601-611 (2011).
106. Civelek, V. *et al.* Regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mitochondrial metabolism: influence of Ca<sup>2+</sup>, substrate and ADP. *Biochemical Journal* **318**, 615-621 (1996).
107. McCormack, J. G., Longo, E. A. y Corkey, B. E. Glucose-induced activation of pyruvate dehydrogenase in isolated rat pancreatic islets. *Biochemical Journal* **267**, 527-530 (1990).
108. Denton, R. M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1787**, 1309-1316 (2009).
109. Kindmark, H. *et al.* Glucose-induced oscillations in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration precede oscillations in mitochondrial membrane potential in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 34530-34536 (2001).
110. Krippeit-Drews, P., Düfer, M. y Drews, G. Parallel oscillations of intracellular calcium activity and mitochondrial membrane potential in mouse pancreatic B-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **267**, 179-183 (2000).

111. Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. y Sheu, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **287**, C817-C833 (2004).
112. Hellman, B. Pulsatility of insulin release – a clinically important phenomenon. *Uppsala Journal of Medical Sciences* **114**, 193-205 (2009).
113. Satin, L. S., Butler, P. C., Ha, J. y Sherman, A. S. Pulsatile insulin secretion, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Molecular Aspects of Medicine* (2015).
114. Pralong, W. F., Spät, A. y Wollheim, C. B. Dynamic pacing of Cell Metabolism by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 27310-27314 (1994).
115. Nilsson, T., Schultz, V., Berggren, P., Corkey, B. y Tornheim, K. Temporal patterns of changes in ATP/ADP ratio, glucose 6-phosphate and cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  in glucose-stimulated pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochemical Journal* **314**, 91-94 (1996).
116. Kennedy, H. J. *et al.* Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet  $\beta$ -cells: potential role for strategically located mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 13281-13291 (1999).
117. Kennedy, R. T., Kauri, L. M., Dahlgren, G. M. y Jung, S. K. Metabolic oscillations in  $\beta$ -cells. *Diabetes* **51**, S152-S161 (2002).
118. Ainscow, E. K. y Rutter, G. A. Glucose-stimulated oscillations in free cytosolic ATP concentration imaged in single islet  $\beta$ -cells evidence for a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanism. *Diabetes* **51**, S162-S170 (2002).
119. Luciani, D. S., Mislser, S. y Polonsky, K. S.  $\text{Ca}^{2+}$  controls slow NAD(P)H oscillations in glucose-stimulated mouse pancreatic islets. *The Journal of Physiology* **572**, 379-392 (2006).
120. Jung, S. K., Aspinwall, C. A. y Kennedy, R. T. Detection of multiple patterns of oscillatory oxygen consumption in single mouse islets of Langerhans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **259**, 331-335 (1999).
121. Tengholm, A. y Gylfe, E. Oscillatory control of insulin secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology* **297**, 58-72 (2009).
122. Smolen, P. A model for glycolytic oscillations based on skeletal muscle phosphofructokinase kinetics. *Journal of Theoretical Biology* **174**, 137-148 (1995).

123. Bertram, R., Satin, L. S., Pedersen, M. G., Luciani, D. S. y Sherman, A. Interaction of glycolysis and mitochondrial respiration in metabolic oscillations of pancreatic islets. *Biophysical Journal* **92**, 1544-1555 (2007).
124. Detimary, P., Gilon, P. y Henquin, J. C. Interplay between cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and the ATP/ADP ratio: a feedback control mechanism in mouse pancreatic islets. *Biochemical Journal* **333**, 269-274 (1998).
125. Godínez-Fernández, J. R. y Félix-Martínez, G. J. *Papel de la oscilación de la concentración de ATP en la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  en Memorias del XXIV Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica* (SOMIB, 2011).
126. Blake, R. y Trounce, I. A. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1840**, 1404-1412 (2014).
127. Maechler, P., Carobbio, S. y Rubi, B. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**, 696-709 (2006).
128. Sivitz, W. I. y Yorek, M. A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**, 537-577 (2010).
129. Anello, M *et al.* Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* **48**, 282-289 (2005).
130. Del Guerra, S. *et al.* Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* **54**, 727-735 (2005).
131. Doliba, N. M. *et al.* Glucokinase activation repairs defective bioenergetics of islets of Langerhans isolated from type 2 diabetics. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **302**, E87-E102. ISSN: 0193-1849 (2011).
132. Félix-Martínez, G. J. y Godínez-Fernández, J. R. Effects of impaired ATP production and glucose sensitivity on human  $\beta$ -cell function: a simulation study. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* **35**, 157-170 (2014).
133. Rorsman, P. y Renström, E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **46**, 1029-1045 (2003).
134. Bratanova-Tochkova, T. K. *et al.* Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* **51**, S83-S90 (2002).

135. Yang, Y. y Gillis, K. D. A highly  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive pool of granules is regulated by glucose and protein kinases in insulin-secreting INS-1 cells. *The Journal of General Physiology* **124**, 641-651 (2004).
136. Rutter, G. A., Tsuboi, T. y Ravier, M. A.  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains and the control of insulin secretion. *Cell Calcium* **40**, 539-551 (2006).
137. Bokvist, K., Eliasson, L., Ammälä, C., Renström, E. y Rorsman, P. Co-localization of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *The EMBO Journal* **14**, 50 (1995).
138. Martín, F., Ribas, J. y Soria, B. Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  gradients in pancreatic islet-cells stimulated by glucose and carbachol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **235**, 465-468 (1997).
139. Grodsky, G. M. A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling. *Journal of Clinical Investigation* **51**, 2047 (1972).
140. Barg, S., Eliasson, L., Renström, E. y Rorsman, P. A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse  $\beta$ -cells. *Diabetes* **51**, S74-S82 (2002).
141. Ohara-Imaizumi, M. y Nagamatsu, S. Insulin exocytotic mechanism by imaging technique. *Journal of Biochemistry* **140**, 1-5 (2006).
142. Nagamatsu, S. y Ohara-Imaizumi, M. en *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* 177-193 (Springer, 2008).
143. Renström, E. y Rorsman, P. en *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease* 147-176 (Springer, 2008).
144. Straub, S. G. y Sharp, G. W. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **18**, 451-463 (2002).
145. Brissova, M. *et al.* Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **53**, 1087-1097 (2005).
146. Kim, A. *et al.* Islet architecture: a comparative study. *Islets* **1**, 129 (2009).
147. Henquin, J. C., Dufrane, D. y Nenquin, M. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* **55**, 3470-3477 (2006).

148. Harrison, D., Christie, M. y Gray, D. Properties of isolated human islets of Langerhans: insulin secretion, glucose oxidation and protein phosphorylation. *Diabetologia* **28**, 99-103 (1985).
149. Hedekov, C. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiological Reviews* **60**, 442-509 (1980).
150. Braun, M., Ramracheya, R., Johnson, P. R. y Rorsman, P. Exocytotic properties of human pancreatic  $\beta$ -cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1152**, 187-193 (2009).
151. Barg, S. *et al.* Fast Exocytosis with few  $\text{Ca}^{2+}$  channels in insulin-secreting mouse pancreatic B Cells. *Biophysical Journal* **81**, 3308-3323 (2001).
152. Sherman, A. Contributions of modeling to understanding stimulus-secretion coupling in pancreatic  $\beta$ -cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **271**, E362 (1996).
153. Pedersen, M. G. Contributions of mathematical modeling of beta cells to the understanding of beta-cell oscillations and insulin secretion. *Journal of Diabetes Science and Technology* **3**, 12-20 (2009).
154. Sherman, A. Lessons from models of pancreatic  $\beta$  cells for engineering glucose-sensing cells. *Mathematical Biosciences* **227**, 12-19 (2010).
155. Dean, P. y Matthews, E. Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* **219**, 389-390 (1968).
156. Dean, P. y Matthews, E. Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells. *The Journal of Physiology* **210**, 255-264 (1970).
157. Chay, T. R. y Keizer, J. Minimal model for membrane oscillations in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Biophysical Journal* **42**, 181-189 (1983).
158. Plant, T. Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *The Journal of Physiology* **404**, 731-747 (1988).
159. Rorsman, P. y Trube, G. Glucose dependent  $\text{K}^{+}$ -channels in pancreatic  $\beta$ -cells are regulated by intracellular ATP. *Pflügers Archiv* **405**, 305-309 (1985).
160. Keizer, J. y Magnus, G. ATP-sensitive potassium channel and bursting in the pancreatic beta cell. A theoretical study. *Biophysical Journal* **56**, 229-242 (1989).

161. Magnus, G. y Keizer, J. Model of  $\beta$ -cell mitochondrial calcium handling and electrical activity. I. Cytoplasmic variables. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **274**, C1158-C1173 (1998).
162. Magnus, G. y Keizer, J. Model of  $\beta$ -cell mitochondrial calcium handling and electrical activity. II. Mitochondrial variables. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **274**, C1174-C1184 (1998).
163. Smolen, P. y Keizer, J. Slow voltage inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$  currents and bursting mechanisms for the mouse pancreatic beta-cell. *The Journal of Membrane Biology* **127**, 9-19 (1992).
164. Larsson, O., Kindmark, H., Brandstrom, R, Fredholm, B. y Berggren, P. O. Oscillations in  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel activity promote oscillations in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the pancreatic  $\beta$  cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 5161-5165 (1996).
165. Ravier, M. A., Nenquin, M., Miki, T., Seino, S. y Henquin, J. C. Glucose controls cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and insulin secretion in mouse islets lacking adenosine triphosphate-sensitive  $\text{K}^{+}$  channels owing to a knockout of the pore-forming subunit Kir6.2. *Endocrinology* **150**, 33-45 (2009).
166. Düfer, M. *et al.* Oscillations of membrane potential and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in  $\text{SUR1}^{-/-}$  beta cells. *Diabetologia* **47**, 488-498 (2004).
167. Szollosi, A., Nenquin, M., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. y Henquin, J.-C. Glucose stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  influx and insulin secretion in 2-week-old  $\beta$ -cells lacking ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channels. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 1747-1756 (2007).
168. Diederichs, F. Mathematical simulation of membrane processes and metabolic fluxes of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Bulletin of Mathematical Biology* **68**, 1779-1818 (2006).
169. Diederichs, F. Ion homeostasis and the functional roles of SERCA reactions in stimulus-secretion coupling of the pancreatic  $\beta$ -cell: A mathematical simulation. *Biophysical Chemistry* **134**, 119-143 (2008).
170. Smith, P. A., Ashcroft, F. M. y Rorsman, P. Simultaneous recordings of glucose dependent electrical activity and ATP-regulated  $\text{K}^{+}$ -currents in isolated mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *FEBS Letters* **261**, 187-190 (1990).
171. Bertram, R. y Sherman, A. A calcium-based phantom bursting model for pancreatic islets. *Bulletin of Mathematical Biology* **66**, 1313-1344 (2004).

172. Bertram, R. *et al.* A role for calcium release-activated current (CRAC) in cholinergic modulation of electrical activity in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biophysical Journal* **68**, 2323-2332 (1995).
173. Chay, T. R. Electrical bursting and luminal calcium oscillation in excitable cell models. *Biological Cybernetics* **75**, 419-431 (1996).
174. Gilon, P. y Henquin, J. C. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic  $\beta$ -cell function. *Endocrine Reviews* **22**, 565-604 (2001).
175. Leech, C. A., Kopp, R. F., Philipson, L. H. y Roe, M. W. en *Islets of Langerhans* 337-368 (Springer, 2015).
176. Fridlyand, L. E., Tamarina, N. y Philipson, L. H. Modeling of  $\text{Ca}^{2+}$  flux in pancreatic  $\beta$ -cells: role of the plasma membrane and intracellular stores. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **285**, E138-E154 (2003).
177. Fridlyand, L. E., Ma, L. y Philipson, L. H. Adenine nucleotide regulation in pancreatic  $\beta$ -cells: modeling of ATP/ADP- $\text{Ca}^{2+}$  interactions. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **289**, E839-E848 (2005).
178. Grapengiesser, E. Glucose induces cytoplasmic  $\text{Na}^{+}$  oscillations in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **226**, 830-835 (1996).
179. Grapengiesser, E. Unmasking of a Periodic  $\text{Na}^{+}$  Entry into Glucose-Stimulated Pancreatic  $\beta$ -Cells after Partial Inhibition of the Na/K Pump 1. *Endocrinology* **139**, 3227-3231 (1998).
180. Bertram, R., Satin, L., Zhang, M., Smolen, P. y Sherman, A. Calcium and glycolysis mediate multiple bursting modes in pancreatic islets. *Biophysical Journal* **87**, 3074-3087 (2004).
181. Chay, T. R. The effect of inactivation of calcium channels by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ions in the bursting pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell Biophysics* **11**, 77-90 (1987).
182. Sherman, A. S., Li, Y. X. y Keizer, J. E. en *Computational Cell Biology* 101-139 (Springer, 2002).
183. Sala, F. y Hernandez-Cruz, A. Calcium diffusion modeling in a spherical neuron. Relevance of buffering properties. *Biophysical Journal* **57**, 313-324 (1990).
184. Nowycky, M. C. y Pinter, M. J. Time courses of calcium and calcium-bound buffers following calcium influx in a model cell. *Biophysical Journal* **64**, 77-91 (1993).

185. Klingauf, J. y Neher, E. Modeling buffered  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophysical Journal* **72**, 674 (1997).
186. Gil, A., Segura, J., Pertusa, J. A. y Soria, B. Monte Carlo simulation of 3-D buffered  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion in neuroendocrine cells. *Biophysical Journal* **78**, 13-33 (2000).
187. Brasen, J. C., Olsen, L. F. y Hallett, M. B. Cell surface topology creates high  $\text{Ca}^{2+}$  signalling microdomains. *Cell Calcium* **47**, 339-349 (2010).
188. González-Vélez, V. y Godínez-Fernández, J. Simulation of five intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -regulation mechanisms in response to voltage-clamp pulses. *Computers in Biology and Medicine* **34**, 279-292 (2004).
189. Félix-Martínez, G. J. y Godínez-Fernández, J. R. Modeling  $\text{Ca}^{2+}$  currents and buffered diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  in human  $\beta$ -cells during voltage clamp experiments. *Mathematical biosciences* **270**, 66-80 (2015).
190. Carson, E. y Cobelli, C. *Modeling methodology for physiology and medicine* (Newnes, 2013).
191. Cobelli, C. y Carson, E. *Introduction to modeling in physiology and medicine* (Academic Press, 2008).
192. Hodgkin, A. y Huxley, A. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology* **116**, 449 (1952).
193. Hodgkin, A. y Huxley, A. The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology* **116**, 473-496 (1952).
194. Hodgkin, A. y Huxley, A. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology* **116**, 497-506 (1952).
195. Hodgkin, A. y Huxley, A. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology* **117**, 500 (1952).
196. Keener, J. y Sneyd, J. *Mathematical Physiology: I: Cellular Physiology* (Springer Science & Business Media, 2010).
197. Schwaller, B. Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  buffers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a004051-a004051 (2010).



198. Benke, T. A., Lüthi, A., Isaac, J. T. y Collingridge, G. L. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* **393**, 793-797 (1998).
199. Theler, J. *et al.* Video imaging of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in pancreatic  $\beta$ -cells stimulated by glucose, carbachol, and ATP. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 18110-18117 (1992).
200. Quesada, I., Martín, F. y Soria, B. Nutrient modulation of polarized and sustained submembrane  $\text{Ca}^{2+}$  microgradients in mouse pancreatic islet cells. *The Journal of Physiology* **525**, 159-167 (2000).
201. Qian, W.-J. y Kennedy, R. T. Spatial organization of  $\text{Ca}^{2+}$  entry and exocytosis in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **286**, 315-321 (2001).
202. Satin, L. S. Localized calcium influx in pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocrine* **13**, 251-262 (2000).
203. Paras, C. D., Qian, W., Lakey, J. R., Tan, W. y Kennedy, R. T. Localized exocytosis detected by spatially resolved amperometry in single pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell Biochemistry and Biophysics* **33**, 227-240 (2000).
204. Saff, E. B. y Kuijlaars, A. B. Distributing many points on a sphere. *The Mathematical Intelligencer* **19**, 5-11 (1997).
205. Rorsman, P., Braun, M. y Zhang, Q. Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease. *Cell Calcium* **51**, 300-308 (2012).
206. Tadross, M. R., Dick, I. E. y Yue, D. T. Mechanism of local and global  $\text{Ca}^{2+}$  sensing by calmodulin in complex with a  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Cell* **133**, 1228-1240 (2008).
207. Wang, M.-C. *et al.* 3D structure of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *Journal of molecular biology* **323**, 85-98 (2002).
208. Meyer-Hermann, M. E. The electrophysiology of the  $\beta$ -cell based on single transmembrane protein characteristics. *Biophysical Journal* **93**, 2952-2968 (2007).
209. Cha, C. Y. *et al.* Ionic mechanisms and  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics underlying the glucose response of pancreatic  $\beta$  cells: a simulation study. *The Journal of General Physiology* **138**, 21-37 (2011).
210. Schönherr, R. *et al.* Functional role of the slow activation property of ERG  $\text{K}^+$  channels. *European Journal of Neuroscience* **11**, 753-760 (1999).

211. Cheng, H. *et al.* TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell Calcium* **41**, 51-61 (2007).
212. Dick, I. E. *et al.* A modular switch for spatial  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity in the calmodulin regulation of  $\text{Ca}_V$  channels. *Nature* **451**, 830-834 (2008).
213. Mislér, S., Dickey, A. y Barnett, D. W. Maintenance of stimulus-secretion coupling and single beta-cell function in cryopreserved-thawed human islets of Langerhans. *Pflügers Archiv* **450**, 395-404 (2005).
214. Cha, C. Y., Himeno, Y., Shimayoshi, T., Amano, A. y Noma, A. A novel method to quantify contribution of channels and transporters to membrane potential dynamics. *Biophysical Journal* **97**, 3086-3094 (2009).
215. Félix-Martínez, G. J. y Godínez-Fernández, J. R. *Analysis of spiking electrical activity in Human  $\beta$ -cells using mathematical models* en *IFMBE Proceedings* **49** (Springer International Publishing, 2015), 888-891.
216. Tuckwell, H. C. Quantitative aspects of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents. *Progress in Neurobiology* **96**, 1-31 (2012).
217. Sherman, A., Keizer, J. y Rinzel, J. Domain model for  $\text{Ca}^{2+}$ -inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels at low channel density. *Biophysical Journal* **58**, 985-995 (1990).
218. Pinton, P. *et al.* Dynamics of glucose-induced membrane recruitment of protein kinase C  $\beta$ II in living pancreatic islet  $\beta$ -cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 37702-37710 (2002).
219. Marigo, V., Courville, K., Hsu, W. H., Feng, J. M. y Cheng, H. TRPM4 impacts on  $\text{Ca}^{2+}$  signals during agonist-induced insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **299**, 194-203 (2009).
220. Launay, P. *et al.* TRPM4 is a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* **109**, 397-407 (2002).
221. Díaz-García, C. M., Sánchez-Soto, C. e Hiriart, M. Toxins that modulate ionic channels as tools for exploring insulin secretion. *Cellular and Molecular Neurobiology* **30**, 1275-1281 (2010).
222. Pérez-Armendariz, E. M. Connexin 36, a key element in pancreatic beta cell function. *Neuropharmacology* **75**, 557-566 (2013).
223. Farnsworth, N. L. y Benninger, R. K. New insights into the role of connexins in pancreatic islet function and diabetes. *FEBS letters* **588**, 1278-1287 (2014).
224. Koh, D.-S., Cho, J.-H. y Chen, L. Paracrine interactions within islets of langerhans. *Journal of Molecular Neuroscience* **48**, 429-440 (2012).

# Apéndice

# Artículo 1

Modeling  $\text{Ca}^{2+}$  currents and buffered diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  in human  $\beta$ -cells during voltage clamp experiments.

Artículo publicado en *Mathematical Biosciences* (2015).



# Modeling $\text{Ca}^{2+}$ currents and buffered diffusion of $\text{Ca}^{2+}$ in human $\beta$ -cells during voltage clamp experiments



Gerardo J. Félix-Martínez\*, J. Rafael Godínez-Fernández

Department of Electrical Engineering, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D.F., Mexico

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 9 October 2014

Revised 3 September 2015

Accepted 28 September 2015

Available online 20 October 2015

### Keywords:

$\beta$ -cell

Electrical activity

$\text{Ca}^{2+}$

Microdomains

Diffusion

Voltage clamp

## ABSTRACT

Macroscopic  $\text{Ca}^{2+}$  currents of the human  $\beta$ -cells were characterized using the Hodgkin–Huxley formalism. Expressions describing the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation process of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in terms of the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  were obtained. By coupling the modeled  $\text{Ca}^{2+}$  currents to a three-dimensional model of buffered diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$ , we simulated the  $\text{Ca}^{2+}$  transients formed in the immediate vicinity of the cell membrane during voltage clamp experiments performed in high buffering conditions. Our modeling approach allowed us to consider the distribution of the  $\text{Ca}^{2+}$  sources over the cell membrane. The effect of exogenous (EGTA) and endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffers on the temporal course of the  $\text{Ca}^{2+}$  transients was evaluated. We show that despite the high  $\text{Ca}^{2+}$  buffering capacity, nanodomains are formed in the submembrane space, where a peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentration between  $\sim 76$  and  $143 \mu\text{M}$  was estimated from our simulations. In addition, the contribution of each  $\text{Ca}^{2+}$  current to the formation of the  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains was also addressed. Here we provide a general framework to incorporate the spatial aspects to the models of the pancreatic  $\beta$ -cell, such as a more detailed and realistic description of  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in response to electrical activity in physiological conditions can be provided by future models.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

In the pancreatic  $\beta$ -cell, insulin is released in response to an increase in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration [1,2] ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), mediated by the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  through specific voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VDCCs), which are activated by membrane depolarization caused by the closure of the ATP-dependent  $\text{K}^+$  channels ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) due to an increased metabolic activity (i.e. ATP production) after glucose stimulation. In general, the latter mechanism is responsible for insulin secretion both in rodent and human  $\beta$ -cells; however, several differences between species at different levels have been found recently. For instance, it has been shown that the fraction and distribution of the different hormone-secreting cell types in the islets of Langerhans differ between rodents and humans [3,4]. Similarly, differences in the glucose threshold for insulin secretion [5], the kinetics of exocytosis [6], the ionic channels expressed and their role in electrical activity have been reported [7–11].

Insulin secretion shows a biphasic response to glucose stimulation consisting of a first fast transient phase, followed by a second sustained phase with a slower rate of secretion [12]. It has been proposed that this biphasic behavior is due to the existence of distinct

pools of insulin granules [12,13] that are distinguished both by the proximity to the cell membrane and their sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  [14,15]. A minor fraction of the insulin granules forms the readily releasable pool (RRP), located in the immediate vicinity of the VDCCs, where  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reaches much higher levels than the rest of the cytosol and the so called  $\text{Ca}^{2+}$  nano and microdomains are formed [16–18]. It has been hypothesized that the release of the RRP granules accounts for the first phase of insulin secretion [13,19], ending once the RRP pool has been depleted. According to this proposal, the second phase of secretion is sustained by the mobilization of insulin granules from a reserve pool to the plasma membrane, where they can be released to the extracellular space [13]. Recently, direct evidence supporting this proposal was obtained by means of imaging techniques [20,21]. A detailed description of the mechanisms involved in insulin granule exocytosis can be found in recent reviews [22,23].

The main signal for the release of the RRP granules is the increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , thus the formation of  $\text{Ca}^{2+}$  nano and microdomains near the mouth of the VDCCs is extremely important for an adequate secretory response in  $\beta$ -cells. It has been shown that in rodent  $\beta$ -cells, the secretory sites and the VDCCs are colocalized and that both the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  and the secretion of insulin are limited to a certain region of the plasma membrane [17,24–26].

In contrast to mice  $\beta$ -cells, in which  $\text{Ca}^{2+}$  influx is mediated mainly by the L- and R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, the ionic channels responsible for the entry of calcium to the cytosol in human  $\beta$ -cells are the

\* Corresponding author. Tel.: +525558044600, Ext. 6437.

E-mail address: [gjfelix2005@gmail.com](mailto:gjfelix2005@gmail.com) (G.J. Félix-Martínez).

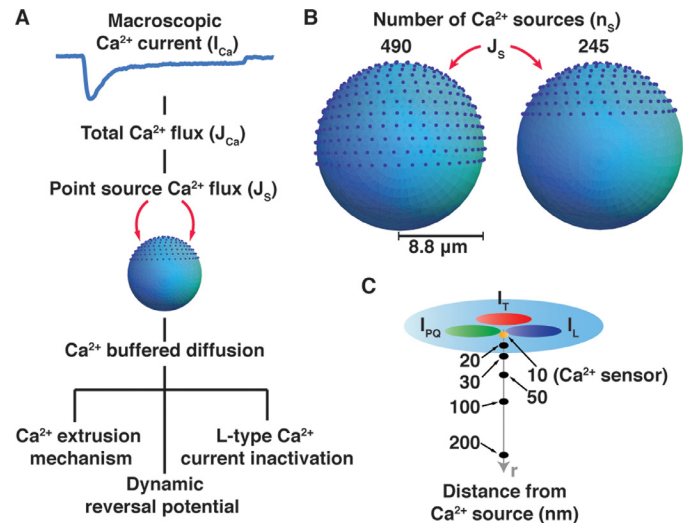
T-, L-, and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels [27] (for recent reviews regarding the electrophysiology of  $\beta$ -cells see Refs. [11,28–30]). Braun et al. [8] described in detail the electrophysiological characteristics of the ionic currents expressed in the human  $\beta$ -cell and their relationship with insulin secretion [6,8]. However, simultaneous measurements of  $\text{Ca}^{2+}$  in the intracellular space were not performed. In light of the above limitations we have built a computational model to simulate the spatiotemporal distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  produced by the  $\text{Ca}^{2+}$  currents under voltage clamp conditions by using detailed models of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents, which were derived directly from electrophysiological data. To our knowledge, studies addressing the dynamics of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in human  $\beta$ -cells are lacking. Since the  $\text{Ca}^{2+}$  signal plays a key role in glucose-stimulated insulin secretion, it is important to study how  $\text{Ca}^{2+}$  is distributed throughout the intracellular space following entry through the VDCCs.

Computational models have been widely used to simulate the spatiotemporal distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the intracellular space in different types of cells [31–36]. In these models, both exogenous and endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffers have been considered, since they play an important role in determining the distribution of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Several methods have been adopted in these studies to solve the resulting reaction–diffusion problem, being among them the finite differences method [31–34], the Monte Carlo method [35] and recently the finite element method [36]. Owing to the characteristics and limitations of each method, different simplifications have been made in these works. For example, most of the models based on finite differences schemes [31–33] assume that  $\text{Ca}^{2+}$  channels are uniformly distributed over the cell membrane. As a consequence, important geometrical aspects, like the non-homogeneous distribution of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels, the tangential components of diffusion and the curvature of the cell are often neglected. On the other hand, the model of Gil et al. [35], which is based on the Monte Carlo method, is capable of considering the distribution and number of channels, though in a simplified three-dimensional geometry. In this work we have built a three-dimensional model of an isolated human  $\beta$ -cell using the finite element method with two main objectives: (1) to develop a model of the macroscopic  $\text{Ca}^{2+}$  currents accounting for the dependence of the activation and inactivation processes on both membrane potential and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the nanodomain; (2) to simulate the spatiotemporal distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the intracellular space under voltage clamp conditions considering the morphological characteristics of a typical human  $\beta$ -cell.

## 2. Methods

### 2.1. Conceptual model

In order to simulate the spatiotemporal distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the intracellular space due to the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  through the VDCCs in voltage clamp conditions, a model of each of the macroscopic  $\text{Ca}^{2+}$  currents found in the human  $\beta$ -cell (T-, L-, and P/Q-type) was developed using the Hodgkin–Huxley formalism. A model of  $\text{Ca}^{2+}$  buffered diffusion in a three-dimensional cell was simultaneously used to estimate the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  at different depths from the  $\text{Ca}^{2+}$  sources, using the flux of  $\text{Ca}^{2+}$  generated by the simulated currents as the input signal. Since L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels of the human  $\beta$ -cells are inactivated by  $\text{Ca}^{2+}$  itself [8], the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  at the nanodomain ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}}$ ), estimated from the reaction–diffusion model, was used to couple the model of buffered diffusion with the model of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents. In addition,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}}$  dynamically regulates the activity of the  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion mechanism and the value of the reversal potential. This approach allows us to evaluate the effect of the localization of the ionic channels over the cell membrane (Fig. 1B) on the spatiotemporal distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the intracellular space. A schematic diagram of the conceptual model is shown in Fig. 1A.



**Fig. 1.** **A.** Conceptual model. From the simulated macroscopic currents, a corresponding total  $\text{Ca}^{2+}$  flux ( $J_{\text{Ca}}$ ) was calculated and distributed among 245 or 490  $\text{Ca}^{2+}$  point sources ( $J_s$ ). The problem of buffered diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  considering both exogenous (EGTA) and endogenous (END) buffers was solved using the finite element method. The concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  at the nanodomain, estimated at 10 nm from the point sources ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}}$ ), is used to determine the level of inactivation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, to calculate the value of the dynamic reversal potential and to regulate the activity of the  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion mechanism. **B.** Geometry of the simulated  $\beta$ -cell. Two cases with 245 and 490  $\text{Ca}^{2+}$  sources distributed among  $\sim 30\%$  and  $57\%$  of the total sphere surface area were considered. **C.** Diagram of a  $\text{Ca}^{2+}$  point source. It was assumed that the point sources include the three types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels (L, T and P/Q).  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA and END concentrations were measured at points located 10, 20, 30, 50, 100 and 200 nm from the  $\text{Ca}^{2+}$  sources.

### 2.2. Model of buffered diffusion of $\text{Ca}^{2+}$

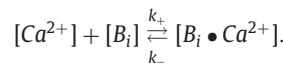
Different buffering conditions were simulated. Initially, simulations with a single exogenous buffer (EGTA) were performed, thus considering three species in the model: free  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), unbound EGTA ( $[\text{EGTA}]$ ) and bound EGTA ( $[\text{EGTA} \cdot \text{Ca}^{2+}]$ ). Then, we evaluated the effect of adding a non-diffusible endogenous buffer (END) on the distribution of  $\text{Ca}^{2+}$ , thus adding two more species to the model: unbound END ( $[\text{END}]$ ) and bound END ( $[\text{END} \cdot \text{Ca}^{2+}]$ ). In both cases the buffered diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  was simulated using the standard reaction–diffusion equations:

$$\frac{\partial [\text{Ca}^{2+}]_i}{\partial t} = D_{\text{Ca}} \nabla^2 [\text{Ca}^{2+}]_i - \sum_i R_i$$

$$\frac{\partial [B_i]}{\partial t} = D_{B_i} \nabla^2 [B_i] - R_i$$

$$\frac{\partial [B_i \cdot \text{Ca}^{2+}]}{\partial t} = D_{B_i} \nabla^2 [B_i \cdot \text{Ca}^{2+}] + R_i \quad (1)$$

where  $D_X$  is the diffusion coefficient for each species,  $\nabla$  is the three-dimensional partial differential operator,  $B_i$  represents the type of  $\text{Ca}^{2+}$  buffer (END or EGTA) and  $R_i$  is the reaction term given by a first order kinetic scheme:



which, according to the mass-action law, can be written as:

$$R_i = k_+ [\text{Ca}^{2+}]_i \cdot [B_i] - k_- [B_i \cdot \text{Ca}^{2+}] \quad (2)$$

The parameters  $k_+$  and  $k_-$  are the forward and backward binding rates respectively, and are given in Table 1.

#### 2.2.1. Geometry

In this model, the human  $\beta$ -cell geometry is assumed to be spherical, which is a reasonable approximation when it is studied in isolation (Braun 2013, personal communication). A three-dimensional

**Table 1**  
Parameters used in the model of the buffered diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  (EST = estimated).

Parameter	Value	Ref.
$\text{Ca}^{2+}$		
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Tot}}$	1 mM	[8]
$D_{\text{Ca}}$	$220 \mu\text{m}^2/\text{s}$	[34,35]
EGTA		
$[\text{EGTA}]_{\text{Tot}}$	10 mM	[8]
$D_{\text{EGTA}}$	$200 \mu\text{m}^2/\text{s}$	[34,35]
$K_d$	$0.15 \mu\text{M}$	[35,35]
$k_+$	$10 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	[34,35]
$k_-$	$1.5 1/\text{s}$	[34,35]
END		
$[\text{END}]_{\text{Tot}}$	0.5 mM	[34,35]
$D_{\text{END}}$	$0 \mu\text{m}^2/\text{s}$	[34,35]
$K_d$	$10 \mu\text{M}$	[34,35]
$k_+$	$500 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	[34,35]
$k_-$	$5000 1/\text{s}$	[34,35]
PMCA		
$J_{\text{max}}$	$0.02 \mu\text{M}/\text{ms}$	[49,55]
$K_{\text{PMCA}}$	$0.5 \mu\text{M}$	[49,55]
Initial conditions		
$[\text{Ca}^{2+}]_0$	$\sim 20 \text{ nM}$	Est.
$[\text{EGTA} \bullet \text{Ca}]_0$	$999.9 \mu\text{M}$	Est.
$[\text{EGTA}]_0$	$\sim 9 \text{ mM}$	Est.

approach was preferred over the 2D axisymmetric or the 1D simplifications in order to be able to consider the distribution and separation of the  $\text{Ca}^{2+}$  sources over the cell membrane. In addition, in contrast to the simplified geometry configurations, the three-dimensional approach used here allows us to take into account the tangential components of diffusion, which are often neglected in other models.

Cell capacitance is directly proportional to the surface area of the cell membrane. Specifically, the capacitance of biological membranes is approximately  $10 \text{ fF}/\mu\text{m}^2$  [37]. Braun et al. [8] reported an average capacitance of  $9.9 \text{ pF}$  for the human  $\beta$ -cell, thus a membrane surface area of  $990 \mu\text{m}^2$  was estimated, which correspond to a simulated spherical cell of radius  $8.8 \mu\text{m}$ .

$\text{Ca}^{2+}$  channels were distributed in form of point sources over the cell surface accordingly to the experimental reports. To our knowledge, studies regarding the localization of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels and secretory sites in human  $\beta$ -cells have not been performed. For this reason, data from rodent  $\beta$ -cells was used instead. It has been estimated that the mouse  $\beta$ -cell has less than 500 L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, and that the average separation between them is  $\sim 1.2 \mu\text{m}$  [38]. Moreover, it is known that the  $\text{Ca}^{2+}$  channels are not distributed uniformly over the whole cell membrane, but that they concentrate in the region where the secretory sites are located [17,24–26]. In fact, it has been reported that the secretion of insulin takes place only in 20–50% of the cell exterior [26,39]. In order to be able to estimate the range of the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  reached in the submembrane space, two different cases were simulated, differing only in the number of  $\text{Ca}^{2+}$  sources considered (Fig. 1B). In the first case, 490 point sources were distributed over one pole of the cell, comprising  $\sim 57\%$  of the cell surface ( $\sim 555 \mu\text{m}^2$ ). Similarly, in the second case, 245  $\text{Ca}^{2+}$  sources were considered, comprising  $\sim 30\%$  of the cell surface ( $\sim 285 \mu\text{m}^2$ ). In both cases, the point sources were distributed uniformly over the corresponding cell surface using the algorithm proposed by Saff and Kuijlaars [40], assuming an approximate separation between sources of  $\sim 1.2 \mu\text{m}$ , as reported experimentally. The resulting sources density was less than  $1 \text{ source}/\mu\text{m}^2$ , as has been estimated in rodent  $\beta$ -cells [38,41]. In the model presented here, each  $\text{Ca}^{2+}$  source represents a cluster of  $\text{Ca}^{2+}$  channels composed of the three different channels found in the human  $\beta$ -cell (Fig. 1C). This is a reasonable assumption since there is evidence that different types of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels are assembled into macromolecular

complexes in different cell types, including neuroendocrine cells [42–44]. Such complexes allow the formation of  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains (within  $50 \text{ nm}$  of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels) and microdomains (from  $50$  to a few hundreds nanometers from the  $\text{Ca}^{2+}$  channels) near the mouth of the ionic channels, where the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  is able to reach very high levels, even orders of magnitude higher than the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . Functionally, the  $\text{Ca}^{2+}$  nano and microdomains are necessary to regulate the activity of ionic channels (e.g. the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels [45,46] and the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels [42,43,47]) and other  $\text{Ca}^{2+}$  dependent processes, like the activity of the plasma membrane ATPase (PMCA) [48]. For a review about the functional role of the  $\text{Ca}^{2+}$  nano/microdomains see for instance Ref. [16,47].

In our model we have defined the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  at the nanodomain ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}}$ ) as the concentration estimated from the buffered diffusion model at a distance of  $10 \text{ nm}$  from the  $\text{Ca}^{2+}$  point sources in the radial direction, the approximate distance between the calmodulin  $\text{Ca}^{2+}$  sensor of the L-type channels and the cell membrane [45]. The concentration of all the species considered in the model (free  $\text{Ca}^{2+}$  and bound and unbound buffers) was also measured at distances of  $10, 30, 50, 100$  and  $200 \text{ nm}$  from the  $\text{Ca}^{2+}$  sources in order to evaluate their behavior at different depths (Fig. 1C).

### 2.2.2. Initial and boundary conditions

Initial concentrations of all the species were calculated by obtaining the steady state solution of the reaction–diffusion system Eq. (1), using as starting point the experimental conditions in which the macroscopic  $\text{Ca}^{2+}$  currents were recorded by Braun et al. [8]; that is, an intracellular solution composed of  $1 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  and  $10 \text{ mM}$  EGTA. The resulting initial conditions for all the species included in the model are shown in Table 1. Diffusional and kinetic parameters used in this model are the same as those used in other simulation studies [34,35] and are also shown in Table 1.

The flux across the cell membrane through the  $\text{Ca}^{2+}$  point sources is produced by the macroscopic  $\text{Ca}^{2+}$  currents ( $I_{\text{Ca}}$ ) and the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA). The total flux due to these currents is then given by:

$$J_{\text{Ca}} = \frac{I_{\text{Ca}}}{zF} - J_{\text{PMCA}} + J_{\text{Leak}} \quad (3)$$

where the first term of the right hand side describes the flux due to the  $\text{Ca}^{2+}$  currents (see below),  $z$  is the valence of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $F$  the Faraday's constant. The second term represents the efflux of  $\text{Ca}^{2+}$  due to the PMCA pump, which was simulated as in other models of  $\beta$ -cells [49–51] by a Hill equation with exponent 2:

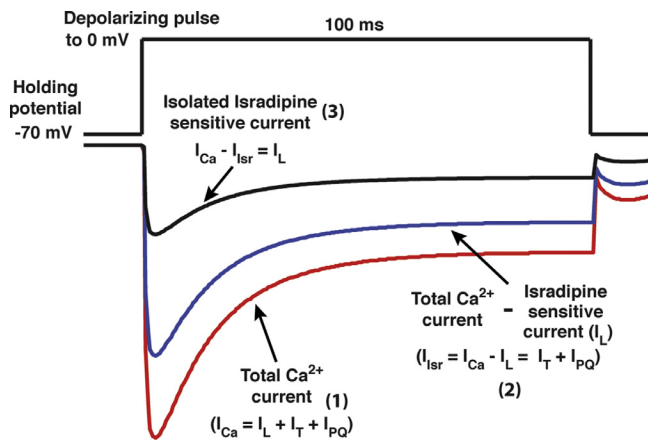
$$J_{\text{PMCA}} = J_{\text{PMCA}}^{\text{max}} \frac{1}{1 + \left( \frac{K_{\text{PMCA}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}}} \right)^2} \quad (4)$$

As in other simulation studies of  $\text{Ca}^{2+}$  buffered diffusion [31,34], to assure the equilibrium of the  $\text{Ca}^{2+}$  pumping system in the basal state (when  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}} = [\text{Ca}^{2+}]_0$ , the basal  $\text{Ca}^{2+}$  concentration), a leak  $\text{Ca}^{2+}$  current was added ( $J_{\text{Leak}}$  in Eq. (3)):

$$J_{\text{Leak}} = J_{\text{PMCA}}^{\text{max}} \frac{1}{1 + \left( \frac{K_{\text{PMCA}}}{[\text{Ca}^{2+}]_0} \right)^2} \quad (5)$$

The total flux given by Eq. (3) is equally distributed among the  $\text{Ca}^{2+}$  point sources considered ( $n_S$ ), resulting in a point flux given by  $J_S = J_{\text{Ca}}/n_S$  (see Fig. 1A). With the exception of the  $\text{Ca}^{2+}$  point sources, a zero flux boundary condition was imposed to all boundaries. It was assumed that the total concentration of both exogenous and endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffers is conserved in the intracellular space.





**Fig. 2.** Voltage clamp experiment and pharmacological blocking agents. Top: During a standard voltage clamp experiment, the membrane potential is maintained at the holding potential from where a depolarizing pulse is applied in order to drive the flux of ions (macroscopic currents) through the cell membrane. Bottom: Diagram of the use of isradipine to isolate the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current from the total  $\text{Ca}^{2+}$  current.

### 2.3. Modeling the $\text{Ca}^{2+}$ currents

#### 2.3.1. Voltage clamp experiments and isolation of ionic currents using pharmacological blocking agents

Whole-cell voltage clamp experiments are used to measure the ionic currents flowing through the cell membrane at a particular membrane potential. In these experiments, the membrane potential is controlled by the experimenter, allowing to measure the ionic currents directly. In addition, in the whole cell configuration, the experimenter is able to manipulate the solution on both the intracellular and extracellular sides of the membrane during the experiments. In a standard voltage clamp experiment, the membrane potential is initially maintained at a value near the resting potential of the cell (called the holding potential) from where a depolarizing pulse is applied and the ionic current produced is recorded. A schematic diagram of a voltage clamp experiment is shown in Fig. 2. The currents recorded in these experiments are called macroscopic currents since they are produced by several channels of different kinds (e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) simultaneously. It is possible, however, to isolate a particular ionic current by using specific pharmacological blocking agents. For example, in order to isolate the macroscopic  $\text{Ca}^{2+}$  current, assuming that the total current is produced by  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels, it is necessary to block the  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  currents by using specific blocking agents for these currents. Furthermore, if the isolated macroscopic  $\text{Ca}^{2+}$  current were produced by the sum of the currents flowing through different types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, it is possible to isolate each of these currents by adding the appropriate blocking agents. The procedure for isolating the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current from the total  $\text{Ca}^{2+}$  current produced by the L, T and P/Q currents is shown schematically in Fig. 2. First, the total  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca}} = I_{\text{L}} + I_{\text{T}} + I_{\text{PQ}}$ ) is recorded (1). After blocking the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (using for example isradipine), the resulting current ( $I_{\text{Isr}} = I_{\text{T}} + I_{\text{PQ}}$ ) is measured (2). Finally, the isolated L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current is obtained by subtracting the current recorded after adding the blocking agent from the total  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca}} - I_{\text{Isr}} = I_{\text{L}}$ , 3). A similar procedure can be followed to isolate the T and P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  currents. Several pharmacological agents are used to study the effect of the different ionic channels of the  $\beta$ -cell on insulin secretion. For a recent review on the subject see Ref. [52].

#### 2.3.2. Electrophysiological recordings of the $\text{Ca}^{2+}$ currents

Expressions and parameters characterizing the L, T, and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents were obtained from an analysis of a set of electrophysiological recordings of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents in human  $\beta$ -cells provided by Dr. Matthias Braun (Alberta Diabetes Institute, Department of

Physiology, University of Alberta, Canada). The  $\beta$ -cells were obtained from human islet preparations retrieved with appropriate ethical approval and clinical consent in the Diabetic Research and Wellness Foundation Human Islet Isolation Facility from nondiabetic, heart-beating donors [8]. These currents were analyzed in a previously published work by Braun et al. [8]. The experimental data analyzed in this work consisted of 13 recordings of both the total and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents, 8 recordings of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current and 3 recordings of the P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  current. As described in their paper [8], Braun et al. performed voltage clamp experiments using the whole cell patch clamp configuration to obtain the current recordings. L, T, and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents were isolated by using  $10 \mu\text{M}$  isradipine,  $1 \mu\text{M}$  T NNC 550396 and  $0.2 \mu\text{M}$  w-agatoxine IVA, respectively (see Section 2.3.1). A full description of both the experimental procedures and ethical aspects can be found in Ref. [8].

Analysis of the electrophysiological data was performed in PulseFit software (HEKA, Lamprecht, Germany).

#### 2.3.3. General description of the models of the $\text{Ca}^{2+}$ currents

$\text{Ca}^{2+}$  currents were modeled using the Hodgkin–Huxley formalism. The expressions and parameters were obtained directly from the electrophysiological recordings of the L-, T- and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents. In general, the currents were modeled as:

$$I_X = g_X m_X h_X (V_m - V_{\text{Ca}}) \quad (6)$$

where  $X$  represents the type of current (T, L or P/Q),  $g_X$  denotes the maximal conductance,  $V_m$  is the membrane potential and  $V_{\text{Ca}}$  is the dynamic reversal potential for  $\text{Ca}^{2+}$  (see below). The activation ( $m_X$ ) and inactivation ( $h_X$ ) functions are governed by the following differential equations:

$$\begin{aligned} \frac{dm_X}{dt} &= \frac{m_{X,\infty} - m_X}{\tau_{mX}} \\ \frac{dh_X}{dt} &= \frac{h_{X,\infty} - h_X}{\tau_{hX}} \end{aligned} \quad (7)$$

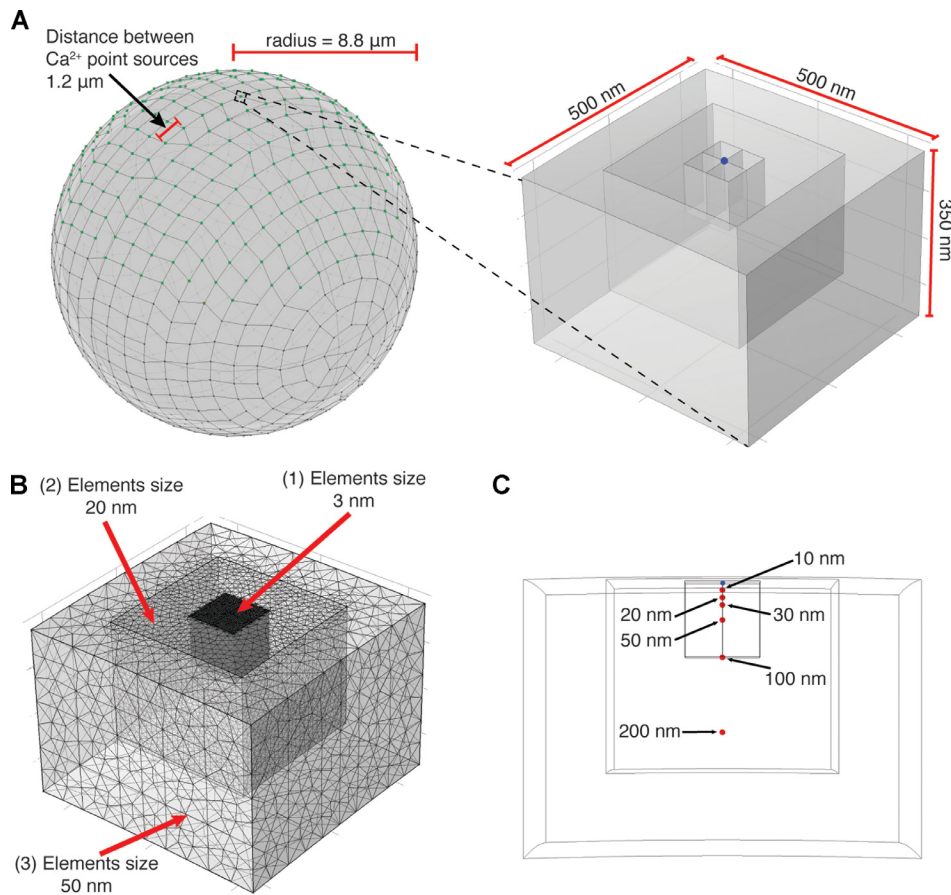
In the above equations,  $m_{X,\infty}$  and  $h_{X,\infty}$  are the gating variables at steady state and  $\tau_{mX}$  and  $\tau_{hX}$  are the activation and inactivation time constants respectively.

Mathematical models of macroscopic currents regularly assume that the reversal potential ( $V_{\text{Ca}}$ ) has a fixed value, thus implicitly considering that both the intracellular and extracellular concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  remain constant, despite the fact that currents of different magnitude are expected to increase the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the submembrane space differently. In contrast, in this model,  $V_{\text{Ca}}$  is calculated dynamically using the Nernst equation:

$$V_{\text{Ca}} = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[\text{Ca}^{2+}]_e}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}}} \right), \quad (8)$$

where  $R$  is the universal gas constant ( $8.314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  is the temperature in Kelvin at which the experiments were performed ( $32\text{--}33 \text{ }^\circ\text{C}$ , i.e.  $305.65 \text{ K}$  [8]),  $z$  is the valence of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $z = 2$ ),  $F$  is the Faraday's constant ( $96,485 \text{ Cmol}^{-1}$ ) and  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  is the extracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  during the experiments ( $[\text{Ca}^{2+}]_e = 2.6 \text{ mM}$  [8]).  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}}$  was defined in Section 2.2.1 and represents the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the nanodomain, obtained from the  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion model at a distance of  $10 \text{ nm}$  from the  $\text{Ca}^{2+}$  point sources in the radial direction. By using a dynamic reversal potential, the driving force causing the movement of  $\text{Ca}^{2+}$  ions across the membrane (i.e. the term  $(V_m - V_{\text{Ca}})$  in Eq. (6)) is adjusted dynamically following the changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}}$ , since  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  was maintained constant during the experiments.





**Fig. 3.** Geometry reduction, meshing and measurement points. **A.** Since the  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains produced in the vicinity of the point sources do not overlap (see Section 3.3), the geometry was reduced in order to focus on a single  $\text{Ca}^{2+}$  point source. **B.** Distribution of the tetrahedral elements composing the mesh. **C.** All the species considered in our simulations were measured at a distance of 10, 30, 50, 100 and 200 nm from the  $\text{Ca}^{2+}$  source in the radial direction.

#### 2.4. Model implementation

The model was implemented in COMSOL Multiphysics 4.4 using the Chemical Engineering Module (COMSOL, AB.) An iterative solver (GMRES) was used with relative and absolute tolerances of  $1\text{E-}2$  and  $1\text{E-}3$  respectively and a variable time step restricted to a maximal value of 0.1 ms. A mesh composed of tetrahedral elements was used for the whole geometry. Preliminary simulations performed using the whole spherical cell (Fig. 3A) during a mesh refinement study showed us that the changes in the concentration of all the species included in the model were perceptible up to a distance of  $\sim 200$  nm from the point sources, indicating that the  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains produced in the submembrane space do not overlap in the high buffering conditions simulated (see Fig. 10 and Section 3.3). Consequently, the geometry of the model was reduced in order to focus on a single  $\text{Ca}^{2+}$  point source, which allowed us to both reduce the computational resources required to solve the model and to increase the spatial resolution near the point source. The reduced geometry used is shown in Fig. 3A. It consists of a small segment of the spherical cell of  $500 \times 500 \times 350$  nm with the point source located at the center of the upper surface. It is important to mention that, even though it is barely perceptible, the curvature of the cell is still considered in the reduced geometry (Fig. 3C).

A mesh consisting of three different element sizes was used for the reduced geometry (Fig. 3B). For the innermost volume (1 in Fig. 3B), where a higher spatial resolution is required, elements of 3 nm were used (621,754 elements). On the other hand, elements of 20 nm (78,229 elements) were used in the intermediate volume (2 in Fig. 3B), while elements of 50 nm (17,919 elements) were used in

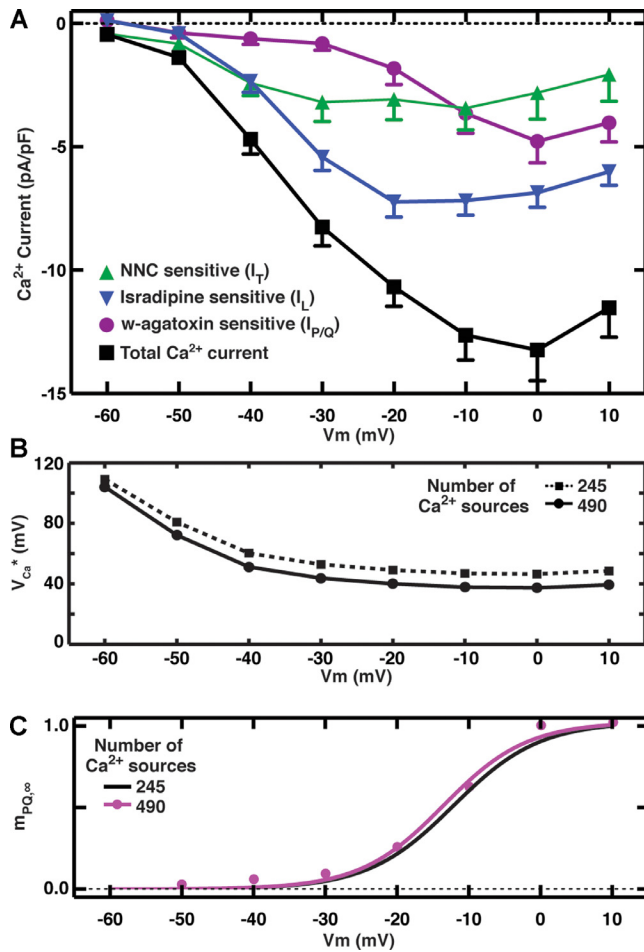
the outermost volume (3 in Fig. 3B). The complete mesh is thus composed of 717,902 tetrahedral elements.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Characterization of the macroscopic $\text{Ca}^{2+}$ currents

L, T and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents were characterized considering their dependence both in the membrane potential and the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the nanodomain. Peak I–V curves obtained from the analysis of the experimental recordings for depolarizing pulses from  $-60$  to  $10$  mV (the physiological range of the action potentials in the human  $\beta$ -cell [8,11,53,54]), using a holding potential of  $-70$  mV are shown in Fig. 4A.  $\text{Ca}^{2+}$  currents became detectable for depolarization to  $-60$  mV. The peak amplitude of the total  $\text{Ca}^{2+}$  current density ( $-13.2 \pm 1.2$  pA/pF) was obtained for a pulse to  $0$  mV. On the other hand, the peak amplitude of the L and P/Q-type currents ( $-7.2 \pm 0.6$  and  $-4.78 \pm 0.874$  pA/pF) were observed during voltage pulses to  $-10$  and  $0$  mV respectively. For the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current, the peak current ( $-3.44 \pm 0.881$  pA/pF) was found for the depolarizing pulse to  $-10$  mV, although a very similar value ( $-3.2 \pm 0.789$  pA/pF) was obtained during the depolarizing pulse to  $-30$  mV.

Conductance curves were obtained as  $g_x = I_x / (V_m - V_{Ca}^*)$ , where  $I_x$  is the peak current ( $X = \text{L, T or PQ}$ ) for the corresponding voltage pulse ( $V$ , ranging from  $-60$  to  $10$  mV) and  $V_{Ca}^*$  is the peak value of the reversal potential estimated from the  $\text{Ca}^{2+}$  transients produced by the average traces of the experimental total  $\text{Ca}^{2+}$  current.  $V_{Ca}^*$  was estimated with Eq. (8), using the experimental traces (shown in Fig. 6A) as the input signal of the diffusion model for the two cases considered



**Fig. 4.** A. Experimental I–V curves for the total (black, squares), isradipine-sensitive (L-type, blue downward pointing triangle), NNC sensitive (T-type, green upward pointing triangle) and w-agatoxin sensitive (P/Q-type, purple circles) currents. Data are presented as means  $\pm$  SEM. B. Estimated values for  $V_{Ca^*}$ , the reversal potential at the peak of the  $Ca^{2+}$  transient produced by the average traces of the total experimental  $Ca^{2+}$  current. C. Steady-state activation function of the  $I_{PQ}$  current ( $m_{PQ,\infty}$ ) for the two cases simulated (245 sources, black line and 490 sources, purple line). Only the data points for the case of 490  $Ca^{2+}$  sources are shown (purple circles). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

(245 and 490  $Ca^{2+}$  point sources, see Fig. 4B). The maximal conductances ( $g_{X,max}$ ) estimated for the case of 490  $Ca^{2+}$  sources were  $g_L = 0.17$  nS/pF,  $g_T = 0.06$  nS/pF and  $g_{PQ} = 0.1$  nS/pF. Slightly higher values were obtained for the case of 245 sources (0.22, 0.07 and 0.14 nS/pF respectively), reflecting the effect of the differences in the reversal potential between the two cases.

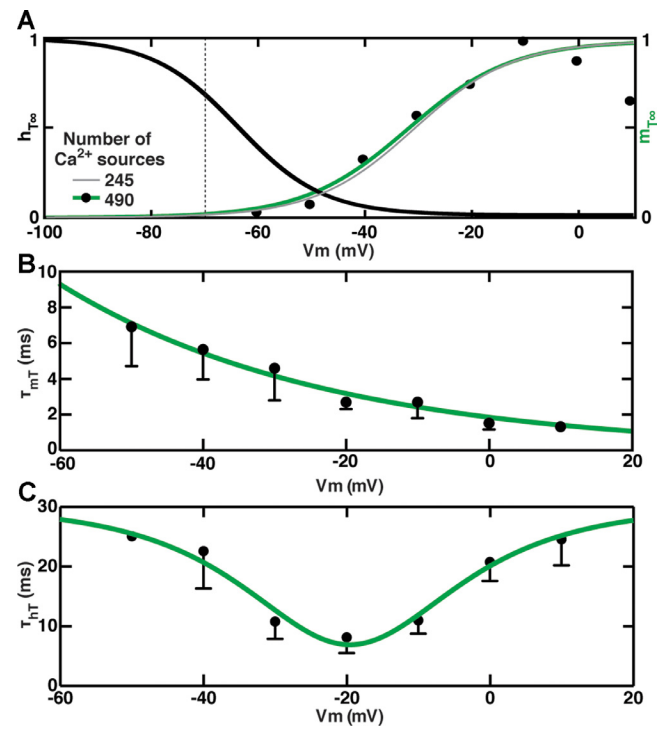
The voltage-dependent steady state activation functions ( $m_{X,\infty}$ ) were obtained from the conductance curves as  $m_{X,\infty} = g_X / g_{X,max}$  and were fitted to Boltzmann functions:

$$m_{X,\infty}(V_m) = \frac{g_X}{g_{X,max}} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{mX}}{k_{mX}}\right)} \quad (9)$$

where  $V_{mX}$  is the voltage of half-maximal activation and  $k_{mX}$  is the slope parameter. In the next subsections the expressions and parameters obtained for each of the currents are described.

### 3.1.1. P/Q-type $Ca^{2+}$ current

As in other models [54,55], it has been assumed that the P/Q current activates instantaneously and that it does not inactivate, which is a reasonable approximation given that it has been observed that the inactivation process of the P/Q current (if any) is slower than in the



**Fig. 5.** A. Steady-state activation function of the  $I_T$  current ( $m_{T,\infty}$ ) was obtained by fitting a Boltzmann function (green line) to the experimental data (black circles) for the case of 490  $Ca^{2+}$  sources. For the case of 245 sources only the fitted curve is shown (grey line). Steady-state inactivation function of the  $I_T$  current ( $h_{T,\infty}$ , black line) as reported by Braun et al. [8] B and C. Experimental data (black circles) and fitted expressions (green line) for the voltage dependent activation (B) and inactivation (C) time constants of the  $I_T$  current. Data are presented as means  $\pm$  SEM. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

other  $Ca^{2+}$  currents (see for example Fig. 5D in Ref. [8]). Consequently, the inactivation function  $h_{PQ}$  is constant equal to 1. The instantaneous activation is given by the steady state activation function  $m_{PQ,\infty}$ , obtained by fitting Eq. (7) to the experimental data (Fig. 4B). The half-maximal values ( $V_{mPQ}$ ) and the slope parameters ( $k_{mPQ}$ ) for the two cases simulated are shown in Table 2. The P/Q-type current ( $I_{PQ}$ ) was therefore described by:

$$I_{PQ} = g_{PQ} m_{PQ,\infty} (V_m - V_{Ca}). \quad (10)$$

**Table 2**

Parameters used in the model of the ionic  $Ca^{2+}$  currents (\* = Adjusted, EXP = Experimental).

Parameter	Value 245 sources	490 sources	Ref.
$I_{PQ}$			
$g_{PQ}$	0.14 nS/pF	0.1 nS/pF	Exp.
$V_{mPQ}$	-12.2 mV	-13.6 mV	Exp.
$k_{mPQ}$	-5.8 mV	-6 mV	Exp.
$I_T$			
$g_T$	0.15 nS/pF	0.14 nS/pF	Exp.
$V_{mT}$	-31.1 mV	-32 mV	Exp.
$k_{mT}$	-9.3 mV	-9.7 mV	Exp.
$V_{hT}$	-64 mV	-64 mV	[8]
$k_{hT}$	8 mV	8 mV	[8]
$I_L$			
$g_L$	0.22 nS/pF	0.17 nS/pF	Exp.
$V_{mL}$	-22.3 mV	-25.5 mV	Exp.
$k_{mL}$	-10 mV	-9 mV	Exp.
$K_{hL}$	5.4 $\mu$ M	3 $\mu$ M	*

As mentioned in Section 3.1, the estimated values of the maximal current  $g_{PQ}$  were 0.14 and 0.1 nS/pF (for 245 and 490 sources respectively). However, these values were slightly adjusted to 0.1 and 0.09 nS/pF in order to fit the experimental I–V curve.

### 3.1.2. T-type $Ca^{2+}$ current

The T-type  $Ca^{2+}$  current was modeled as:

$$I_T = g_T m_T h_T (V_m - V_{Ca}), \quad (11)$$

where the activation and inactivation gating variables ( $m_T$  and  $h_T$  respectively) are voltage dependent and given by Eq. (6) and (7). Estimated parameters for the steady state activation function  $m_{T,\infty}$  Eq. (7) are listed in Table 2. The experimental data points and the fitted curve are presented in Fig. 5A. On the other hand, parameters for the steady state inactivation function ( $h_{T,\infty}$ ) were provided by Braun et al. [8] ( $V_{hT} = -64 \pm 2$  mV,  $k_{hT} = 8 \pm 1$  mV) and were used in this model without modification (see Fig. 5A).

Other models of the human  $\beta$ -cell [54,55] assume that the T-type current activates instantaneously and inactivates with a single time constant. In our model, we have considered the dependence on voltage of both the activation and inactivation time constants ( $\tau_{mT}$  and  $\tau_{hT}$ ), which were obtained by fitting exponential functions to the activation and inactivation segments of the electrophysiological recordings. Expressions describing the relationship between the time constants and voltage were obtained by fitting empirical equations to the average time constants. As illustrated in Fig. 5B, the voltage-dependent activation time constants ( $\tau_{mT}$ ) show a monotonic behavior in the range of  $-60$  to  $10$  mV, decreasing from a value of  $6.9 \pm 2.2$  ms to  $1.3 \pm 0.22$  ms respectively. This behavior was described by the function:

$$\tau_{mT} = a \exp \left[ \frac{b - V_m}{c} \right] \quad (12)$$

with  $a = 1$  ms,  $b = 23.77$  mV,  $c = 37.58$  mV. The fitted curve is presented in Fig. 5B.

On the other hand, inactivation time constants ( $\tau_{hT}$ ) decreased in the range of  $-50$  to  $-20$  mV and increased for voltages between  $-20$  and  $10$  mV, with a minimal value of  $8.15 \pm 2.7$  ms at  $-20$  mV and maximal values of  $25.1$  and  $24.6 \pm 4.37$  ms for  $-50$  and  $10$  mV respectively (Fig. 5C). A good fit to the experimental data was obtained with the expression:

$$\tau_{hT} = a - \frac{b}{0.16 \exp \left[ \frac{V_m + c}{d} \right] + 0.16 \exp \left[ \frac{-(V_m + c)}{d} \right]}, \quad (13)$$

with  $a = 30$  ms,  $b = 7.43$  ms,  $c = 19.52$  mV and  $d = 13.13$  mV (see Fig. 5C).

As mentioned above (Section 3.1), the estimated values of the maximal conductance for the T-type  $Ca^{2+}$  current were 0.06 and 0.07 nS/pF for the models with 490 and 245 sources respectively. As it can be seen in Fig. 5A, where  $h_{T,\infty}$  is shown,  $\sim 30\%$  of the channels are already in an inactivated state at the holding potential ( $-70$  mV). In addition, when the activation gating variable ( $m_T$ ) reaches its maximal value, the inactivation process is already in progress, such as the open probability of the T-type  $Ca^{2+}$  channels only increases to  $\sim 0.55$  when the peak current is reached. All these effects caused the underestimation of the maximal conductance of the T-type  $Ca^{2+}$  current, which was adjusted to a value of 0.14 nS/pF for the case of 490 sources and 0.15 nS/pF for the case of 245 sources to fit the experimental I–V curve.

### 3.1.3. L-type $Ca^{2+}$ current

L-type current is activated by changes in membrane potential and inactivated mainly by the increase of the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, although a voltage-dependent component is often observed [56]. In our model, the L-type  $Ca^{2+}$  current is given by:

$$I_L = g_L m_L h_L (V_m - V_{Ca}). \quad (14)$$

Activation of the L-type current is only voltage-dependent ( $m_L$ ), thus it is described by Eqs. (6) and (7). The estimated parameters of the Boltzmann relation describing the steady state activation function ( $m_{L,\infty}$ ) are listed in Table 2 for the two cases (490 and 245  $Ca^{2+}$  sources). On the other hand, the voltage-dependent activation time constants decreased monotonically from a value of 3.85 ms to  $0.48 \pm 0.07$  ms for depolarizing pulses in the range of  $-40$  and  $10$  mV respectively. This behavior was modeled as:

$$\tau_{mL} = a + b \exp \left[ \frac{c - V_m}{d} \right] \quad (15)$$

with  $a = 0.25$  ms,  $b = 1$  ms,  $c = -22.9$  mV,  $d = 15$  mV. Fig. 6B shows the fit of expressions 15 and 16 to the experimental data points.

Other models have used mathematical approximations to express the  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation of the L-type current, assuming that the  $Ca^{2+}$  concentration is approximately proportional to the  $Ca^{2+}$  current [54,55,57], as proposed by Sherman et al. in the “domain model” [57]. This approximation is used regularly in whole cell models, where the objective is to simulate the electric behavior of the cell. On the other hand, Fridlyand et al. [53] neglected the effects of  $Ca^{2+}$  on the inactivation of the L-type  $Ca^{2+}$  current and modeled it as a voltage-dependent current. In our model, we have considered the dependency of both the inactivation function ( $h_L$ ) and the inactivation time constants ( $\tau_{hL}$ ) on the changes in  $[Ca^{2+}]_{ND}$ . Given the lack of measurements of  $Ca^{2+}$  dynamics in human  $\beta$ -cells we used the model of buffered diffusion of  $Ca^{2+}$  (described in Section 2.2) in conjunction with the average experimental recordings of the total  $Ca^{2+}$  current in order to obtain the  $Ca^{2+}$  dependent expressions and parameters characterizing the inactivation dynamics of the L-type  $Ca^{2+}$  current. The inactivation expressions ( $h_{L,\infty}$  and  $\tau_{hL}$ ) were obtained as follows: Average experimental traces of the total  $Ca^{2+}$  current ( $n = 10$ , Fig. 6A) were used to drive the flux of  $Ca^{2+}$  into the simulated three-dimensional geometry ( $I_{Ca}$  in Eq. (3)) for the two cases considered (245 and 490  $Ca^{2+}$  sources). As illustrated in Fig. 6A (bottom), the profile of  $[Ca^{2+}]_{ND}$  resembles the time course of the average total  $Ca^{2+}$  currents. For each pulse of voltage (from  $-60$  to  $10$  mV) a value for the steady state inactivation function ( $h_{L,\infty}$ ) was first obtained as  $I_{SS}/I_{peak}$  (Fig. 6A top), where  $I_{SS}$  is the average experimental current near the end of the pulse and  $I_{peak}$  is the corresponding peak current. Next, we related the values of  $h_{L,\infty}$  with the estimated concentration of  $Ca^{2+}$  in the nanodomain at the end of the pulses (indicated as  $[Ca^{2+}]_{ND}^{SS}$  in Fig. 6A), in order to obtain an approximation of the level of inactivation at steady state of the L-type current as a function of  $[Ca^{2+}]_{ND}$ . Finally, the following Hill equation was fitted to the resulting simulated data points:

$$h_{L,\infty} = 0.15 + \frac{1 - 0.15}{1 + \left( \frac{[Ca^{2+}]_{ND}}{K_{hL}} \right)^3} \quad (16)$$

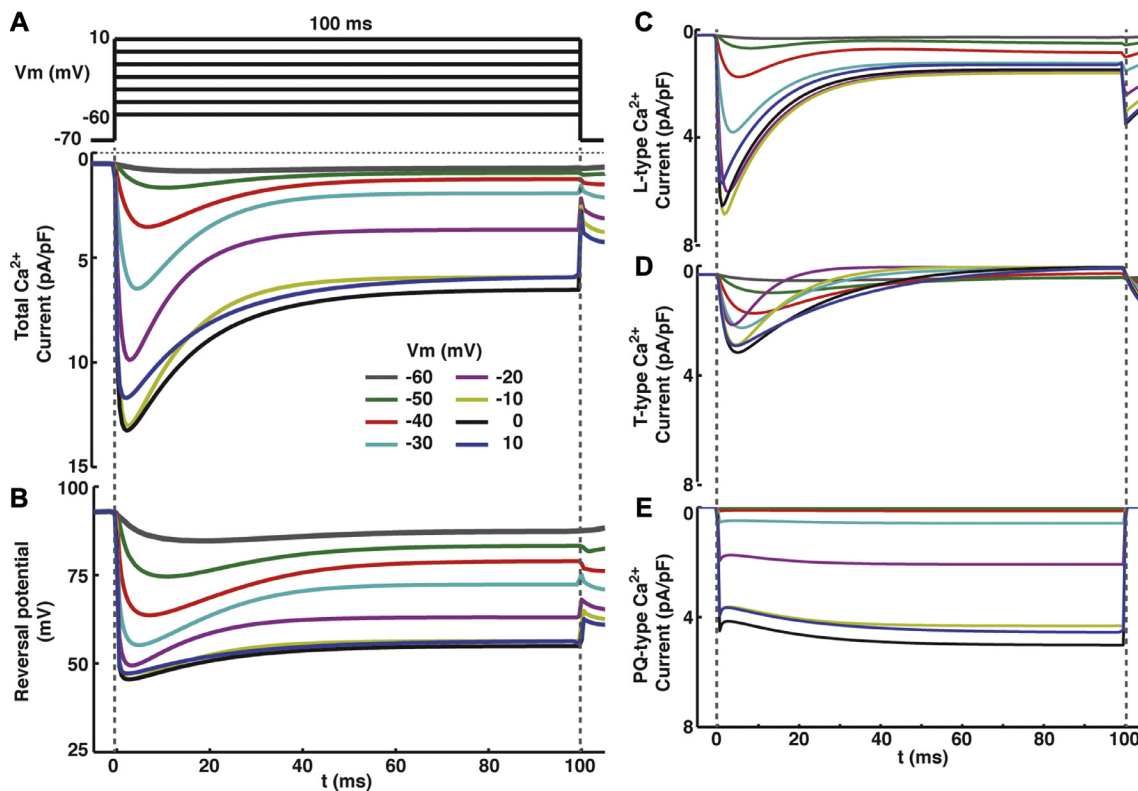
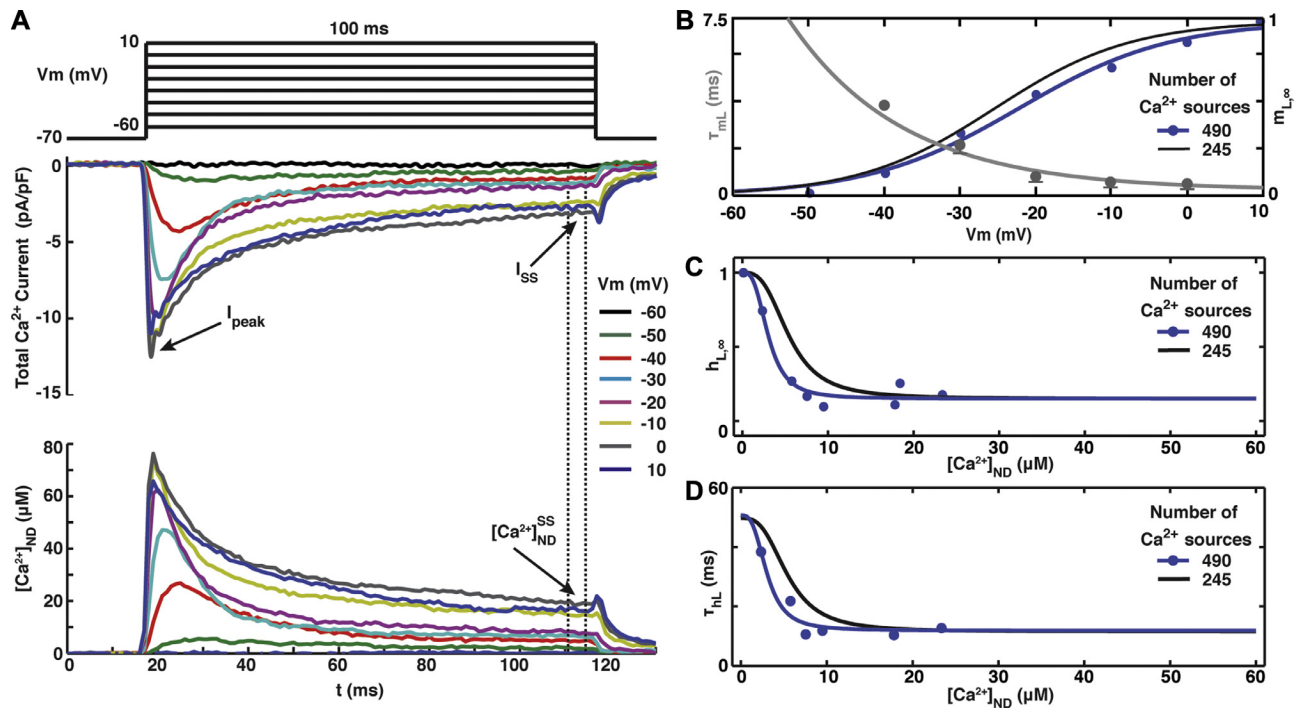
where  $K_{hL}$  is the dissociation constant in units of concentration and denote the concentration of  $Ca^{2+}$  at which half of the L-type  $Ca^{2+}$  channels are inactivated at steady state. From the fit of Eq. (16) to the simulated data points (shown in Fig. 6C), a value of  $K_{hL} = 3 \mu\text{M}$  was estimated for the model with 490 sources, while a higher value ( $K_{hL} = 5.4 \mu\text{M}$ ) was estimated for the model with 245 sources

As it is usually assumed in the models of the L-type currents [56], the same values for the dissociation constants ( $K_{hL}$ ) were used in the expression describing the inactivation time constants as a function of  $[Ca^{2+}]_{ND}$ :

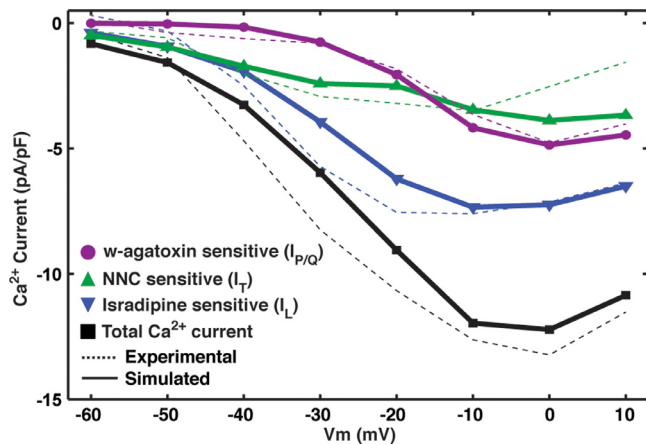
$$\tau_{hL} = a + \frac{b}{0.017 \left( 1 + \left( \frac{[Ca^{2+}]_{ND}}{K_{hL}} \right)^3 \right)}, \quad (17)$$

with  $a = 11.5$  ms and  $b = 0.7$  ms. The fit of the above expression to the experimental data is shown in Fig. 6D.





**Fig. 7.** A. Simulated total  $\text{Ca}^{2+}$  current of human  $\beta$ -cells due to voltage pulses from  $-60$  to  $10$  mV. B. Temporal course of the reversal potential for the simulation shown in A. Note that A and B share the same time scale. Simulated L (C), T (D) and P/Q (E) type currents produced by the same protocol shown in A.



**Fig. 8.** I–V curves for the simulated L, T and P/Q currents for the model with 490  $\text{Ca}^{2+}$  sources (solid lines). The experimental I–V curves shown in Fig. 4A were also included (dashed lines) for comparison.

### 3.1.4. Simulation of the $\text{Ca}^{2+}$ currents in voltage clamp conditions

Using the models of the currents described in previous sections, we performed simulations reproducing the experimental protocols followed by Braun et al. [8], consisting of 100 ms depolarizing pulses from a holding potential of  $-70$  mV to voltages from  $-60$  to  $10$  mV. The simulated  $\text{Ca}^{2+}$  currents, as well as the temporal course of the dynamic  $V_{\text{Ca}}$  are shown in Fig. 7. As mentioned above (Table 1), the simulations were performed considering an initial cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of  $\sim 20$  nM, which is translated to a reversal potential of  $\sim 155$  mV (Eq. 8 with  $[\text{Ca}^{2+}]_e = 2.6$  mM and  $T = 32.5$  °C, see Section 2.3.3). However, according to our simulations, such a high reversal potential is already capable of driving the movement of  $\text{Ca}^{2+}$  from the extracellular to the intracellular space at resting conditions, despite the low percentage of open channels (L-type: 7%, T-type: 13% and P/Q-type: 0.08%). This is illustrated in Fig. 7A, where a steady total current of approximately  $-0.7$  pA/pF, mostly produced by the L and T-type channels, can be appreciated before the voltage pulse is applied. As a consequence, the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the nanodomain increases (e.g. reaching  $\sim 2$   $\mu\text{M}$  for the case of 490 sources), thus shifting the reversal potential to lower values ( $\sim 95$  mV), as shown in Fig. 7B. The same effect was produced in the case of 245 sources, although the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the nanodomain at resting conditions was considerable higher ( $\sim 5$   $\mu\text{M}$ ), thus resulting in a reversal potential of  $\sim 83$  mV (not shown).

By comparing the simulated currents plotted in Fig. 7A to the experimental currents shown in Fig. 5A in Ref. [8] and the simulated I–V curves to those obtained from the analysis of the experimental data (Fig. 8) we can say that our model satisfactorily reproduces both the dynamics and magnitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents.

### 3.2. Point sources vs. averaged flux over the cell surface: comparison of the $\text{Ca}^{2+}$ transients

Most of the models that simulate the spatiotemporal distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the intracellular space assume that the  $\text{Ca}^{2+}$  channels are distributed uniformly over the whole cell membrane (see for instance Refs. [31–33]), implying that the cytosol is surrounded by a surface working as a  $\text{Ca}^{2+}$  source. In this scenario, the total  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca}}$ ) produces a flux of  $\text{Ca}^{2+}$  ions given by  $J_{\text{Area}} = I_{\text{Ca}}/(zFA)$ , where  $z$  is the valence of the  $\text{Ca}^{2+}$  ion ( $z = 2$ ),  $F$  is the Faraday constant and  $A$  is the surface area of the cell membrane. A more realistic approach is to consider that the flux of  $\text{Ca}^{2+}$  occurs through a certain number of point sources ( $n_s$ ), which explicitly represent the  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the cell membrane. In the latter case, the surface area of the point sources is negligible when compared to the surface area of the whole cell mem-

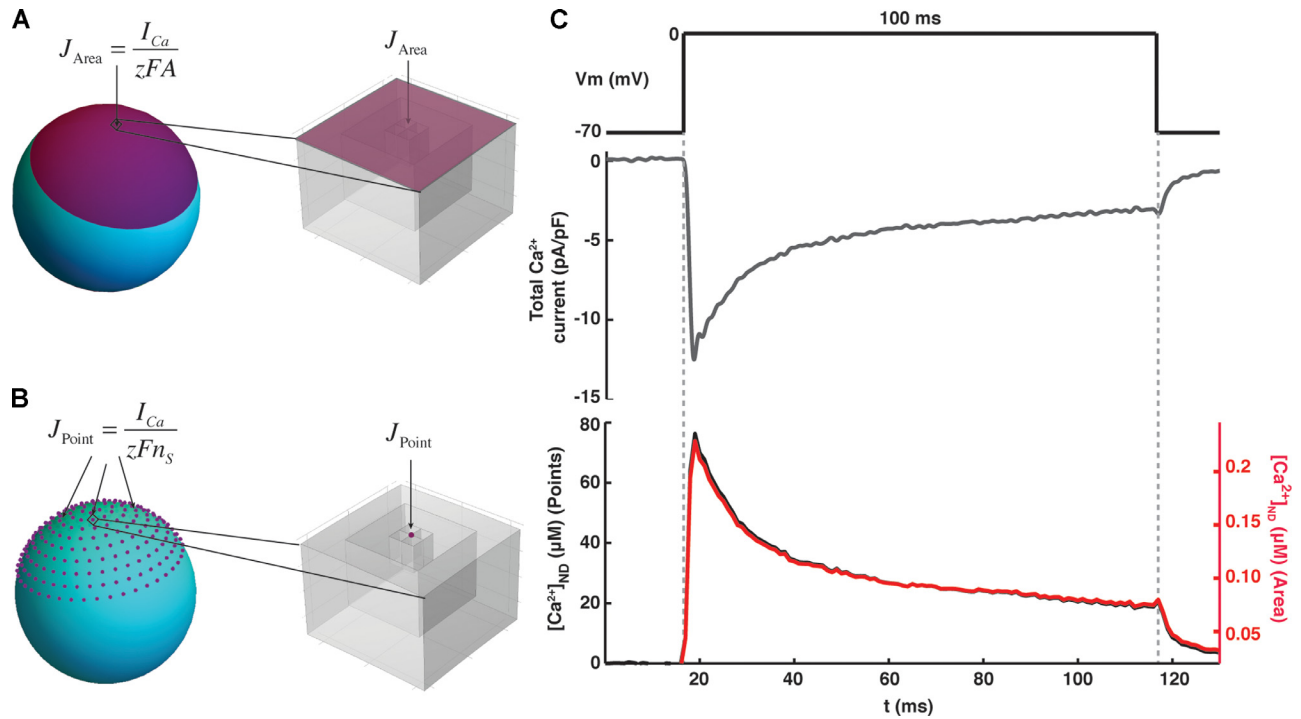
brane and the flux of  $\text{Ca}^{2+}$  produced by the total  $\text{Ca}^{2+}$  current through each of the point source is given by  $J_{\text{point}} = I_{\text{Ca}}/(zFn_s)$ .

In order to compare the behavior of  $\text{Ca}^{2+}$  in the submembrane space during a voltage clamp experiment in high buffering conditions (10 mM EGTA), simulations of the spatiotemporal distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the reduced geometry (see Section 2.4) were performed using both modeling approaches (Fig. 9A–B) using the average experimental trace of the total  $\text{Ca}^{2+}$  current obtained for a voltage pulse to 0 mV as the input signal driving the influx of  $\text{Ca}^{2+}$  to the intracellular space ( $I_{\text{Ca}}$ ). First, we simulated the  $\text{Ca}^{2+}$  transient produced by the flux of  $\text{Ca}^{2+}$  through one of the 490 point sources ( $n_s = 490$ , Fig. 9A) distributed in one pole of the cell comprising a cell surface of  $\sim 555$   $\mu\text{m}^2$  (see Section 2.2.1). Then, a simulation of the transient caused by the flux of  $\text{Ca}^{2+}$  through a surface area  $A$  of  $\sim 555$   $\mu\text{m}^2$  (the same area comprising the 490 point sources distributed over the spherical cell) was performed (Fig. 9B).

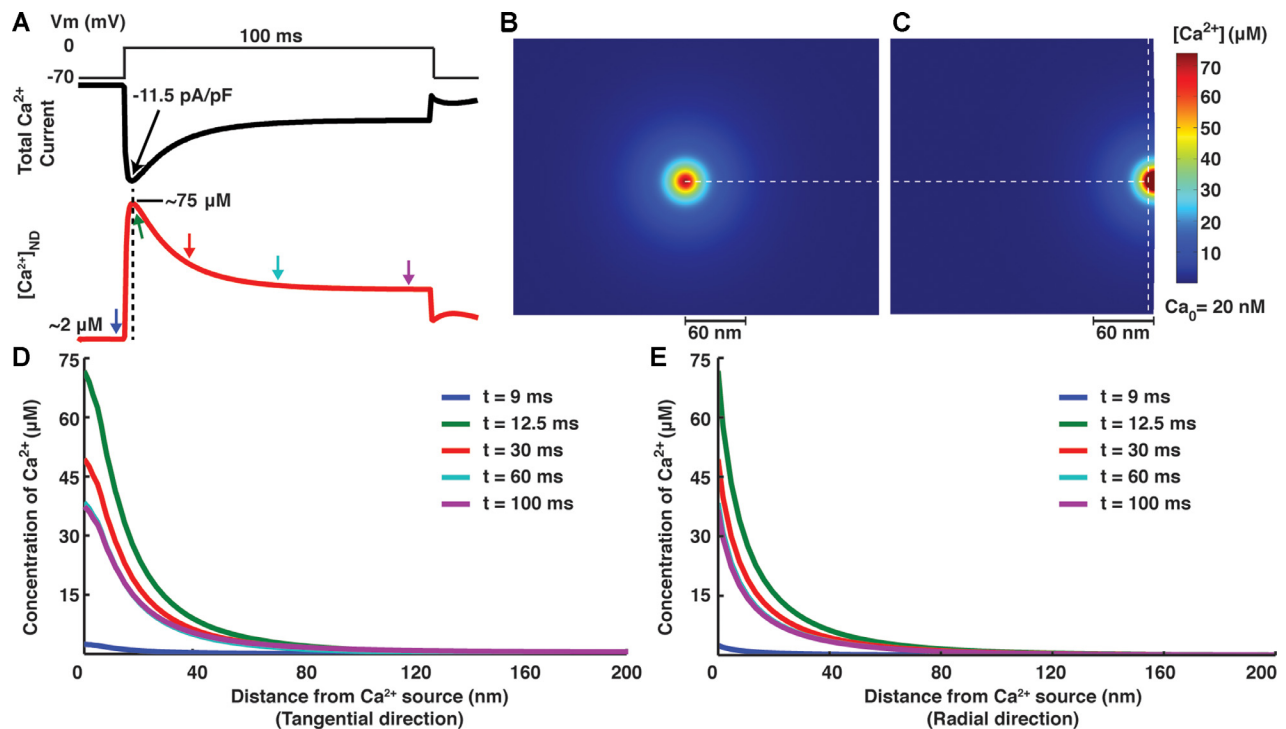
As it can be seen in Fig. 9C, both approaches yielded significant different results in terms of the magnitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  transient produced (measured at the nanodomain, 10 nm away from the  $\text{Ca}^{2+}$  point source). While the transient driven by the flux of  $\text{Ca}^{2+}$  through the point source reaches a maximal  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of 76  $\mu\text{M}$ , the same stimulus produced a considerably lower peak of  $\text{Ca}^{2+}$  (0.2  $\mu\text{M}$ ) when the flux through the cell surface was considered. These results highlight the importance of considering a realistic representation of the location and distribution of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the models of the spatiotemporal distribution of  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.3. $\text{Ca}^{2+}$ nanodomains do not overlap in high buffering conditions

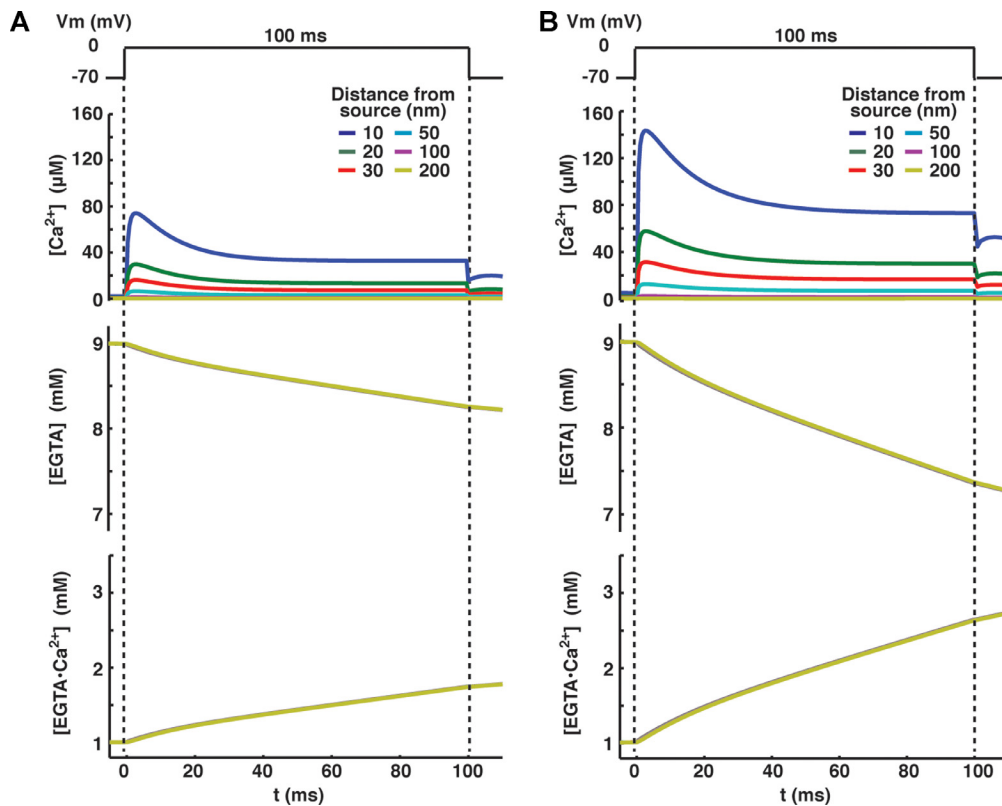
The distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the intracellular space during voltage clamp experiments was simulated by coupling the models of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents with a model of buffered diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  in a spherical cell. One of the advantages of using a three-dimensional geometry is that it allows us to test the effect of the distribution and separation of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels over the cell membrane and to observe the diffusion process both in the radial and tangential directions. We evaluated if the  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains formed near the  $\text{Ca}^{2+}$  point sources overlap forming submembrane domains. In Fig. 10 we show the distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the tangential and radial directions (Fig. 10B and C respectively) at the time at which the maximal  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}}$  due to the total  $\text{Ca}^{2+}$  current produced by a depolarizing pulse to 0 mV is achieved for the case of 490  $\text{Ca}^{2+}$  sources (Fig. 10A). Despite the high buffering conditions (10 mM EGTA),  $\text{Ca}^{2+}$  gradients are generated both in the tangential (Fig. 10B and D) and radial (Fig. 10C and E) directions. Assuming that  $\text{Ca}^{2+}$  channels group forming channel clusters and that the distance between  $\text{Ca}^{2+}$  sources is 1.2  $\mu\text{m}$ , as estimated by Barg et al. [38], it can be concluded that in voltage clamp conditions the  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains do not overlap. Fig. 10D displays the  $\text{Ca}^{2+}$  transients in the tangential direction along the length of the horizontal white dashed line shown in Fig. 10B at different times of the voltage clamp experiment (indicated by the arrows in Fig. 10A) for the case of 245  $\text{Ca}^{2+}$  sources.  $\text{Ca}^{2+}$  transients reached high levels of  $\text{Ca}^{2+}$  within a few nanometers off the  $\text{Ca}^{2+}$  point source at all times shown after the onset of the depolarizing pulse (e.g. 143.5  $\mu\text{M}$  at 10 nm from the source at  $t = 12.5$  ms), decaying rapidly as the distance from the source increased (e.g. 8  $\mu\text{M}$  at 50 nm and 0.1  $\mu\text{M}$  at 100 nm from the source for  $t = 12.5$  ms). Similarly, the  $\text{Ca}^{2+}$  transients produced at different times in the radial direction along the horizontal dashed line shown in Fig. 10C are displayed in Fig. 10E, showing practically the same behavior as in the tangential direction. The same results were obtained for the case of 490  $\text{Ca}^{2+}$  sources (not shown), although lower  $\text{Ca}^{2+}$  levels were reached as expected. Thus, in the high buffering conditions simulated, the  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains do not overlap, which allows us to conclude that similar nanodomains are formed at the vicinity of the  $\text{Ca}^{2+}$  point sources. This result indicates that under these conditions a given cluster is not influenced



**Fig. 9.** Point sources vs. averaged flux over the cell surface. Driving the flux of  $\text{Ca}^{2+}$  over the cell surface (A) and a single point source (B) in the reduced geometry. C. The averaged trace of the experimental total  $\text{Ca}^{2+}$  current in response to a voltage pulse to 0 mV (top) produces  $\text{Ca}^{2+}$  transients with a difference in amplitude of almost three orders of magnitude (bottom). In C (bottom) the left axis indicate the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  reached due to the flux through the point source and the right axis indicates the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  reached due to the averaged flux of  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Fig. 10.**  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains do not overlap in human  $\beta$ -cells in high buffering conditions. A. Total  $\text{Ca}^{2+}$  current and the  $\text{Ca}^{2+}$  transient produced by a depolarizing pulse to 0 mV. At  $t = 12.5$  ms the peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is reached as indicated by the dashed line. B.  $\text{Ca}^{2+}$  gradient produced in the tangential direction. The plane shown passes through the vertical white dashed line shown in C. C. A cross section showing the  $\text{Ca}^{2+}$  gradient in the radial direction. D.  $\text{Ca}^{2+}$  transients produced at different times in the tangential direction along the white dashed line shown in B. E.  $\text{Ca}^{2+}$  transients produced at different times in the radial direction along the horizontal white dashed line shown in C. Note that in D and E the color legend correspond to the arrows indicating the times selected in A.



**Fig. 11.** Simulations of a depolarizing pulse from the holding potential of  $-70$  mV to a test voltage of  $0$  mV for a cell with  $490$  (A) and  $245$  (B)  $\text{Ca}^{2+}$  point sources when EGTA ( $10$  mM) was the only  $\text{Ca}^{2+}$  buffer included. For both cases the spatiotemporal distribution of  $[\text{Ca}^{2+}]$  (top),  $[\text{EGTA}]$  (middle) and  $[\text{EGTA}\cdot\text{Ca}^{2+}]$  (bottom) are shown.

by nearby  $\text{Ca}^{2+}$  point sources. Other authors have reported the formation of submembrane domains of  $\text{Ca}^{2+}$  due to the overlapping of the nanodomains produced in the mouth of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels. For example, submembrane domains were produced by simulations performed in a model of a chromaffin cell [34] where  $\text{Ca}^{2+}$  channels were separated by a distance of  $300$  nm (in presence of  $500$   $\mu\text{M}$  of fura-2). Considering that the estimated separation between the  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the  $\beta$ -cell is  $\sim 1.2$   $\mu\text{m}$  [38] (four times greater than in the model of the chromaffin cell), in our simulations in high buffering conditions the nanodomains did not overlap, although a  $\text{Ca}^{2+}$  gradient was produced in the immediate vicinity of  $\text{Ca}^{2+}$  point sources both in the radial and tangential directions.

#### 3.4. Spatiotemporal distribution of $\text{Ca}^{2+}$ in the vicinity of the cell membrane

An important limitation of the models of buffered diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  is that the stimulus driving the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into the cell is given by a square pulse of current or a simple function that emulates the temporal course of the real currents. Gil et al. [35] showed that the shape of the currents have important implications in determining both the magnitude and the temporal localization of the peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. In order to simulate the dynamics of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  more accurately, we modeled each of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents of the human  $\beta$ -cell based entirely on electrophysiological recordings.

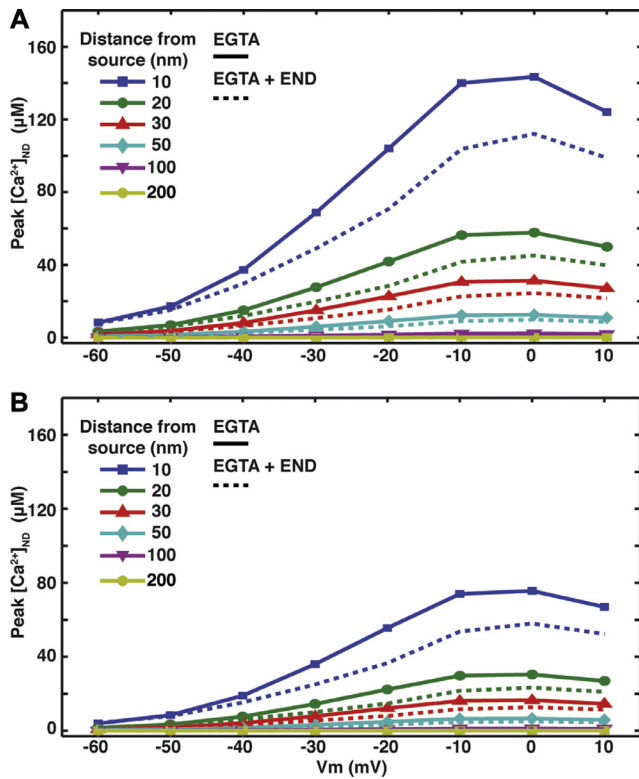
The  $\text{Ca}^{2+}$  transients produced by the voltage pulse to  $0$  mV in presence of  $10$  mM EGTA are shown in Fig. 11 for the cases of  $490$  (Fig. 11A) and  $245$  (Fig. 11B) sources. Two phases of the dynamics of  $\text{Ca}^{2+}$  can be distinguished, resembling the temporal course of the total  $\text{Ca}^{2+}$  current. During the first phase,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increases up to the peak concentration from where it decreases, leading to the second phase, in which a concentration gradient is sustained due to the continuous influx of  $\text{Ca}^{2+}$  through the VDCCs.

In spite of the high concentration of unbound EGTA ( $\sim 9$  mM), the total  $\text{Ca}^{2+}$  current is able to generate a considerable increase in the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the immediate vicinity of the cell membrane. For the case of  $490$  sources, the estimated peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentration at  $10$ ,  $30$ ,  $50$  and  $100$  nm from the sources were  $75.6$ ,  $16.5$ ,  $6.6$  and  $1.2$   $\mu\text{M}$  respectively. On the other hand, for the case of  $245$   $\text{Ca}^{2+}$  sources, the estimated peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations were  $143.5$ ,  $31.3$ ,  $12.6$  and  $2.3$   $\mu\text{M}$ , at  $10$ ,  $30$ ,  $50$  and  $100$  nm from the  $\text{Ca}^{2+}$  sources respectively. In both cases the peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations measured at  $30$ ,  $50$  and  $100$  nm were reduced due to the effect of the buffered diffusion by an amount of  $\sim 78\%$ ,  $91\%$  and  $99\%$  respectively when compared to the values obtained at  $10$  nm from the sources (Fig. 11).

It can be observed that the binding of  $\text{Ca}^{2+}$  to EGTA (i.e. the formation of  $[\text{EGTA}\cdot\text{Ca}^{2+}]$ ) is not fast enough to follow the temporal course of the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 11). As a result,  $[\text{EGTA}\cdot\text{Ca}^{2+}]$  increases at all the measurement points until the pulse ends, since there is a continuous flux of  $\text{Ca}^{2+}$  into the cell during the  $100$  ms voltage pulse. This results in a sustained  $\text{Ca}^{2+}$  gradient near the end of the voltage pulse, where, for the case of  $490$   $\text{Ca}^{2+}$  sources, the estimated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  decreases from  $32.7$   $\mu\text{M}$  at  $10$  nm to  $3$  and  $0.6$   $\mu\text{M}$  at  $50$  and  $100$  nm respectively (Fig. 11A). Similarly, for the case of  $245$   $\text{Ca}^{2+}$  sources, estimated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  during the second phase of  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics (the sustained gradient) decreased from  $73.2$   $\mu\text{M}$  at  $10$  nm to  $6.9$  and  $1.4$   $\mu\text{M}$  at  $50$  and  $100$  nm respectively (Fig. 11B). Peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations obtained during voltage clamp experiments for both cases at different depths are shown in Fig. 12.

$\text{Ca}^{2+}$  measurements in human  $\beta$ -cells have not been performed yet; however a few studies have reported  $\text{Ca}^{2+}$  measurements in rodent  $\beta$ -cells and a  $\beta$ -cell line. For instance, Theler et al. [24] measured a submembrane  $\text{Ca}^{2+}$  lower than  $1$   $\mu\text{M}$  in rat  $\beta$ -cells stimulated with glucose. Slightly higher values ( $\sim 2$   $\mu\text{M}$ ) were measured in the submembrane domain of MIN6 cells by Pinton et al. [58] when depolarizing with KCl. On the other hand, Bokvist et al.





**Fig. 12.** A,B. Peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations obtained during voltage clamp experiments for depolarizing pulses from  $-60$  to  $10$  mV at different depths from the point sources for the cases of 245 (A) and 490 (B) sources. Dashed lines indicate the results of the simulations including  $10$  mM EGTA and  $0.5$  mM END. Solid lines show the results of the simulations performed in presence of  $10$  mM EGTA only.

[17] estimated a maximal submembrane concentration of  $\sim 2.3$   $\mu\text{M}$  after a  $200$  ms depolarization in mice  $\beta$ -cells. Other studies have reported higher  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. For instance, Ammala et al. [59] measured an average cytosolic concentration lower than  $2$   $\mu\text{M}$  in response to short depolarizations of  $20$  ms, while Quesada et al. [25] measured a higher  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of  $6.7$   $\mu\text{M}$  at  $500$  nm from the membrane. It is worth noting that in contrast to our simulations that were performed in high buffering conditions, the experimental studies mentioned were made in presence of lower concentrations of exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffers (e.g.  $0.01$  mM EGTA +  $0.2$   $\mu\text{M}$  Fura-2 in Ref. [17] or  $0.5$   $\mu\text{M}$  Fura-2 in Ref. [24]).

It is well known that the spatial resolution of the optical microscopy techniques is not high enough to perceive the changes of  $\text{Ca}^{2+}$  near the mouth of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels (within a few nanometers). In fact, even in the best possible experimental conditions, the maximal spatial resolution would be greater than  $100$  nm [47]. Since practically all the studies mentioned above used optical microscopy to measure the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$ , it can be assumed that the values of  $\text{Ca}^{2+}$  reported correspond to the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  at a distance of hundreds of nanometers. It is worth noting that our simulations yield concentration values at a distance of  $\sim 100$  nm similar to the concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  reported experimentally (a few  $\mu\text{M}$ ). Our simulations predict that peak concentration values in the range of  $\sim 76$ – $143$   $\mu\text{M}$  at a distance of  $10$  nm from the  $\text{Ca}^{2+}$  sources even under high buffering conditions. Interestingly, the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  at the exocytosis sites in neurons, which are located at the vicinity of the cell membrane is in the range of  $\sim 10$ – $300$   $\mu\text{M}$  [47], in agreement with our simulations.

As has been explained above, in our model the inactivation process of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel is regulated by the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  measured at a distance of  $10$  nm from the  $\text{Ca}^{2+}$  sources (see

Section 2.2.1). In this regard, it has been estimated that the inactivation mechanism of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel responds to localized changes in  $\text{Ca}^{2+}$  of an amplitude of  $\sim 100$   $\mu\text{M}$  [45,60], which agrees with the range of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration predicted by the model.

It is known that the diffusible endogenous buffers are washed away during whole cell patch clamp experiments [32]. However, some authors have presumed the presence of fixed endogenous buffers in this experimental conditions in neuroendocrine cells [61,62]. It is thought that the fixed endogenous buffers are characterized by a faster binding constant when compared to the binding constant for the EGTA. To evaluate the effect of the fixed endogenous buffers both on the peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and the dynamics of the  $\text{Ca}^{2+}$  transients in human  $\beta$ -cells in voltage clamp conditions, simulations were performed including  $10$  mM EGTA and  $0.5$  mM of a fixed endogenous buffer (END) using the standard kinetic parameters shown in Table 1. As in the case when EGTA was the only  $\text{Ca}^{2+}$  buffer considered, when the endogenous buffer was added, an increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was perceptible up to a distance of  $\sim 200$  nm from the  $\text{Ca}^{2+}$  sources, reflecting the effect of the high concentration of EGTA, which limits the propagation of the  $\text{Ca}^{2+}$  throughout the intracellular space. As depicted in Fig. 13, the effect of the fixed endogenous buffer was only relevant on the peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. For the maximal total current, obtained for the pulse to  $0$  mV, the peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentration decreased considerably when compared to the values obtained when only the EGTA was included for the two cases simulated. Fig. 12 (dashed lines) summarizes the effect of the endogenous buffer on the peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentration for all the voltage pulses applied. This effect can be explained by the fact that the endogenous buffer is capable of binding  $\text{Ca}^{2+}$  fast enough to follow the temporal course of  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 13).

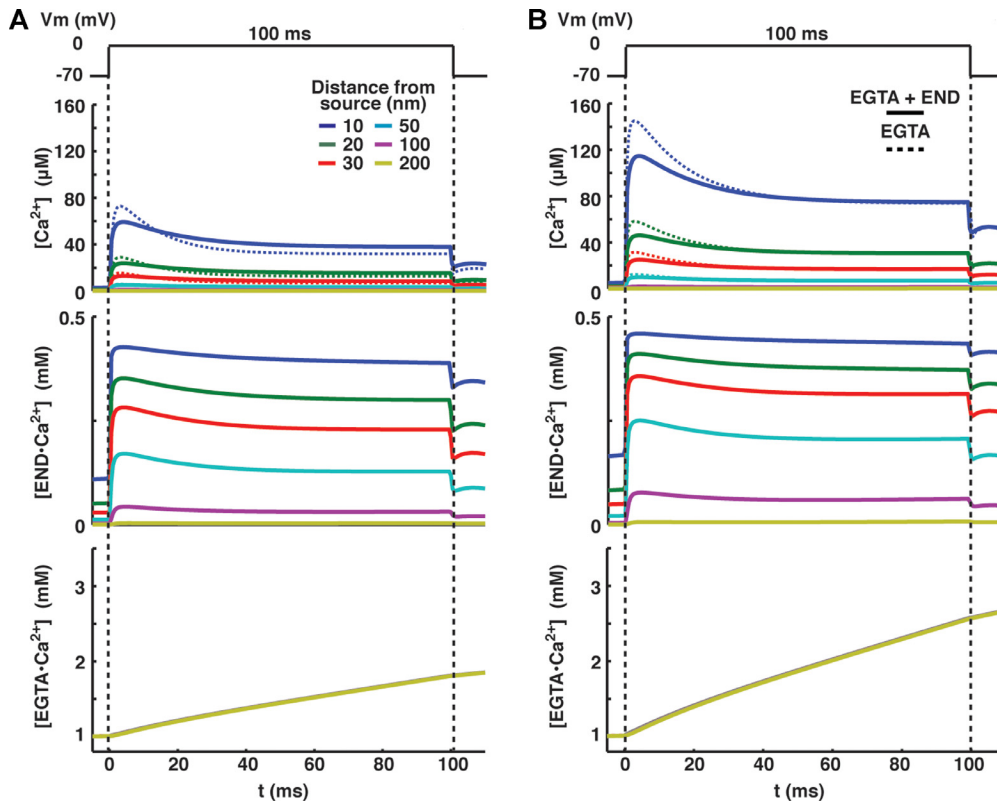
It is important to mention that the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) included in the model as a  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion mechanisms (Eq. 4) did not have a relevant effect on the  $\text{Ca}^{2+}$  transients during the simulations of voltage pulses of  $100$  ms, as was also observed in other simulation studies [31,32]. In fact, Sala et al. [31], in their model of a spherical neuron, observed an important effect of the PMCA on the  $\text{Ca}^{2+}$  transients only when they increased the maximal rate of extrusion tenfold.

### 3.5. Peak $[\text{Ca}^{2+}]_{ND}$ produced by the isolated $\text{Ca}^{2+}$ currents

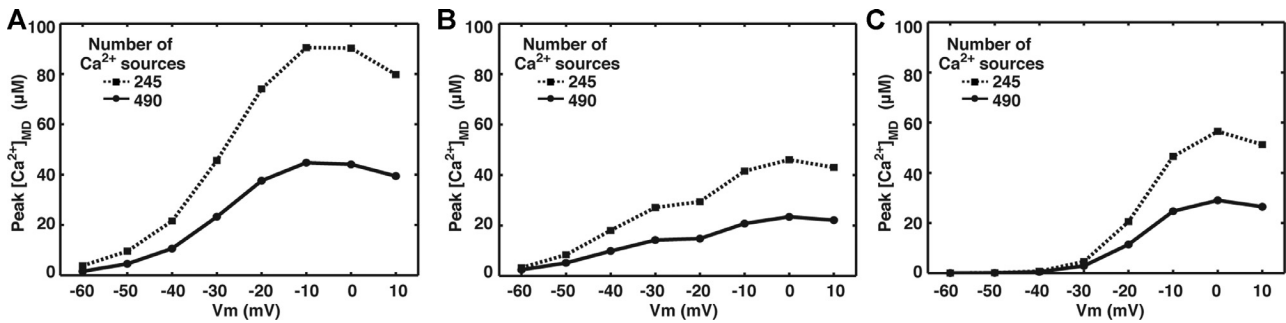
The effect of specific channel blockers of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents was simulated in order to estimate the contribution of each  $\text{Ca}^{2+}$  current to the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration at the nanodomain. Blockage of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents was simulated by setting the corresponding maximal conductance ( $g_x$  in Eqs. (10), (11) and (14)) to  $0$  nS/pF. In Fig. 14, the peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentration produced by each of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents in high buffering conditions ( $10$  mM EGTA) during voltage clamp experiments is shown. As expected, the curve of peak  $\text{Ca}^{2+}$  resembles the I–V curve for the three currents (see Fig. 8). For the case of  $490$   $\text{Ca}^{2+}$  sources, peak  $\text{Ca}^{2+}$  reached a maximal value of  $44.7$ ,  $23.4$  and  $29$   $\mu\text{M}$  for the L, T and P/Q currents respectively. Similarly, for the case of  $245$  sources, peak  $\text{Ca}^{2+}$  reached a maximal value of  $90.5$ ,  $46$  and  $56.5$   $\mu\text{M}$  for the L, T and P/Q currents respectively.

Experimentally, the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current is isolated by subtracting the response obtained after adding isradipine (a specific blocker of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current) from the response before the application of the blocker agent (i.e. from the total  $\text{Ca}^{2+}$  current), as explained in Section 2.3.1. This means that the inactivation process of the L-type current is due to the increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_{ND}$  driven by the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  through the three types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Fig. 15B). The effect of the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  through the T and P/Q-type channels on the inactivation of the L-type current is shown in Fig. 15. When  $I_T$  and  $I_{PQ}$  are blocked (by making  $g_T$  and  $g_{PQ} = 0$  pA/pF in Eqs. (10) and (11) respectively), an increase in the magnitude of the  $I_L$  current was observed for all the voltage pulses (Fig. 15D). This was caused by both the effect of the





**Fig. 13.** Simulations of a depolarizing pulse from the holding potential of  $-70$  mV to a test voltage of  $0$  mV for a cell with 490 (A) and 245 (B)  $\text{Ca}^{2+}$  sources when EGTA ( $10$  mM) and a fixed endogenous buffer ( $0.5$  mM END) were included. For both cases the spatiotemporal distribution of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (top),  $[\text{END}\cdot\text{Ca}^{2+}]$  (middle) and  $[\text{EGTA}\cdot\text{Ca}^{2+}]$  (bottom) are shown.



**Fig. 14.** Peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations obtained in voltage clamp experiments due to the isolated L (left), T (middle) and P/Q (right) currents for the cases of 245 (dashed) and 490 (solid) sources.

entry of  $\text{Ca}^{2+}$  through the T and P/Q channels on the inactivation process of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current and the lower reversal potentials produced (Fig. 15C) as a result of the higher levels of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}}$  reached.

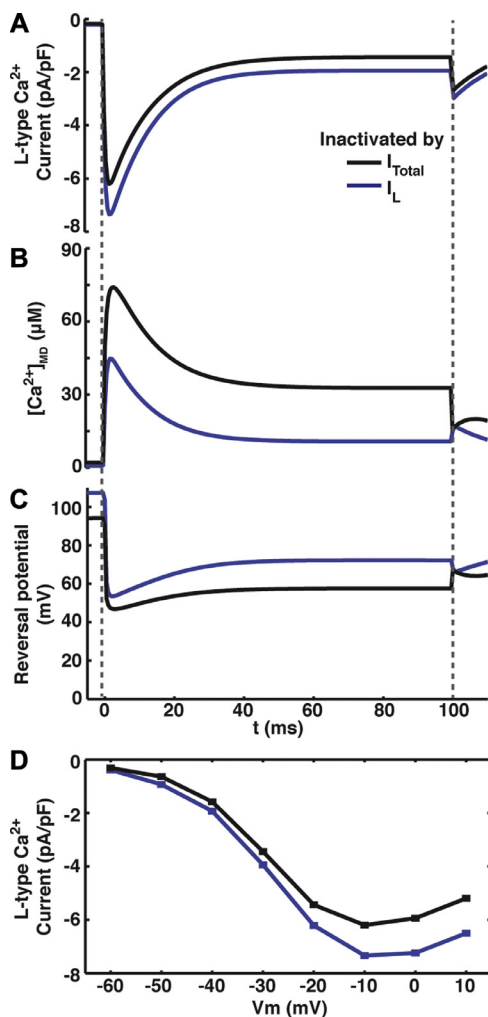
#### 4. Conclusions

Mathematical modeling is an extremely useful tool as a complement to the experimental work. Here we have used a computational model to estimate the range of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration produced during voltage clamp experiments in human  $\beta$ -cells using detailed models of the  $\text{Ca}^{2+}$  currents derived from electrophysiological data. In addition, we provided a novel framework for including spatial aspects to future models of the pancreatic  $\beta$ -cell.

In our model, despite the high  $\text{Ca}^{2+}$  buffering capacity considered,  $\text{Ca}^{2+}$  nanodomains were produced by the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  through the  $\text{Ca}^{2+}$  sources both in radial and tangential directions, appreciable up to a distance of  $\sim 200$  nm (Section 3.3). Our results suggest that, under high  $\text{Ca}^{2+}$  buffering conditions, the maximal  $\text{Ca}^{2+}$  concentration

reached is in the range of  $\sim 76$  and  $143$   $\mu\text{M}$  at a depth of  $10$  nm for a voltage pulse to  $0$  mV (Section 3.4). In addition, we showed that in presence of  $10$  mM EGTA, a fast fixed endogenous buffer mainly affected the peak  $\text{Ca}^{2+}$  concentration while having a minor effect on the rest of the temporal course of the  $\text{Ca}^{2+}$  transient. On the other hand, we also estimated that isolated L, T and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents produced a maximal increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ND}}$  in the range of  $45$ – $90$   $\mu\text{M}$ ,  $23$ – $46$   $\mu\text{M}$  and  $29$ – $57$   $\mu\text{M}$  respectively. Finally, we showed that the effect of the  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the T and P/Q channels both on the inactivation process of the L-type current and the changes of the reversal potential can produce relevant differences on the magnitude of the L-type current (Section 3.5).

Future work will involve simulating the electrical behavior of the human  $\beta$ -cell in physiological conditions, where endogenous buffers, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  deposits and  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion processes are the mechanisms responsible for  $\text{Ca}^{2+}$  regulation. Whole  $\beta$ -cell models, whether of rodent or human, have been always modeled using a compartmental approach, assuming that  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  changes uniformly



**Fig. 15.** A. Effects of calcium influx due to the T- and P/Q type currents on the temporal course of the L-type current. When both the T and P/Q currents are blocked the L-type current increases in magnitude due to the effects of the differences of the levels of  $[Ca^{2+}]_{ND}$  reached on the inactivation process of the L-type current and the temporal course of the reversal potential (C). B. Concentration of  $Ca^{2+}$  in the nanodomain produced by the total current (black curve) and the isolated L-type current (blue curve). C. Temporal course of the reversal potential. D. Comparison of the I–V curves of the L-type current when inactivated by the total  $Ca^{2+}$  current (black lines) and the L-type current itself (blue lines). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

throughout the intracellular space (for a recent review see Ref. [63]). We believe that in order to build models of  $\beta$ -cells capable of describing the behavior of key variables in GSIS (e.g.  $[Ca^{2+}]_i$ ), the location of the  $Ca^{2+}$  channels and buffered diffusion of  $Ca^{2+}$  should be considered.

### Acknowledgments

This work is dedicated to the memory of Dr. Matthias Braun, who passed away unexpectedly while this work was in progress. We thank Dr. Braun for his generosity in providing the electrophysiological recordings of the  $Ca^{2+}$  currents analyzed in this work as well as for his valuable comments.

G. Félix-Martínez was supported by a graduate scholarship (No. 228853) from CONACYT (Mexican Council of Science and Technology).

### References

- [1] P. Gilon, R.M. Shepherd, J.C. Henquin, Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  as evidences in single pancreatic islets, *J. Biol. Chem.* 268 (30) (1993) 22265–22268.
- [2] B. Hellman, E. Gylfe, P. Bergsten, E. Grapengiesser, P.E. Lund, A. Berts, et al., Glucose induces oscillatory  $Ca^{2+}$  signalling and insulin release in human pancreatic beta cells, *Diabetologia* 37 (1994) S11–S20.
- [3] M. Brissova, Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy, *J. Histochem. Cytochem* 53 (2005) 1087–1097.
- [4] A. Kim, K. Miller, J. Jo, G. Kilimnik, P. Wojcik, M. Hara, Islet architecture: a comparative study, *Islets* 1 (2009) 129–136.
- [5] J.C. Henquin, D. Dufrane, M. Nenquin, Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets, *Diabetes* 55 (2006) 3470–3477.
- [6] M. Braun, R. Ramracheya, P.R. Johnson, P. Rorsman, Exocytotic properties of human pancreatic  $\beta$ -cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1152 (2009) 187–193.
- [7] S. Mislser, D.W. Barnett, K.D. Gillis, D.M. Pressel, Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human  $\beta$ -cells, *Diabetes* 41 (1992) 1221–1228.
- [8] M. Braun, R. Ramracheya, M. Bengtsson, Q. Zhang, J. Karanaukaite, C. Partridge, et al., Voltage-Gated ion channels in human pancreatic  $\beta$ -Cells: Electrophysiological characterization and role in insulin secretion, *Diabetes* 57 (2008) 1618–1628.
- [9] D.W. Barnett, D.M. Pressel, S. Mislser, Voltage-dependent  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  currents in human pancreatic islet  $\beta$ -cells: evidence for roles in the generation of action potentials and insulin secretion, *Pflugers Arch* 431 (1995) 272–282.
- [10] D. Pressel, Sodium channels contribute to action potential generation in canine and human pancreatic islet B cells, *J. Membr. Biol.* 116 (3) (1990) 273–280.
- [11] P. Rorsman, M. Braun, Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets, *Annu. Rev. Physiol.* 75 (2013) 155–179.
- [12] P. Rorsman, E. Renström, Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells, *Diabetologia* 46 (2003) 1029–1045.
- [13] T.K. Bratanova-Tochkova, H. Cheng, S. Daniel, S. Gunawardana, Y.-J. Liu, J. Mulvaney-Musa, et al., Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion, *Diabetes* 51 (1) (2002) S83–S90.
- [14] J. Dolensek, M. Skelin, M.S. Rupnik, Calcium dependencies of regulated exocytosis in different endocrine cells, *Physiol. Res.* 60 (1) (2011) S29–S38.
- [15] Y. Yang, A highly  $Ca^{2+}$ -sensitive pool of granules is regulated by glucose and protein kinases in insulin-secreting INS-1 cells, *J. Gen. Physiol.* 124 (2004) 641–651.
- [16] G.A. Rutter, T. Tsuboi, M.A. Ravier,  $Ca^{2+}$  microdomains and the control of insulin secretion, *Cell Calcium* 40 (2006) 539–551.
- [17] K. Bokvist, L. Eliasson, C. Ammälä, Co-localization of L-type  $Ca^{2+}$  channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells, *EMBO J.* 14 (1) (1995) 50.
- [18] F. Martín, J. Ribas, B. Soria, Cytosolic  $Ca^{2+}$  gradients in pancreatic islet-cells stimulated by glucose and carbachol, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 235 (1997) 465–468.
- [19] G.M. Grodsky, A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling, *J. Clin. Investig* 51 (1972) 2047–2059.
- [20] M. Ohara-Imaizumi, S. Nagamatsu, Insulin exocytotic mechanism by imaging technique, *J. Biochem* 140 (2006) 1–5.
- [21] S. Nagamatsu, M. Ohara-Imaizumi, Mechanism of insulin exocytosis analyzed by imaging techniques, *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*, Springer, Japan, Tokyo, 2008, pp. 177–193.
- [22] E. Renström, P. Rorsman, Regulation of insulin granule exocytosis, *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*, Springer, Japan, Tokyo, 2008, pp. 147–176.
- [23] S.G. Straub, G.W.G. Sharp, Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 18 (2002) 451–463.
- [24] J.M. Theler, P. Mollard, N. Guérineau, P. Vacher, W.F. Pralong, W. Schlegel, et al., Video imaging of cytosolic  $Ca^{2+}$  in pancreatic  $\beta$ -cells stimulated by glucose, carbachol, and ATP, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 18110–18117.
- [25] I. Quesada, F. Martín, B. Soria, Nutrient modulation of polarized and sustained submembrane  $Ca^{2+}$  microgradients in mouse pancreatic islet cells, *J. Physiol* 525 (2000) 159–167.
- [26] W.J. Qian, R.T. Kennedy, Spatial organization of  $Ca^{2+}$  entry and exocytosis in mouse pancreatic  $\beta$ -cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 286 (2) (2001) 315–321.
- [27] M. Braun, The  $\alpha\beta\delta$  of ion channels in human islet cells, *Islets* 1 (2009) 160–162.
- [28] G. Drews, P. Krippeit-Drews, M. Düfer, Electrophysiology of islet cells, *The Islets of Langerhans*, Springer, Netherlands, Dordrecht, 2010, pp. 115–163.
- [29] M. Hiriart, L. Aguilar-Bryan, Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (2008) E1298–E1306.
- [30] P. Rorsman, L. Eliasson, T. Kanno, Q. Zhang, S. Göpel, Electrophysiology of pancreatic  $\beta$ -cells in intact mouse islets of Langerhans, *Prog. Biophys. Mol. Biol* 107 (2011) 224–235.
- [31] F. Sala, A. Hernández-Cruz, Calcium diffusion modeling in a spherical neuron. Relevance of buffering properties, *Biophys. J.* 57 (1990) 313–324.
- [32] M.C. Nowycky, M.J. Pinter, Time courses of calcium and calcium-bound buffers following calcium influx in a model cell, *Biophys. J.* 64 (1993) 77–91.
- [33] V. González-Vélez, J.R. Godínez-Fernández, Simulation of five intracellular  $Ca^{2+}$ -regulation mechanisms in response to voltage-clamp pulses, *Comput. Biol. Med.* 34 (2004) 279–292.
- [34] J. Klingauf, E. Neher, Modeling buffered  $Ca^{2+}$  diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells, *Biophys. J.* 72 (1997) 674–690.
- [35] A. Gil, J. Segura, J.A. Pertusa, B. Soria, Monte Carlo simulation of 3-D buffered  $Ca^{2+}$  diffusion in neuroendocrine cells, *Biophys. J.* 78 (2000) 13–33.
- [36] J.C. Brasen, L.F. Olsen, M.B. Hallett, Cell surface topology creates high  $Ca^{2+}$  signalling microdomains, *Cell Calcium* 47 (2010) 339–349.

- [37] P. Rorsman, The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint, *Diabetologia* 40 (1997) 487–495.
- [38] S. Barg, X. Ma, L. Eliasson, J. Galvanovskis, Fast exocytosis with few  $\text{Ca}^{2+}$  channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells, *Biophys. J.* 81 (6) (2001) 3308–3323.
- [39] C.D. Paras, W. Qian, J.R. Lakey, W. Tan, R.T. Kennedy, Localized exocytosis detected by spatially resolved amperometry in single pancreatic  $\beta$ -cells, *Cell Biochem. Biophys* 33 (2000) 227–240.
- [40] E.B. Saff, A.B.J. Kuijlaars, Distributing many points on a sphere, *Math. Intell* 19 (1997) 5–11.
- [41] P. Rorsman, M. Braun, Q. Zhang, Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease, *Cell Calcium* 51 (2012) 300–308.
- [42] H. Berkefeld, C.A. Sailer, W. Bildl, V. Rohde, J.-O. Thumfart, S. Eble, et al.,  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Cav channel complexes mediate rapid and localized  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  signaling, *Science* 314 (2006) 615–620.
- [43] H. Berkefeld, B. Fakler,  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated  $\text{K}^+$  channels: from protein complexes to function, *Physiol Rev* (2010) 1437–1459.
- [44] M. Prakriya, C.J. Lingle, Activation of BK channels in rat chromaffin cells requires summation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx from multiple  $\text{Ca}^{2+}$  channels, *J Neurophysiol* 84 (2000) 1123–1135.
- [45] M.R. Tadross, I.E. Dick, D.T. Yue, Mechanism of local and global  $\text{Ca}^{2+}$  sensing by calmodulin in complex with a  $\text{Ca}^{2+}$  channel, *Cell* 133 (2008) 1228–1240.
- [46] I.E. Dick, M.R. Tadross, H. Liang, L.H. Tay, W. Yang, D.T. Yue, A modular switch for spatial  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity in the calmodulin regulation of  $\text{Ca}_v$  channels, *Nature* 451 (2008) 830–834.
- [47] A.B. Parekh,  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains near plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channels: impact on cell function, *J. Physiol* 586 (2008) 3043–3054.
- [48] D.M. Bautista, R.S. Lewis, Modulation of plasma membrane calcium-ATPase activity by local calcium microdomains near CRAC channels in human T cells, *J. Physiol* 556 (2004) 805–817.
- [49] C.Y. Cha, Y. Nakamura, Y. Himeno, J. Wang, S. Fujimoto, N. Inagaki, et al., Ionic mechanisms and  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics underlying the glucose response of pancreatic  $\beta$  cells: a simulation study, *J. Gen. Physiol* 138 (2011) 21–37.
- [50] L.E. Fridlyand, N. Tamarina, L.H. Philipson, Modeling of  $\text{Ca}^{2+}$  flux in pancreatic  $\beta$ -cells: role of the plasma membrane and intracellular stores, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285 (1) (2003) E138–E154.
- [51] M.E. Meyer-Hermann, The electrophysiology of the  $\beta$ -cell based on single transmembrane protein characteristics, *Biophys. J.* 93 (8) (2007) 2952–2968.
- [52] C.M. Diaz-García, C. Sanchez-Soto, M. Hiriart, Toxins that modulate ionic channels as tools for exploring insulin secretion, *Cell. Mol. Neurobiol.* 30 (2010) 1275–1281.
- [53] L.E. Fridlyand, D.A. Jacobson, L.H. Philipson, Ion channels and regulation of insulin secretion in human  $\beta$ -cells: a computational systems analysis, *Islets* 5 (2013) 1–15.
- [54] M.G. Pedersen, A biophysical model of electrical activity in human  $\beta$ -cells, *Biophys. J.* 99 (2010) 3200–3207.
- [55] M. Riz, M. Braun, M.G. Pedersen, Mathematical modeling of heterogeneous electrophysiological responses in human  $\beta$ -cells, *PLoS Comput. Biol* 10 (2014) e1003389.
- [56] Henry C. Tuckwell, Quantitative aspects of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current, *Prog. Neurobiol* 96 (1) (2012) 1–31.
- [57] A. Sherman, J. Keizer, J. Rinzel, Domain model for  $\text{Ca}^{2+}$ -inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels at low channel density, *Biophys. J.* 58 (1990) 985–995.
- [58] P. Pinton, Dynamics of glucose-induced membrane recruitment of protein kinase C  $\beta$ II in living pancreatic islet  $\beta$ -cells, *J. Biol. Chem* 277 (2002) 37702–37710.
- [59] C. Ammälä, L. Eliasson, K. Bokvist, O. Larsson, P. Rorsman, Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic B-cells, *J. Physiol* 472 (1993) 665–688.
- [60] E. Neher, Vesicle pools and  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release, *Neuron* 20 (3) (1998) 389–399.
- [61] E. Neher, G.J. Augustine, Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells, *J. Physiol* 450 (1) (1992) 273–301.
- [62] S.A. Thayer, R.J. Miller, Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro, *J. Physiol* 425 (1990) 85–115.
- [63] G.J. Félix-Martínez, J.R. Godínez-Fernández, Mathematical models of electrical activity of the pancreatic  $\beta$ -cell: a physiological review, *Islets* 6 (3) (2014) e949195.

## Artículo 2

Mathematical models of electrical activity of the pancreatic  
 $\beta$ -cell: A physiological review.

Artículo publicado en *Islets* (2014).

# Mathematical models of electrical activity of the pancreatic $\beta$ -cell: a physiological review

Gerardo J Félix-Martínez\* and J Rafael Godínez-Fernández

Department of Electrical Engineering; Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; México, DF, México

**Keywords:** action potentials,  $\beta$ -cell, bursting, calcium, electrical activity, ion channels, mathematical model

**Abbreviations:** T2D, Type 2 Diabetes; GSIS, glucose-stimulated insulin secretion;  $\text{Ca}^{2+}$ , calcium ions; ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate;  $K_{\text{ATP}}$ , ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels;  $[\text{ATP}]_i$ , cytosolic ATP;  $V_m$ , membrane potential; VDCC, voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels;  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , intracellular calcium concentration; TRP, transient receptor potential; PMCA, plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; NCX,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger; ER, endoplasmic reticulum; SERCA, sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase;  $\text{IP}_3\text{R}$ , inositol-1,4,5-trisphosphate receptors; RyR, ryanodine receptors; MCU, mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter; mNCX, mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger;  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ , mitochondrial calcium;  $K_{\text{Ca}}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels;  $K_v$ , voltage-dependent  $\text{K}^+$  channels; CK, Chay-Keizer; CRAC, calcium release-activated current;  $[\text{Na}^+]_i$ ,  $\text{Na}^+$  concentration; DOM, dual oscillator model; HERG, human ether à-go-go related gene; TCA, tricarboxylic acid cycle; FBP, fructose-1,6-bisphosphate; PFK, phosphofructokinase; F6P, fructose-6-phosphate; cAMP, cyclic AMP; ROS, reactive oxygen species; GLUT, glucose transporter

Mathematical modeling of the electrical activity of the pancreatic  $\beta$ -cell has been extremely important for understanding the cellular mechanisms involved in glucose-stimulated insulin secretion. Several models have been proposed over the last 30 y, growing in complexity as experimental evidence of the cellular mechanisms involved has become available. Almost all the models have been developed based on experimental data from rodents. However, given the many important differences between species, models of human  $\beta$ -cells have recently been developed. This review summarizes how modeling of  $\beta$ -cells has evolved, highlighting the proposed physiological mechanisms underlying  $\beta$ -cell electrical activity.

## Introduction

Insulin, synthesized and secreted by the pancreatic  $\beta$ -cells of the islets of Langerhans, is the only hormone responsible for lowering blood glucose levels. Under normal conditions, blood insulin is pulsatile both in humans and in rodents.<sup>1,2</sup> Interestingly, insulin oscillations are disrupted in patients with Type 2 Diabetes (T2D).<sup>3</sup> It has been shown that single  $\beta$ -cells contribute to the oscillations of insulin at higher levels of organization,<sup>4</sup> underscoring the importance of studying  $\beta$ -cell functioning at the cellular level.

In  $\beta$ -cells, glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) is mediated by the increase of intracellular calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), driven by a well-established sequence of events (Fig. 1), beginning with the transport of glucose into the cell through the glucose transporters (GLUT), accelerating the metabolism and therefore the production of adenosine triphosphate (ATP) at the expense of adenosine diphosphate (ADP). This induces an increase in the ATP/ADP ratio, causing the closure of the ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels ( $K_{\text{ATP}}$ ), and consequently, promoting the slow depolarization of the membrane potential ( $V_m$ ) upon the threshold value at which the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VDCCs) are activated, allowing the influx of calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ). It is the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  that finally promotes insulin secretion. This is the main pathway of GSIS, and it is referred to as the triggering or  $K_{\text{ATP}}$ -dependent pathway (Fig. 1). As a complement to the triggering pathway, GSIS is regulated by the amplifying pathway, also known as the  $K_{\text{ATP}}$ -independent pathway, which enhances the effects of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  on the exocytotic machinery.<sup>5-7</sup>

Alterations in  $\beta$ -cells are highly related to impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance, which eventually progress to T2D,<sup>8</sup> a disease characterized by insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. Several factors are known to impair the proper secretion of insulin at the cellular level. For example, mutations in ionic channels have been associated with a higher diabetes risk.<sup>9-11</sup> Moreover, it has also been demonstrated that defective  $\beta$ -cell sensitivity and impaired metabolism could result in hyperglycemia and eventually in T2D.<sup>12,13</sup>

As a complement to experimental work, mathematical models of  $\beta$ -cells have been used to elucidate how the cellular mechanisms involved in GSIS interact, providing feasible explanations and hypotheses to experimental observations in  $\beta$ -cells. Models have grown in complexity as new experimental evidence has emerged: from the early minimal models that included a few ionic channels and a basic representation of  $\text{Ca}^{2+}$  handling and metabolism, to the current complex models that incorporate detailed representations of glycolysis and ATP production, and the recent appearance of models of human  $\beta$ -cells.

© Gerardo J Félix-Martínez and J Rafael Godínez-Fernández

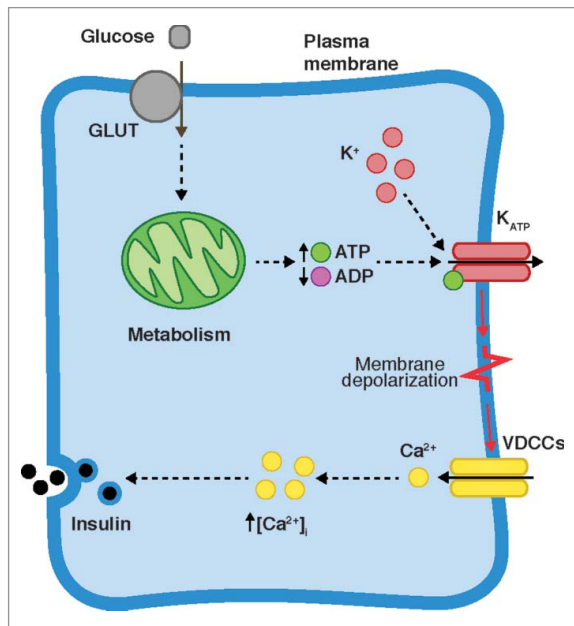
\*Correspondence to: Gerardo J Félix-Martínez; Email: gjfelig2005@gmail.com

Submitted: 04/06/2014; Revised: 07/21/2014; Accepted: 07/23/2014

<http://dx.doi.org/10.4161/19382014.2014.949195>

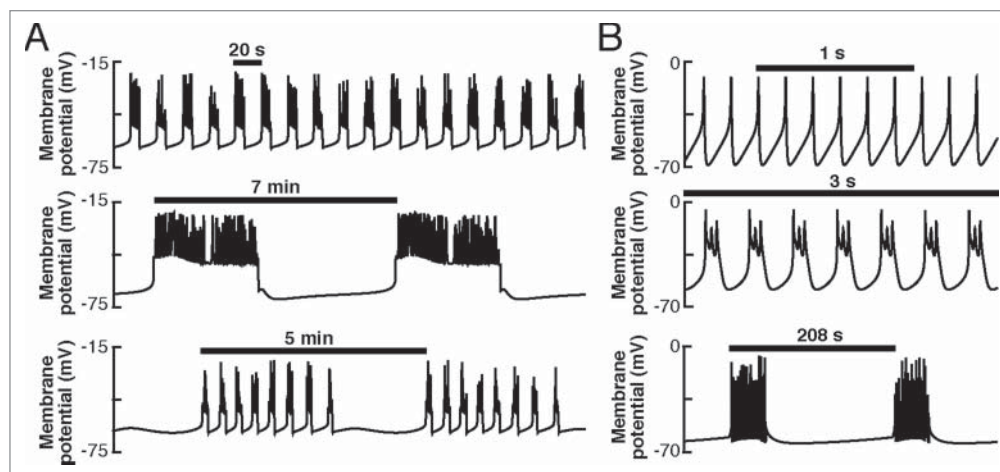
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been asserted.





**Figure 1.** Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). After glucose is transported into the cell by the GLUT transporters, it is metabolized, potentiating the production of ATP and the closure of the ATP-sensitive  $K^+$  channels ( $K_{ATP}$ ). The membrane is depolarized and voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels (VDCCs) are activated, allowing the influx of  $Ca^{2+}$ . The increase of the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) stimulates  $Ca^{2+}$ -dependent insulin secretion.

The aim of this work is to give a general overview of the progress in the field of  $\beta$ -cell modeling from a physiological perspective; thus, a detailed discussion about the mathematical aspects of the models is beyond the scope of this review. Interested readers are referred to other works on the subject.<sup>14–16</sup>



**Figure 2.** Electrical activity patterns in pancreatic  $\beta$ -cells. (A) Simulated fast (top), slow (middle), and compound (bottom) bursting behavior in rodent cells (simulations made with the Dual Oscillator Model<sup>120</sup>). (B) Simulations of action potential firing (top), fast (middle), and slow (bottom) bursting in human cells (simulated with the model of the human  $\beta$ -cell of Riz et al.<sup>28</sup>).

This review is structured as follows. First, a brief introduction to the physiology of the pancreatic  $\beta$ -cells considered in mathematical models is presented. In the following section, we address the evolution of mathematical models of  $\beta$ -cells, including the most recent models developed specifically for human  $\beta$ -cells. Finally, we briefly discuss the applications and limitations of the mathematical models of the pancreatic  $\beta$ -cells.

## General Overview of the Cellular Mechanisms Involved in the Electrical Activity of $\beta$ -cells

### Electrophysiology of the $\beta$ -cell

The changes in membrane potential needed to allow the influx of  $Ca^{2+}$  through the VDCCs are generated through the concerted action of ionic transport mechanisms (ionic channels, pumps, and exchangers), which are regulated by ligands (e.g.,  $Ca^{2+}$  or ATP) or by the  $V_m$  itself. Several ionic channels participate in the formation of the electrical activity pattern, including voltage-dependent  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ , and  $K^+$  channels and  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels.<sup>17–20</sup> Of special interest is the  $K_{ATP}$  channel, which links the changes in glucose metabolism to the electrical activity in  $\beta$ -cells.<sup>21</sup> Nonselective cationic channels, like the transient receptor potential channels (TRP) have also been found in  $\beta$ -cells.<sup>17,20</sup> The detailed electrophysiological properties of ionic channels in  $\beta$ -cells can be found elsewhere.<sup>17,18,20</sup>

The expression of specific ionic channels differs between species,<sup>22,23</sup> which is reflected in the corresponding pattern of electrical activity (for recent reviews see refs. <sup>10, 17, 20, 24</sup>). In rodents,  $\beta$ -cells exhibit a characteristic electrical pattern, composed of slow oscillations in  $V_m$ , above which action potentials are superimposed.<sup>17–19</sup> This is known as bursts of action potentials, or bursting electrical activity. Heterogeneous bursting patterns have been reported in rodents,<sup>25,26</sup> which can be classified as “fast” (period of  $<60$  s), “slow” (period from 1 to several minutes), and “mixed” or “compound” oscillations (fast oscillations superimposed on slow oscillations). Simulations of the distinct electrical patterns observed experimentally in rodent cells are shown in Fig. 2A (experimental recordings can be seen in Fig. 1 in ref. 25). On the other hand, in human  $\beta$ -cells, action potential firing is the most common electrical behavior, although bursting has been observed occasionally.<sup>10,22,27,28</sup> Simulations reproducing the electrical

patterns observed in the human  $\beta$ -cell (see Figs. 1, 2 and 6 in ref. <sup>28</sup> for the experimental recordings) are shown in Fig. 2B.

### Calcium handling and metabolism

An increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is used as a signal to control insulin exocytosis. It has been observed that  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillates in synchrony with membrane potential<sup>29–33</sup> and that insulin exocytosis occurs when  $\text{Ca}^{2+}$  channels are active.<sup>34–36</sup> Several mechanisms are responsible for the oscillations of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Calcium entry is mediated by the activity of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, whereas  $\text{Ca}^{2+}$  is extruded from the  $\beta$ -cell mainly by the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA)<sup>37</sup> and the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX).<sup>38,39</sup>

Once in the intracellular space,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  is regulated by internal stores, namely the endoplasmic reticulum (ER) and the mitochondria. The ER captures  $\text{Ca}^{2+}$  through the sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) during the rise in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  caused by the effects of depolarization on the VDCCs. This limits the amplitude of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations. Upon membrane repolarization,  $\text{Ca}^{2+}$  is released from the ER, preventing an abrupt drop in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .<sup>40,41</sup> Efflux of  $\text{Ca}^{2+}$  from the ER through channels such as inositol-1,4,5-trisphosphate receptors (IP<sub>3</sub>Rs) or ryanodine receptors (RyRs) is controlled by  $\text{Ca}^{2+}$  itself or by intracellular messengers (e.g., IP<sub>3</sub>).<sup>41–43</sup> This enables the  $\beta$ -cells to respond to muscarinic agonists by releasing  $\text{Ca}^{2+}$  from the ER to the cytoplasm.<sup>44</sup> In addition, it has been shown that the ER is relevant for both the oscillations of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and the control of  $V_m$ .<sup>45</sup>

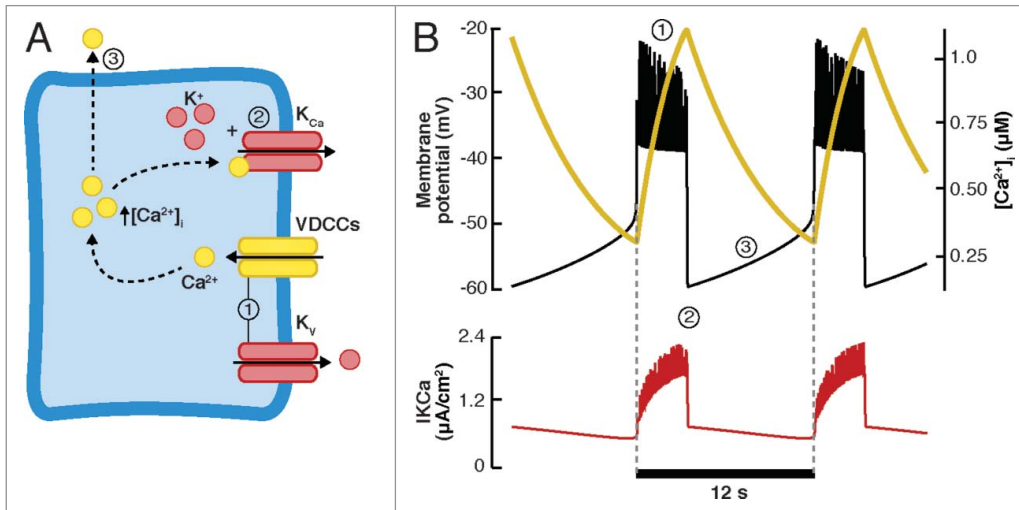
On the other hand, mammalian mitochondria have a high capacity for  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, although it is known that under resting conditions mitochondria do not play an important role as  $\text{Ca}^{2+}$  deposits as there is not a significant gradient between cytosolic and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ).<sup>12,46</sup> It has been proposed that mitochondria serve as a buffer of  $\text{Ca}^{2+}$  that limits the amplitude of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transients.<sup>47,48</sup> A rise in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  is relayed to the mitochondria where  $\text{Ca}^{2+}$  influx is mediated by the mitochondrial uniporter (MCU), which transports  $\text{Ca}^{2+}$  from the cytosol into the mitochondrial matrix.  $\text{Ca}^{2+}$  is then regulated by the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (mNCX), responsible for  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from the mitochondria.<sup>49,50</sup>

Mitochondria and glucose metabolism play an extremely important role in the control of GSIS (extensively reviewed in refs. <sup>12, 51–54</sup>). In  $\beta$ -cells the first stage of metabolism is glycolysis, where glucose is metabolized to pyruvate by means of a complex cascade of enzymatic reactions. Pyruvate is then processed during the TCA (tricarboxylic acid) cycle, resulting in the electron carriers NADH and FADH<sub>2</sub>, which are then used to generate a proton gradient across the mitochondrial membrane. The resulting proton flux through the ATP synthase finally drives the phosphorylation of ADP to ATP. ATP then regulates the activity of the  $K_{\text{ATP}}$  channels<sup>21</sup> and drives several ATP-consuming processes of the cell, such as those involving  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases (e.g., PMCA and SERCA),<sup>38,45,55</sup> and insulin exocytosis.<sup>56</sup> In spite of the higher demand for ATP due to the activation of the ATP-consuming processes, a net increase in the cytosolic ATP/ADP

ratio has been observed.<sup>49,57</sup> This overcompensation can be explained by 2 factors: the greater availability of glucose to be metabolized in the first place and the subsequent effect of the increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  in the oxidation of glucose,<sup>52</sup> which is known to involve the activation of the mitochondrial dehydrogenases and other enzymes.<sup>58–60</sup> Consistent with this proposal, a biphasic behavior was observed in measurements of the ATP/ADP ratio and oxygen consumption.<sup>49,57</sup> In addition, it has been proposed that  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  also has a negative effect on ATP production by reducing the proton motive force,<sup>48,61,62</sup> although there is a large body of evidence that the overall effect of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  is to potentiate rather than to inhibit ATP production.<sup>49,52,63</sup> For example, it has been demonstrated that glucose oxidation is considerably reduced when  $\text{Ca}^{2+}$  influx is prevented.<sup>64,65</sup> In addition, recent studies<sup>49,57</sup> have demonstrated that increases of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  are required for normal changes in the ATP/ADP ratio to occur in response to glucose stimulation. Detailed models addressing the role of the main processes involved in energy metabolism in  $\beta$ -cells have been developed recently.<sup>66,67</sup> Besides the role of mitochondria in the triggering pathway of insulin secretion, it has been proposed that mitochondrial-derived metabolites are involved in the amplifying pathway of insulin secretion.<sup>51,68</sup> However, the role of mitochondria in this  $K_{\text{ATP}}$ -independent pathway is still poorly understood.

Insulin secretion is pulsatile with a period of several minutes.<sup>2</sup> Given that metabolic oscillations with a similar period have been observed,<sup>61,62,64,69–75</sup> it has been proposed that they are involved in the generation of the pulsatile behavior of insulin secretion. For example, oscillations both in the cytosolic ATP ( $[\text{ATP}]_i$ ) and ATP/ADP ratio have been linked to oscillatory changes in the conductance of the  $K_{\text{ATP}}$  channels.<sup>69,70,72</sup> In addition, oscillations in NAD(P)H,<sup>64,73</sup> O<sub>2</sub>,<sup>74</sup> mitochondrial membrane potential,<sup>61,62</sup> and cAMP<sup>75</sup> have been reported. The origin of these oscillations is still matter of debate, though at least 2 hypotheses have been proposed. On the one hand, it has been suggested that metabolic oscillations are generated during glycolysis by the positive feedback of the product FBP onto the PFK activity.<sup>76,77</sup> On the other hand, other authors have proposed that the interplay between the production and consumption of ATP is responsible for the observed oscillations in  $[\text{ATP}]_i$ .<sup>55,72,78</sup> Interestingly, in a recent study, Tanaka et al.<sup>79</sup> failed to observe significant oscillations in cytosolic ATP in mouse islets during GSIS, in contrast to the oscillations of sub-membrane ATP reported by Li et al.<sup>55</sup>

It is likely that mitochondrial dysfunction is involved in the onset of T2D and its related complications (reviewed in refs. <sup>80–82</sup>). For example, in islets from diabetic subjects it has been shown that mitochondria have an altered morphology.<sup>83</sup> In addition, reduced glucose oxidation, oxygen consumption and ATP production have been also reported.<sup>83,84</sup> Moreover, it has been proposed that alterations in the free radicals derived from metabolism (reactive oxygen species, ROS) could have negative effects on glucose oxidation.<sup>51,63</sup> It is thought that novel therapies to treat diabetes may involve pharmacologic agents targeting mitochondria whether to enhance mitochondrial function or to reduce negative effects of alterations in metabolism.<sup>82</sup>



**Figure 3.** Minimal model of Chay and Keizer (CK model). **A.** Scheme of the CK model. The active phase (1) is sustained by the VDCCs and  $K_v$  channels, slowly increasing  $[Ca^{2+}]_i$ . The  $K_{Ca}$  channels are activated, eventually repolarizing the membrane (2). During the silent phase (3), the VDCCs and  $K_v$  channels are closed and  $Ca^{2+}$  is extruded from the cell, inhibiting the activity of the  $K_{Ca}$  channels. The slow depolarization eventually activates the VDCCs and  $K_v$  channels, initiating a new burst. **B.** Fast bursting simulated with the CK model. Top: Membrane potential (black curve) and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ , yellow curve). Bottom:  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  ( $K_{Ca}$ ) current.

## Mathematical Models of Pancreatic $\beta$ -Cells

Models of  $\beta$ -cells have been proposed as a tool to explain how the cellular mechanisms involved in GSI interact. Most of the cellular processes mentioned in the previous section have been included in models of  $\beta$ -cells. In this section, several models based on both mouse and human  $\beta$ -cells are described in terms of the physiological mechanisms involved. Model descriptions are accompanied with a schematic diagram of the corresponding physiological hypothesis. Simulations showing the behavior of key variables are also presented. Implementation of the models and simulations were performed in Mathematica 9.0 (Wolfram Research, Inc., Champaign, IL).

### Models of rodent $\beta$ -cells

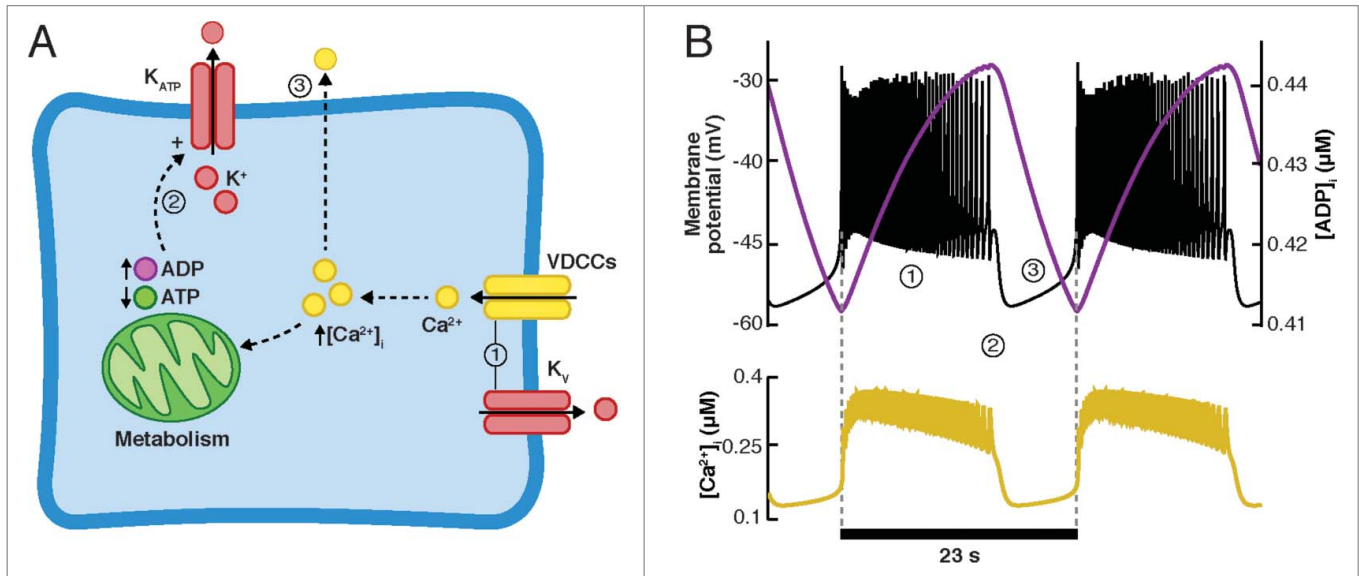
Dean and Matthews<sup>85,86</sup> provided the first evidence of changes in the membrane potential of  $\beta$ -cells induced by glucose, consisting of fast bursting electrical activity. This fast pattern has been observed in isolated single mouse  $\beta$ -cells and isolated islets.<sup>26,87,88</sup> Several hypotheses have been proposed and analyzed theoretically in order to elucidate the cellular mechanisms responsible for the fast bursting behavior. In their pioneering model, Chay and Keizer<sup>89</sup> (CK model) were able to reproduce fast bursting electrical behavior (Fig. 3B, top panel). The CK model (Fig. 3A) includes  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels ( $K_{Ca}$ ) and voltage-dependent  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  channels (VDCCs and  $K_v$ , respectively). Intracellular calcium handling was modeled in a minimal manner. As proposed by Atwater et al.,<sup>90</sup> the CK model uses the effects of  $[Ca^{2+}]_i$  in the large conductance  $K_{Ca}$  channels as the mechanism to initiate or terminate the bursts of action potentials (Fig. 3B, bottom panel).

During the active phase, sustained by  $K_v$  channels and VDCCs,  $[Ca^{2+}]_i$  increases slowly, activating the  $K_{Ca}$  channels and leading to membrane repolarization. During the silent phase,  $Ca^{2+}$  entry through VDCCs is inhibited, resulting in a decrease in  $[Ca^{2+}]_i$  due to the extrusion of  $Ca^{2+}$  from the cytosol. The  $K_{Ca}$  channels are then gradually closed, inducing depolarization of the membrane potential at which VDCCs and  $K_v$  are activated, initiating a new burst of action potentials. In this model, bursting depends entirely on one pacemaker variable ( $[Ca^{2+}]_i$ ). The hypothesis proposed by the CK model was discarded when  $[Ca^{2+}]_i$  was measured in  $\beta$ -cells, revealing more rapid dynamics than predicted by the model.<sup>29,30</sup> Moreover, blocking  $K_{Ca}$  channels with charybdotoxin produced no significant effect on the electrical activity.<sup>91</sup> Recently, Houamed et al.<sup>92</sup> showed that the BK channels do contribute to the repolarization of the action potentials in mouse  $\beta$ -cells, without a relevant role in the duration of the active and silent phases of the bursting electrical pattern. In spite of the evidence against this hypothesis, practically all the existing models of  $\beta$ -cells are based on the minimal CK model. Subsequent models were able to generate fast bursting using the same mathematical principle as the CK model, only changing the identity of the slow pacemaker variable.

Motivated by electrophysiological studies by Rorsman and Trube,<sup>93</sup> Chay et al.<sup>94</sup> replaced the  $K_{Ca}$  channels in the CK model with voltage-activated  $Ca^{2+}$ -inactivated  $Ca^{2+}$  channels. In contrast to the CK model, in which the  $K_{Ca}$  channels are activated by an increase of  $[Ca^{2+}]_i$ , in this proposal the  $Ca^{2+}$  channels are inactivated by the changes in  $[Ca^{2+}]_i$  itself, allowing the  $K^+$  current to repolarize the membrane potential at the end of the burst of action potentials. Although it is well known that  $Ca^{2+}$  currents are extremely important for the electrical activity and insulin secretion both in mouse and human cells,<sup>22,31,95</sup> their role as a pacemaker variable lacks sufficient experimental support.<sup>26</sup>

In 1984,  $K_{ATP}$  channels were identified in rodent  $\beta$ -cells,<sup>96,97</sup> emerging as a feasible link between metabolism and electrical activity. In short, the activity of the  $K_{ATP}$  channels is inhibited by ATP and stimulated by ADP. The  $K_{ATP}$  channels are extremely important for  $\beta$ -cells, being responsible for the resting membrane potential of  $\beta$ -cells. In addition, the closure of the  $K_{ATP}$  channels due to an increase of the cytosolic ATP allows inward currents carried by  $Na^+$  and/or  $Ca^{2+}$  to depolarize, thus triggering electrical activity.<sup>10,21,97,98</sup>





**Figure 4.** Oscillations in ATP regulate the conductance of the  $K_{ATP}$  channels. **(A)** During the active phase (1), sustained by the VDCC and the  $K_v$  channels,  $[Ca^{2+}]_i$  increases, exerting a negative effect on the production of ATP, reflected in the increase in ADP and the corresponding decrease in the ATP/ADP ratio. The  $K_{ATP}$  channels are slowly opened, eventually repolarizing the membrane (2). During the silent phase, VDCCs are inhibited, and the influx of  $Ca^{2+}$  is ceased as  $Ca^{2+}$  is also extruded from the cell. As  $[Ca^{2+}]_i$  decreases, the production of ATP is potentiated, closing the  $K_{ATP}$  channels and initiating slow depolarization (3). **(B)** Simulations with the model of Smolen-Keizer. Top:  $V_m$  (black curve) and  $[ADP]_i$  (purple curve). Bottom: the fast dynamics of  $[Ca^{2+}]_i$  resembles the experimental observations.

Keizer and Magnus<sup>99-101</sup> and Smolen and Keizer<sup>102</sup> introduced  $K_{ATP}$  channels to the models of  $\beta$ -cells in order to analyze the role of the cyclical changes in the ATP/ADP ratio in  $\beta$ -cell electrical activity. In general, these models follow the hypothesis (see Fig. 4) that stipulates that during the active phase of the electrical activity, the cytosolic ATP concentration decreases due to the inhibiting effects of  $Ca^{2+}$  on the production of ATP (i.e., increasing ADP). As a consequence,  $K_{ATP}$  channels are activated, repolarizing the membrane potential. Closure of VDCCs during the silent phase inhibits  $Ca^{2+}$  entry and its negative effects on ATP production, allowing  $[ATP]_i$  to increase, inhibiting  $K_{ATP}$  channels and initiating the slow depolarization to the threshold potential of activation of the VDCCs and  $K_v$  channels, once again initiating the active phase.

The model of Keizer and Magnus<sup>99</sup> uses the changes in  $[ADP]_i$ , following the slow oscillations in  $[Ca^{2+}]_i$  as the pacemaker variable that triggers the transition between the active and silent phase of electrical activity by regulating the conductance of the  $K_{ATP}$  channels. One important drawback of this model is that, as in other models described above, the slow dynamics of  $[Ca^{2+}]_i$  contradicts the fast dynamics observed experimentally.<sup>29,30</sup> However, Keizer and Magnus provided an equation for the  $K_{ATP}$  current that is still used in recent models. On the other hand, the Smolen-Keizer<sup>102</sup> model (SK model) was able to reproduce the fast dynamics of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations including an improved model of the  $Ca^{2+}$  currents. As can be seen in Figure 4B, where simulations performed with the SK model are shown, ADP concentration rises slowly during the active phase and  $[Ca^{2+}]_i$  closely follows the dynamics of  $V_m$ . Assuming a constant nucleotide concentration, the latter means that ATP is

declining during the active phase, thus activating the  $K_{ATP}$  channels and repolarizing the membrane potential. As mentioned above, these models assume a negative influence of  $Ca^{2+}$  in ATP production. Given the importance of metabolism on GSIS, Magnus and Keizer<sup>48</sup> developed a minimal model of  $\beta$ -cell mitochondrial  $Ca^{2+}$  handling, considering only the negative effects of  $Ca^{2+}$  in ATP production and neglecting the activation of the dehydrogenases by  $Ca^{2+}$ . Later, they extended their model to include a more refined representation of glucose metabolism (including, for example, the activation of dehydrogenases) and combined it with a model of the electrical activity induced by glucose.<sup>100,101</sup> With this complex model, they explored the role of mitochondrial  $Ca^{2+}$ -handling mechanisms during glucose-stimulated electrical activity.

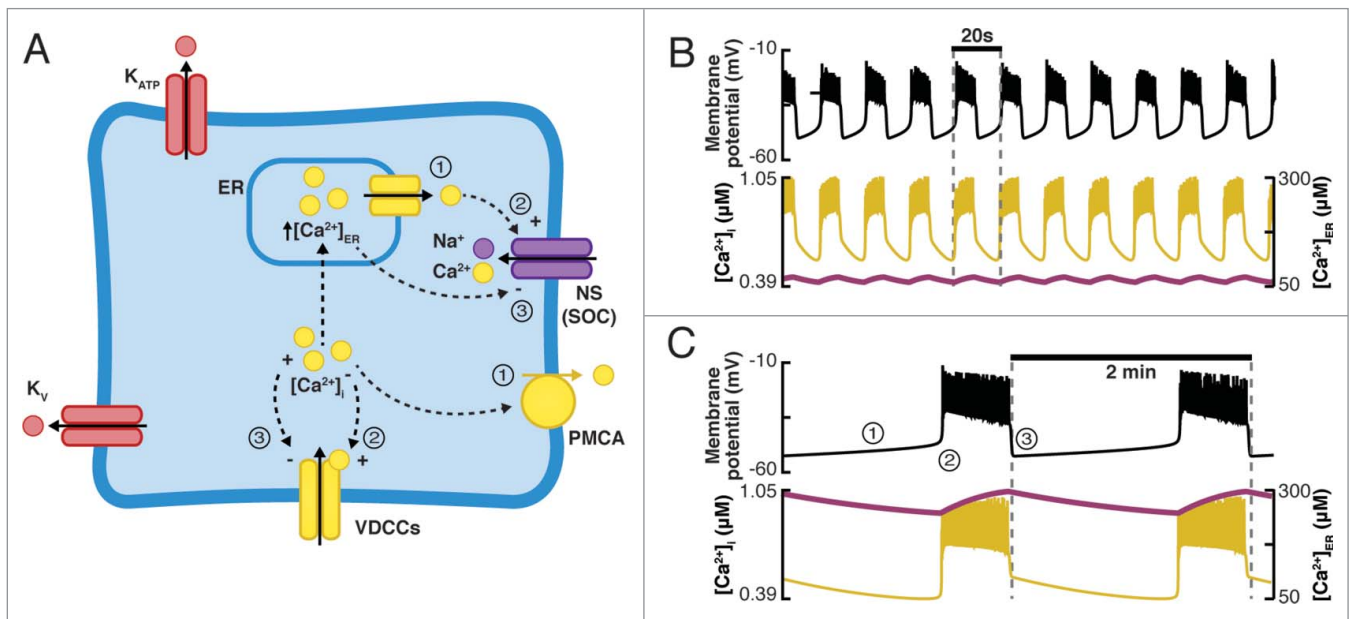
There is experimental evidence of oscillations both in cytosolic ATP<sup>55,72</sup> and  $K_{ATP}$  channel conductance during glucose stimulation,<sup>103</sup> which supports this hypothesis. However, others have reported the persistence of electrical activity in  $\beta$ -cells that lack functional  $K_{ATP}$  channels,<sup>104</sup> possibly indicating that the modulation of  $K_{ATP}$  channel conductance by the ATP/ADP ratio is not the only pacemaker mechanism for bursting electrical activity. In addition, Ravier et al.<sup>105</sup> have suggested that  $K_{ATP}$  channels are not the only mechanism linking glucose metabolism with  $Ca^{2+}$ -dependent insulin release via changes in membrane potential. The models based on the oscillations of the ATP/ADP ratio to produce bursting electrical activity by regulating the conductance of the  $K_{ATP}$  channels are unable to reproduce these observations, although it should be noted that the identity of the mechanism driving bursting electrical activity in  $K_{ATP}$  deficient  $\beta$ -cells is still unclear.

It has been proposed that ATP-consuming processes activated due to an increase of  $[Ca^{2+}]_i$  (e.g.,  $Ca^{2+}$ -pumps) could be the origin of the observed oscillations in cytosolic ATP.<sup>26,55,78,106</sup> Recent ATP measurements in the sub-membrane compartment in  $\beta$ -cells suggest that  $Ca^{2+}$  extrusion mechanisms are responsible for the observed oscillations in ATP,<sup>55</sup> giving support to this proposal. Whether the changes in the conductance of the  $K_{ATP}$  channels are mediated by the influence (negative or positive) of  $Ca^{2+}$  in ATP production or by the interplay between ATP production and consumption is still a matter of debate. Other complex models that include a detailed description of glucose metabolism were developed later,<sup>77,107,108</sup> though based on the hypothesis of intrinsic glycolytic oscillations as the origin of the oscillatory behavior of  $\beta$ -cells (described below).

In contrast to the fast oscillations observed by Dean and Mathews,<sup>85,86</sup> Smith et al.<sup>109</sup> reported slow bursting activity with a periodicity of minutes. In order to explain the origin of the slow oscillations observed experimentally in single cells, clusters of  $\beta$ -cells, and isolated islets,<sup>26,88,109</sup> Bertram et al.<sup>110</sup> and Chay et al.<sup>111</sup> included the endoplasmic reticulum (ER) as a second  $Ca^{2+}$  compartment in  $\beta$ -cell models (Fig. 5A). As observed experimentally, in these models,  $Ca^{2+}$  is transported into the ER by the SERCA pumps during the active phase of the electrical activity and is released during the silent phase, mainly through the  $IP_3$  receptor channels and the ryanodine receptor channels.<sup>41-43</sup> One important aspect of these models is the presence of non-specific calcium release-activated currents (CRAC) in the  $\beta$ -cells. The main idea (depicted schematically in Fig. 5A) is that during the

silent phase,  $Ca^{2+}$  is slowly released from the ER, preventing an abrupt drop of  $[Ca^{2+}]_i$  (Figs. 5B and C, bottom panel). As  $[Ca^{2+}]_i$  is extruded from the cell, the inactivation of the  $Ca^{2+}$ -inactivating  $Ca^{2+}$  current is removed. Simultaneously, as the  $Ca^{2+}$  concentration in the ER ( $[Ca^{2+}]_{ER}$ ) declines, the CRAC current increases. Eventually, the combination of these 2 currents becomes large enough to initiate a new burst. Then,  $[Ca^{2+}]_i$  is increased, driving the transport of  $Ca^{2+}$  into the ER, promoting inactivation of both the  $Ca^{2+}$  and CRAC currents. Finally, when these currents are sufficiently small, the active phase terminates. In terms of periodicity, models including  $[Ca^{2+}]_{ER}$  as a second slow process were able to generate both fast and slow bursting (Figs. 5B and C), in contrast to models that depend on a single slow process (e.g.,  $[Ca^{2+}]_i$  in the CK model or [ADP] in the SK model), which only generated bursting with a periodicity of seconds (fast oscillations).<sup>16,112</sup> The period of the oscillations in models including the ER is determined by the release rate of  $Ca^{2+}$  from the ER. When the release rate is low,  $[Ca^{2+}]_{ER}$  reaches a high level during the active phase, and because  $Ca^{2+}$  is released from the ER slowly,  $[Ca^{2+}]_i$  stays elevated (thus making the  $Ca^{2+}$ -dependent  $Ca^{2+}$  channels inactive), preventing the initiation of a new burst of action potentials. By including the ER, it was possible to simulate the effects of muscarinic agonists (e.g., acetylcholine) in the electrical activity of  $\beta$ -cells, which are known to mediate  $Ca^{2+}$  release from the ER.<sup>113</sup>

Other authors have proposed alternative mechanisms to explain the differences in the periodicity of bursting. Bertram et al.<sup>25</sup> developed a model based on the idea that the periodicity



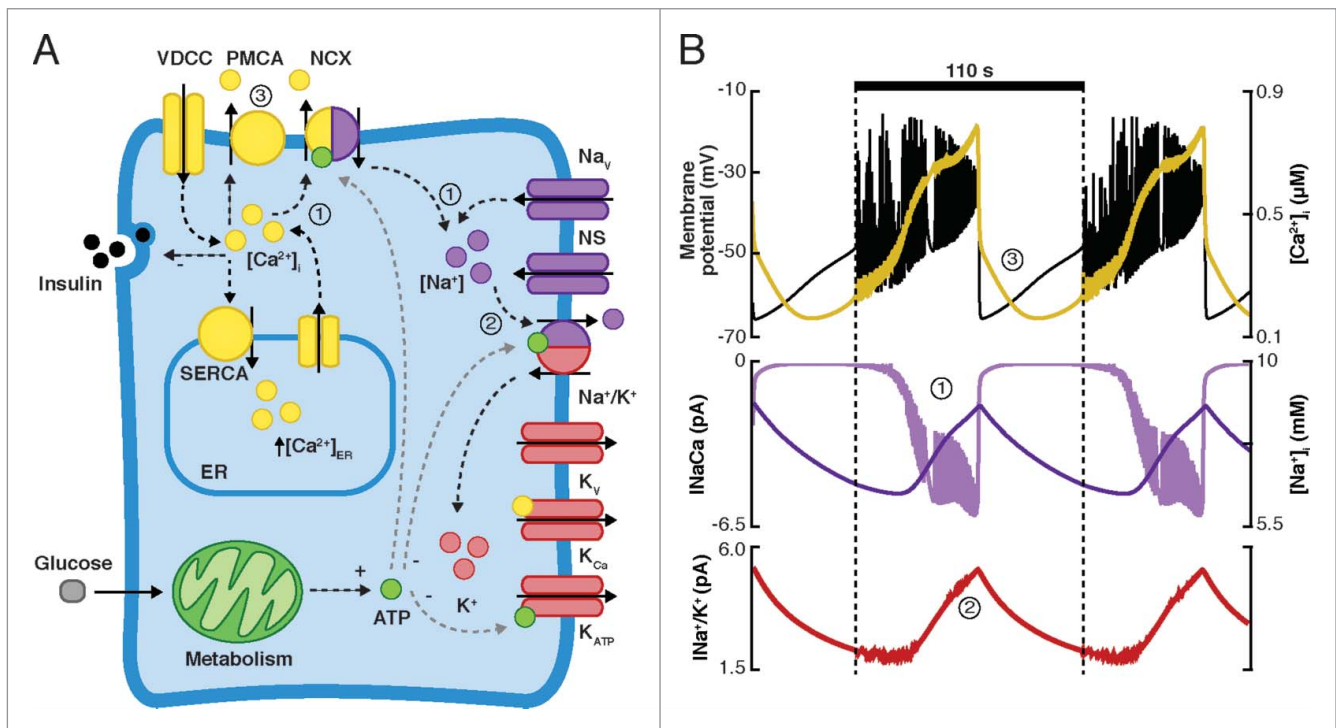
**Figure 5.** (A) Diagram of the models including ER as a second  $Ca^{2+}$  compartment and a non-specific calcium release-activated current (CRAC). During the silent phase (1),  $Ca^{2+}$  is released from the ER to the cytoplasm and is simultaneously extruded from the cell. This results in the activation of the CRAC current and the  $Ca^{2+}$ -inactivated  $Ca^{2+}$  current, driving slow depolarization and initiation of a burst of action potentials (2). As  $[Ca^{2+}]_i$  increases and  $Ca^{2+}$  is captured by the ER during the active phase, both the CRAC and the  $Ca^{2+}$ -inactivating  $Ca^{2+}$  currents are inhibited, resulting in membrane repolarization (3). (B and C) Simulations using the model of Chay<sup>111</sup> including ER. Fast (B) and slow (C) bursting is produced by modifying the release rate of  $Ca^{2+}$  from the ER. In both cases,  $V_m$  (top, black curve),  $[Ca^{2+}]_i$ , and  $[Ca^{2+}]_{ER}$  (bottom, yellow and purple curves, respectively) are shown.

of bursting is determined by the interaction between a fast and a slow oscillatory variables. These models are capable of producing bursting with an intermediate period, distinct from the periods of the fast and slow variables. Because of this behavior, the models based on this principle are called phantom bursters. In addition, models using the phantom bursting mechanism can also produce fast and slow bursting, mediated entirely by fast and slow variables, respectively. Actually, the models described above that included the ER for the first time<sup>110,111</sup> are phantom bursters, though they were identified as such later (see ref. 16), after the appearance of phantom bursting proposal.<sup>25</sup> The identity of the fast and slow processes has been extensively investigated by means of mathematical models (see below).

With the discovery of a slow  $K_{Ca}$  current (TEA and charybdotoxine-insensitive) by Gopel et al.,<sup>114</sup> the feedback of  $Ca^{2+}$  onto the  $K_{Ca}$  channels returned as a feasible candidate mechanism responsible for the periodicity of bursting activity. This was explored theoretically by Goforth et al.<sup>115</sup> Simulations by Fridlyand et al.<sup>26</sup> support the idea that bursting with a periodicity of seconds could be driven by the  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  current. However, this remains to be established experimentally.

Fridlyand et al.<sup>106</sup> proposed  $Na^+$  concentration ( $[Na^+]_i$ ) as an alternative slow mechanism (Fig. 6A). This model includes components that regulate the dynamics of  $Na^+$  in  $\beta$ -cells, namely the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger (NCX) and the  $Na^+/K^+$  pump. They suggested that the increase of  $[Ca^{2+}]_i$  during the active phase drives

$Na^+$  influx through the NCX exchanger, provoking a slow increase in  $[Na^+]_i$  (Fig. 6B). This activates the  $Na^+/K^+$  pump, carrying the net outward current responsible for burst repolarization. In the course of the silent phase,  $[Na^+]_i$  decreases due to a reduction in the activity of the NCX exchanger, leading to the inhibition of the outward current generated by the  $Na^+/K^+$  pump and membrane depolarization. Eventually, a new burst is initiated and the cycle is repeated. Other slow processes were also considered (i.e., ADP,  $IP_3$ ,  $[Ca^{2+}]_{ER}$ ). This model was later extended in order to include more detailed models for the interactions between  $[Ca^{2+}]_i$ , ATP/ADP, conductance of the  $K_{ATP}$  channels, and consumption of oxygen and glucose.<sup>116</sup> It is important to note that in these models  $[Ca^{2+}]_i$  shows a sawtooth like behavior that is followed by both  $[Na^+]_i$  and the  $INa^+/K^+$  current (see Fig. 6B). As mentioned before, experiments<sup>29,30</sup> have shown a more square shaped time course of  $[Ca^{2+}]_i$  resembling the behavior of  $V_m$ . The model of Fridlyand et al.<sup>106,116</sup> is capable of generating square-shaped oscillations in  $[Ca^{2+}]_i$  by modifying certain parameters (e.g., decreasing the rate of  $IP_3$  synthesis, see Fig. 3 in ref. 106) or by fixing other slow variables (e.g.,  $[ATP]_i$ ,  $[Na^+]_i$  and  $[IP_3]_i$ ) to a constant value (see Fig. 6 in ref. 106). The role of  $[Na^+]_i$  in  $\beta$ -cells has not been sufficiently studied. However, there is evidence of occasional oscillations of  $[Na^+]_i$  in mouse  $\beta$ -cells, which can be associated with  $Ca^{2+}$  influx and the periodic activation of the NCX exchanger.<sup>117</sup> To our knowledge, simultaneous measurements of  $V_m$ ,  $[Ca^{2+}]_i$ ,



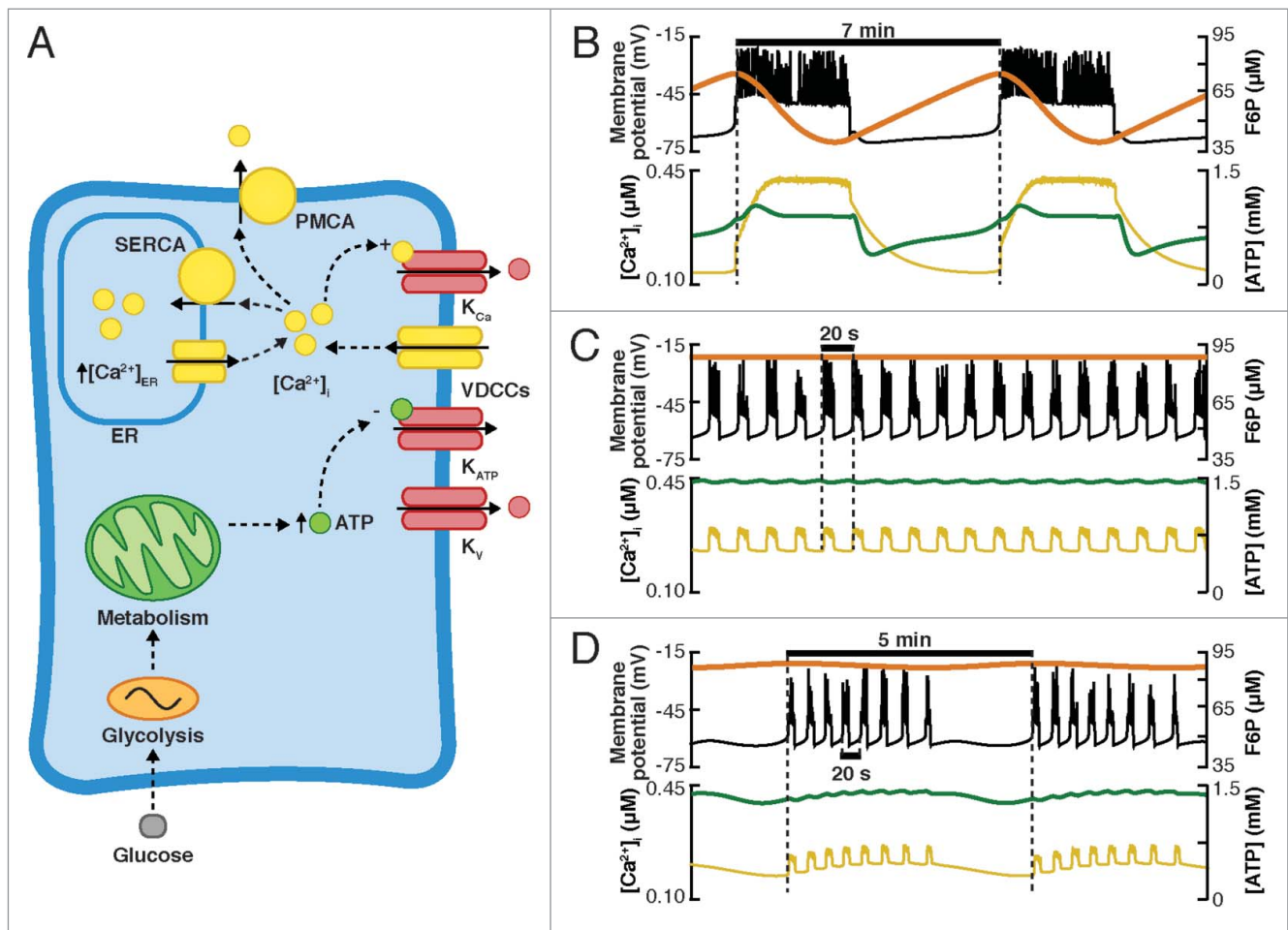
**Figure 6.**  $[Na^+]_i$  as a pacemaker variable. (A) The model of Fridlyand et al.<sup>106</sup> is shown schematically. Entry of  $Ca^{2+}$  during the active phase activates the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger, inducing an increase of  $[Na^+]_i$  (1). This promotes the activity of an outward current through the  $Na^+/K^+$  pump, eventually repolarizing the membrane (2). In the silent phase,  $Ca^{2+}$  influx is inhibited, resulting in a reduction in both the activity of the NCX exchanger and the  $Na^+/K^+$  pump, promoting slow depolarization (3). (B) Simulation of slow electrical activity. Top:  $V_m$  (black curve) and  $[Ca^{2+}]_i$  (yellow curve). Middle: Current through the NCX exchanger ( $INaCa$ , light purple) and  $[Na^+]_i$  (dark purple). Bottom: Current through the  $Na^+/K^+$  pump ( $INa^+/K^+$ , red curve).



and  $[Na^+]_i$  in  $\beta$ -cells have not been performed, which could clarify the role of  $Na^+$  in GSIS. The framework of the models of Fridlyand et al.<sup>106,116</sup> was used by Cha et al.<sup>118</sup> to analyze the contribution of the ionic channels involved in the GSIS in the distinct electric behaviors observed at different glucose levels. The authors concluded that the  $K_{ATP}$  channels mediate bursting at the physiological range of glucose. In addition, their simulations predicted that at higher glucose levels, the role of the  $K_{ATP}$  channels becomes practically negligible, as the electrogenic transport mechanisms (i.e. PMCA, NCX and  $Na^+/K^+$  pump), together with a nonselective current, become more important for the regulation of bursting. Cha et al.<sup>119</sup> further identified the fast ( $[ATP]_i$  or the inactivation gate of the  $Ca^{2+}$  current) and slow ( $[Na^+]_i$  or  $[Ca^{2+}]_{ER}$ ) processes in their model as defined by the phantom bursting mechanism.

Bertram and Sherman<sup>16</sup> proposed a model using the phantom bursting mechanism with 3 slow processes,  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Ca^{2+}]_{ER}$ ,

and ATP/ADP. Using a simple representation of these mechanisms, this model was able to reproduce several experimental findings, including the effects of acetylcholine and thapsigargin on electrical activity and the full range of periods of bursting. In a later model, called the Dual Oscillator Model (DOM, Fig. 7A), Bertram et al.<sup>120</sup> combined a model of glycolysis,<sup>76</sup> a model of mitochondrial metabolism,<sup>100,101</sup> and a model of electrical activity.<sup>121</sup> The DOM model reproduces the full range of periods observed in bursting activity as well as the compound or mixed oscillations that are often observed (shown in Fig. 7D). In the DOM model, slow bursting is mediated by the glycolytic oscillations driving changes in the production of ATP and the conductance of the  $K_{ATP}$  channels (Fig. 7B). On the other hand, fast bursting depends entirely on the electrical component (Fig. 7C). Finally, compound bursting is driven by both the electrical and glycolytic components (Fig. 7D). In the DOM model, the glycolytic oscillations are mediated by the feedback of the



**Figure 7.** Intrinsic metabolic oscillations (DOM model). (A) Diagram of the DOM model. The interactions between glycolytic, metabolic, and electrical components drive different electrical behaviors (simulations shown in B–D) depending on the regime of the glycolytic and electrical components. Glucose is metabolized by the glycolytic and metabolic components controlling the production of ATP, which mediate the changes in the conductance of the  $K_{ATP}$  channels, depolarization, and  $Ca^{2+}$  influx. The 3 compartments (glycolytic, electrical, and metabolic) are affected by the changes in  $[Ca^{2+}]_i$ . (B) Slow bursting is produced entirely by oscillatory glycolysis. (C) Fast bursting produced by the electrical component. (D) The combination of glycolytic and electrical components produces compound bursting activity. (B–D) Top:  $V_m$  (black curve) and the state of glycolysis (represented by F6P, orange curve). Bottom:  $[Ca^{2+}]_i$  (yellow curve) and  $[ATP]_i$  (green curve).

product FBP onto the PFK reaction. Although this hypothesis has been questioned,<sup>107,108</sup> in recent years, some of the predictions of the DOM model have acquired experimental support. For example, oscillations in the membrane conductance of mouse  $\beta$ -cells were associated with changes in the conductance of  $K_{ATP}$  channels due to intrinsic metabolic oscillations and not because of oscillations produced by the effects of  $Ca^{2+}$  in the production of ATP.<sup>122</sup> Moreover, direct experimental evidence of oscillations in the glycolytic pathway<sup>123,124</sup> have recently been presented. In addition, it is important to mention that the DOM model is the only model capable of reproducing other recent experimental observations. For instance, Merrins et al.<sup>125</sup> showed that in some cells, metabolic oscillations persisted in the absence of  $Ca^{2+}$  oscillations, while in the majority of cells the metabolic oscillations were abolished. In the latter case, it was possible to restore metabolic oscillations by a non-oscillating elevation of  $[Ca^{2+}]_i$  (i.e. by depolarizing with KCl). The DOM model reproduces these observations<sup>125</sup> given that  $Ca^{2+}$  oscillations are not needed by the model to produce metabolic oscillations. Moreover, based on their simulations with a reduced version of the DOM model, the authors have proposed that the distinct behaviors mentioned above could be mediated by different rates of the enzyme glucokinase among the cells.<sup>126</sup> In contrast, in other models (e.g., the models of Fridlyand et al.,<sup>106,116</sup> Keizer and Magnus<sup>99</sup> and Diederichs<sup>107,108</sup>), metabolic oscillations are secondary to  $Ca^{2+}$  oscillations, thus membrane hyperpolarization (i.e., preventing  $Ca^{2+}$  influx) and a fixed  $[Ca^{2+}]_i$ , mandatorily abolishes metabolic oscillations. It is worth noting that, as in the case of the models based on the cyclical changes in the conductance of the  $K_{ATP}$  channels as the mechanism underlying bursting electrical activity, the DOM model is not able to explain the origin of the oscillations in  $V_m$  and  $[Ca^{2+}]_i$  observed in  $\beta$ -cells lacking functional  $K_{ATP}$  channels.<sup>104,105</sup>

Other models of the rodent  $\beta$ -cell<sup>127,128</sup> have focused on the role of the ionic channels and transport mechanisms in the glucose induced electrical activity by including a more complete description of the electrophysiological properties of the cell. In fact, recent proposals<sup>17,98</sup> of the potential role of the different ionic currents in the electrical activity of the mouse  $\beta$ -cell involves the participation of several ionic transport mechanisms. In order to test the plausibility of this proposal by means of a computational model, an accurate and complete representation of all the mechanisms involved must be included.

### Models of human $\beta$ -cells

All the models described so far have been built based on rodent experimental data, assuming that these are a reasonable model for the human  $\beta$ -cell. However, it has been shown that there are several important differences between species at different levels, including, for example, the proportions and distribution of the different cells in the islets of Langerhans,<sup>129,130</sup> the glucose threshold at which insulin starts to be secreted,<sup>131,132</sup> the kinetics of insulin exocytosis,<sup>133</sup> and the ionic channels expressed and their role in electrical activity and insulin secretion.<sup>10,20,22</sup> Human  $\beta$ -cells have ATP-dependent  $K^+$  channels; T, L, and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels; voltage-gated  $Na^+$  channels; large and

small conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels (SK and BK respectively); inwardly rectifying and delayed rectifier  $K^+$  channels; HERG  $K^+$  channels; and transient receptor potential (TRP) channels.<sup>10,22,24</sup> Interestingly, in contrast to rodent cells, the most frequently observed electrical patterns in human  $\beta$ -cells consist of single action potential firing or fast bursting,<sup>10,24,27</sup> although slow bursting has been recently reported.<sup>28</sup>

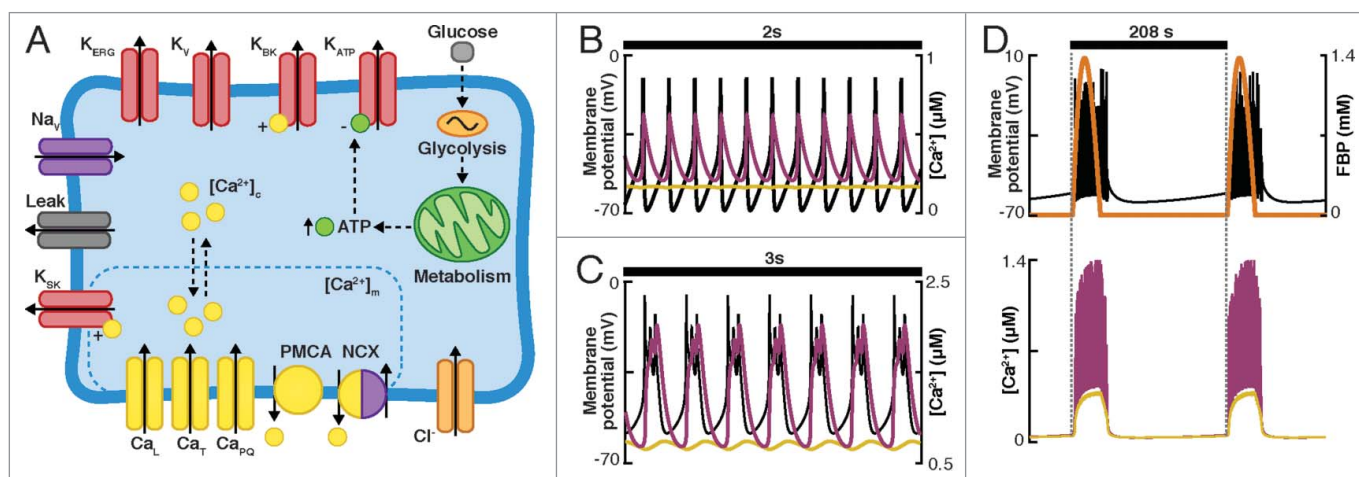
Based on these differences, mathematical models of human  $\beta$ -cells have recently been developed. Pedersen<sup>27</sup> built the first mathematical model based entirely on electrophysiological data from human  $\beta$ -cells.<sup>22,23,134,135</sup> A limitation of this model is the absence of  $Ca^{2+}$  dynamics, metabolism, and SK channels, considering only the interaction between ionic channels. On the other hand, Fridlyand et al.<sup>24</sup> also proposed a model based on human data, but in contrast to Pedersen's model, their model included  $Ca^{2+}$  dynamics (although based on mouse experimental data), the SK current, and a minimal model of insulin secretion. Despite their limitations, several experimental observations can be reproduced using these models, like the firing of action potentials, fast bursting, and the effect of channel blockers in electrical activity.

Recently, Riz et al.<sup>28</sup> added the SK channels and  $Ca^{2+}$  dynamics to Pedersen's model of the human  $\beta$ -cell (Fig. 8A). Specifically, a cytosolic and a sub-membrane  $Ca^{2+}$  compartment were included. Besides the action potential firing (Fig. 8B) and fast bursting (Fig. 8C) produced by the sub-membrane  $Ca^{2+}$ -feedback onto the SK channels (resembling the mechanism of the CK model), this model reproduced slow bursting activity (Fig. 2B and Fig. 8D) due to the addition of a slow glycolytic component that drives changes in ATP and the conductance of the  $K_{ATP}$  channels.

It is evident that models of human  $\beta$ -cells are in an early stage compared to models of rodent  $\beta$ -cells. However, the former are likely to evolve rapidly and contribute to the understanding of the pathogenesis of T2D and other related diseases.

## Discussion

Insulin-secreting  $\beta$ -cells have been intensively studied in the last decades, both experimentally and theoretically. In this review, we have described the main hypotheses behind the mathematical models of  $\beta$ -cells from a physiological viewpoint. It has been shown how models have evolved and grown in complexity as experimental evidence has emerged. Although models have contributed to a better understanding of the GSIS at the cellular level, there are still several open questions. One of the most important is to elucidate the origin of the heterogeneous oscillations observed in  $\beta$ -cells when exposed to stimulatory concentrations of glucose. This has been one of the main objectives of the models of  $\beta$ -cells. In a recent review, Fridlyand et al.<sup>26</sup> analyzed both the experiments and the mathematical models in order to identify possible cellular mechanisms behind these different behaviors. They concluded that a single mechanism is not capable of generating all the electrical behaviors, but that each of these behaviors could be driven by a different mechanism. In contrast,



**Figure 8.** (A) Diagram of the mechanisms included in the model of Riz et al. of human  $\beta$ -cells.<sup>28</sup> Channels included in the model: ATP-dependent  $K^+$  channels ( $K_{ATP}$ ), big and small conductance  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels ( $K_{BK}$  and  $K_{SK}$ ), voltage-dependent  $K^+$  channels ( $K_V$ ), HERG- $K^+$  channels ( $K_{ERG}$ ), voltage-dependent  $Na^+$  channels ( $Na_V$ ), L, T and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels ( $Ca_L$ ,  $Ca_T$ ,  $Ca_{PQ}$ , respectively),  $Cl^-$  channels (representing the current mediated by the neurotransmitter  $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA). The  $Ca^{2+}$  dynamics included a cytoplasmic and a submembrane compartment and the plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase (PMCA) and  $Na^+$ / $Ca^{2+}$  exchanger (NCX). (B–D) Simulations of  $V_m$  (black curve), submembrane  $Ca^{2+}$  (pink curve), intracellular  $Ca^{2+}$  (yellow curve), and glycolysis (FBP, orange curve) are shown. (B) Action potential firing. (C) Fast bursting. (D) Slow bursting.

Bertram et al.<sup>77,136</sup> have proposed that different regimes of a single mechanism composed by the interacting glycolytic, electrical, and mitochondrial components (DOM model) can explain the variety of behaviors observed in  $\beta$ -cells from rodents. The latter proposal has received both indirect and direct evidence (as discussed above). In our opinion, given the experimental support it has acquired, the DOM model is currently the most comprehensive mathematical model in terms of both the experimental observations it can reproduce and the cellular mechanisms that it includes. Merrins et al.<sup>123</sup> have developed a technique to measure glycolytic oscillations, which opens the door to the possibility of testing the validity of the assumptions and predictions of the DOM model experimentally. In fact, using this novel technique, the authors presented convincing evidence that glycolytic oscillations are in phase with the mitochondrial redox potential,<sup>123</sup> which was also predicted by the DOM model.<sup>77</sup>

Another important question is how the differences between rodent and human  $\beta$ -cells affect the secretion of insulin. As mentioned above, most of the models are based on experimental data from rodent  $\beta$ -cells, while models for human  $\beta$ -cells were only recently developed. Models of rodent  $\beta$ -cells have achieved a high level of complexity; to such an extent that detailed mathematical descriptions of glucose metabolism and  $Ca^{2+}$ -handling have already been incorporated. On the other hand, mathematical models of human  $\beta$ -cells are still incomplete because of the lack of sufficient experimental data. In this regard, detailed measurements of intracellular ionic concentrations and metabolic variables would be extremely helpful to extend the current models and simulate the human  $\beta$ -cell more accurately. In spite of these limitations, significant and substantial progress has been made recently, by identifying the possible role of the ionic channels in the generation of action potentials firing and fast bursting,<sup>24,27</sup>

and the possible participation of metabolism in slow bursting behavior.<sup>28</sup>

In the beginning, mathematical models of the electrical activity of pancreatic  $\beta$ -cells were devoted to finding plausible explanations for experimental observations. However, interesting applications have been given to these models in order to use them in more realistic and complex scenarios. Some of the models have been extended to study the dynamics of insulin granule exocytosis. For example, Pedersen et al.<sup>137</sup> used a model of the electrical activity of the human  $\beta$ -cell<sup>27</sup> along with a compartmental description of  $Ca^{2+}$  dynamics and insulin exocytosis to evaluate the contribution of the different  $Ca^{2+}$  channels during exocytosis.

Models of  $\beta$ -cells have also been useful for investigating the importance of  $\beta$ -cell coupling in the islets of Langerhans, given that it has been proposed that in order to obtain proper insulin secretion in response to a glucose stimulus, the secretion of the  $\beta$ -cells must be synchronized (intra-islet synchronization). This has been tested theoretically, assuming there is electrical coupling between  $\beta$ -cells through gap junctions within the islets of Langerhans.<sup>138,139</sup> Similarly, mathematical models have been used to identify possible mechanisms for islet synchronization (inter-islet synchronization).<sup>136,138</sup> In a recent review, Han et al.<sup>140</sup> described how mathematical models have been used to study the effect of both  $\beta$ -cell interconnection through gap-junctions and paracrine interactions between islet cells.

Another of the aspects recently explored is the inclusion of models of  $\beta$ -cells in multiscale models. For example, Chew et al.<sup>141</sup> coupled the Dual Oscillator Model to a model that describes the whole-body glucose regulation system during an oral glucose tolerance test. The aim of this model was to study the changes in the electrical pattern of  $\beta$ -cells due to real changes in blood glucose concentration, as opposed to the models of



single  $\beta$ -cells, in which glucose is assumed to be in steady state. It would be interesting to adopt this multiscale approach using a model of human  $\beta$ -cells, such that differences between species are considered.

Given that  $\beta$ -cell dysfunction is implicated in the pathogenesis of T2D, it is likely that mathematical models of human  $\beta$ -cells will evolve rapidly as more experimental data become available. It is also expected that all this progress in the field of mathematical models of  $\beta$ -cells will contribute to the design of new therapies for treating diseases related to the glucose-insulin regulatory system, like T2D. For instance, it has been suggested that mathematical models of  $\beta$ -cells could establish the principles of design for engineered cells capable of sensing glucose and secreting insulin.<sup>112,142</sup>

Considering the importance of the changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in GSIS, it is surprising that the spatial aspects have not been explicitly considered in the models of  $\beta$ -cells. We think that a necessary extension to the models is the inclusion of a more realistic description of the spatiotemporal distribution of  $[Ca^{2+}]_i$ , such as its effects on the different cellular processes (e.g., regulation of ionic channels, metabolism, insulin exocytosis) occurring at different locations of the intracellular space are adequately simulated.

For several reasons, mathematical modeling is limited by unavoidable simplifications and assumptions at different levels. For example, when the CK model<sup>89</sup> appeared, detailed information about the cellular mechanisms involved in the electrical activity of the  $\beta$ -cell was lacking, which was reflected in the simplicity of the model. The same can be said about the model of the human  $\beta$ -cell of Pedersen,<sup>27</sup> given that the number of studies on human  $\beta$ -cells is scarce in comparison to those of rodent cells, perhaps because of the limited availability of human tissue.

However, these minimal models have served as a starting point for further development. It is important to note that as more pieces of experimental evidence have emerged, models have been modified consequently. This can be seen for example in the evolution of the models of the different groups (e.g., Chay,<sup>89,94,111</sup> Fridlyand et al.<sup>26,106,116</sup> and Bertram et al.<sup>16,25,77</sup>), that have been extended progressively.

Most of the models reviewed in this work have been built in order to reproduce specific experimental observations at the cellular level, aiming to propose plausible hypotheses that explain the origin of the phenomenon under study. This kind of models (often referred to as "whole cell models")<sup>143</sup> are constructed by combining individual models of each cellular process considered (e.g., ionic channels,  $Ca^{2+}$  handling, metabolism), hence simplifications and/or assumptions can be made in each of the individual models depending on the objective of the study. It can be said that the majority of the models attempt to capture the qualitative, rather than the quantitative aspects of the functioning of the  $\beta$ -cells. In our opinion, most of the simplifications and assumptions are understandable given the complexity of the system, as long as the implications of the resulting simulations, whether hypotheses or predictions, are bounded accordingly.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### Funding

G. Félix-Martínez was supported by a graduate scholarship (No. 228853) from CONACYT (Mexican Council of Science and Technology).

#### References

1. Matthews DR, Lang DA, Burnett MA, Turner RC. Control of pulsatile insulin secretion in man. *Diabetologia* 1983; 24:231-7; PMID:6345247; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00282705>
2. Hellman B. Pulsatility of insulin release – a clinically important phenomenon. *Ups J Med Sci* 2009; 114:193-205; PMID:19961265; <http://dx.doi.org/10.3109/03009730903366075>
3. Lang DA, Matthews DR, Burnett M, Turner RC. Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes* 1981; 30:435-9; PMID:7014311; <http://dx.doi.org/10.2337/diab.30.5.435>
4. Michael DJ, Xiong W, Geng X, Drain P, Chow RH. Human insulin vesicle dynamics during pulsatile secretion. *Diabetes* 2007; 56:1277-88; PMID:17317765; <http://dx.doi.org/10.2337/db06-0367>
5. Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC, Gilon P. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest* 2003; 33:742-50; PMID:12925032; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2362.2003.01207.x>
6. Henquin JC. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in  $\beta$ -cells. *Diabetes Res Clin PR* 2011; 93: S27-31; [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70010-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70010-9)
7. Henquin JC. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 2009; 52:739-51; PMID:19288076; <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-009-1314-y>
8. Basu A, Pedersen MG, Cobelli C. Prediabetes: Evaluation of  $\beta$ -cell function. *Diabetes* 2012; 61:270-1; PMID:22275083; <http://dx.doi.org/10.2337/db11-1677>
9. Bennett K, James C, Hussain K. Pancreatic  $\beta$ -cell  $K_{ATP}$  channels: Hypoglycaemia and hyperglycaemia. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11:157-63; PMID:20878482; <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-010-9144-2>
10. Rorsman P, Braun M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol* 2013; 75:155-79; PMID:22974438; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>
11. Rosengren AH, Braun M, Mahdi T, Andersson SA, Travers ME, Shigeto M, Zhang E, Almgren P, Ladenvall C, Axelsson AS, et al. Reduced insulin exocytosis in human pancreatic  $\beta$ -cells with gene variants linked to type 2 diabetes. *Diabetes* 2012; 61:1726-33; PMID:22492527; <http://dx.doi.org/10.2337/db11-1516>
12. Tarasov AI, Griffiths EJ, Rutter GA. Regulation of ATP production by mitochondrial  $Ca^{2+}$ . *Cell Calcium* 2012; 52:28-35; PMID:22502861; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2012.03.003>
13. Kanat M, Mari A, Norton L, Winnier D, DeFronzo RA, Jenkinson C, Abdul-Ghani MA. Distinct  $\beta$ -cell defects in impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2012; 61:447-53; PMID:22275086; <http://dx.doi.org/10.2337/db11-0995>
14. Rinzel J. Bursting oscillations in an excitatory membrane model. In: Sleeman BD, Jarvis RJ, ed. *Lecture Notes in Mathematics*, Vol. 1151. Berlin: Springer Heidelberg; 1985:pp. 304-16
15. Bertram R, Sherman A. Negative calcium feedback: the road from Chay-Keizer. In: Combes S, Bressloff PC, editors. *Bursting: The Genesis of Rhythm in the Nervous System*. Singapore: World Scientific; 2005:pp. 19-48
16. Bertram R, Sherman A. A calcium-based phantom bursting model for pancreatic islets. *B Math Biol* 2004; 66:1313-44; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bulm.2003.12.005>
17. Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M. Electrophysiology of islet cells. *Adv Exp Med Biol* 2010; 654:115-63; PMID:20217497; [http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3\\_7](http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3_7)
18. Ashcroft FM, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Prog Biophys Molec Biol* 1989; 54:87-143; [http://dx.doi.org/10.1016/0079-6107\(89\)90013-8](http://dx.doi.org/10.1016/0079-6107(89)90013-8)
19. Meissner H, Schmelz H. Membrane potential of beta-cells in pancreatic islets. *Physiol Arch* 1974; 351:195-206; PMID:4608967; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00586918>
20. Hiriart M, Aguilar-Bryan L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295:E1298-306; PMID:18940941; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.90493.2008>
21. Ashcroft FM, Rorsman P.  $K_{ATP}$  channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9(11):660-69;

- PMID:24042324; <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2013.166>
22. Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M, Zhang Q, Karanauskaitė J, Partridge C, Johnson PR, Rorsman P. Voltage-gated ion channels in human pancreatic  $\beta$ -cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 2008; 57:1618-28; PMID:18390794; <http://dx.doi.org/10.2337/db07-0991>
  23. Misler S, Barnett DW. Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human  $\beta$ -cells. *Diabetes* 1992; 41:1221-8; PMID:1397696; <http://dx.doi.org/10.2337/diab.41.10.1221>
  24. Fridlyand LE, Jacobson DA, Philipson LH. Ion channels and regulation of insulin secretion in human  $\beta$ -cells: a computational systems analysis. *Islets* 2013; 5:1-15; PMID:23624892; <http://dx.doi.org/10.4161/isl.24166>
  25. Bertram R, Previtte J, Sherman A, Kinard TA, Satin LS. The phantom burster model for pancreatic  $\beta$ -cells. *Biophys J* 2000; 79:2880-92; PMID:11106596; [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76525-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76525-8)
  26. Fridlyand LE, Tamarina N, Philipson LH. Bursting and calcium oscillations in pancreatic  $\beta$ -cells: specific pacemakers for specific mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299:E517-32; PMID:20628025; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00177.2010>
  27. Pedersen MG. A biophysical model of electrical activity in human  $\beta$ -cells. *Biophys J* 2010; 99:3200-7; PMID:21081067; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.09.004>
  28. Riz M, Braun M, Pedersen MG. Mathematical modeling of heterogeneous electrophysiological responses in human  $\beta$ -cells. *PLoS Comp Biol* 2014; 10(1):e1003389; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003389>
  29. Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M. Widespread synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* 1991; 418:417-22; PMID:1876486; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00550880>
  30. Valdeolmillos M, Santos RM, Contreras D, Soria B, Rosario LM. Glucose-induced oscillations of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett* 1989; 259:19-23; PMID:2689228; [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81484-X](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(89)81484-X)
  31. Barnett DW, Pressel DM, Misler S. Voltage-dependent  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  currents in human pancreatic islet  $\beta$ -cells: evidence for roles in the generation of action potentials and insulin secretion. *Pflug Arch Eur J Phy* 1995; 431:272-82; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00410201>
  32. Pressel DM, Misler S. Sodium channels contribute to action potential generation in canine and human pancreatic islet B cells. *J Membrane Biol* 1990; 116:273-80; <http://dx.doi.org/10.1007/BF01868466>
  33. Gilon P, Henquin J. Influence of membrane potential changes on cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem* 1992; 267(29), 20713-20; PMID:1400388
  34. Ammälä C, Eliasson L, Bokvist K, Larsson O, Rorsman P. Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 1993; 472:665-88;
  35. Gilon P, Shepherd RM, Henquin JC. Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  as evidences in single pancreatic islets. *J Biol Chem* 1993; 227:75-68
  36. Hellman B, Gylfe E, Bergsten P, Grapengiesser E, Lund PE, Berts A, Tengholm A, Pipeleers DG, Ling Z. Glucose induces oscillatory  $Ca^{2+}$  signalling and insulin release in human pancreatic beta cells. *Diabetologia* 1994; 37:S11-20; PMID:7821725; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00400821>
  37. Chen L, Koh D-S, Hille B. Dynamics of calcium clearance in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 2003; 52(7), 1723-31; PMID:12829639; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.52.7.1723>
  38. Herchuelz A, Kamagate A, Ximenes H, van Eylen F. Role of  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange and the plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase in  $\beta$ -Cell function and death. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1099:456-67; PMID:17446486; <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1387.048>
  39. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4 (7):517-29; PMID:12838355; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1155>
  40. Arredouani A, Henquin JC, Gilon P. Contribution of the endoplasmic reticulum to the glucose-induced  $[Ca^{2+}]_i$  response in mouse pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282:E982-91; PMID:11934662
  41. Gilon P. Uptake and release of  $Ca^{2+}$  by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration triggered by  $Ca^{2+}$  influx in the electrically excitable pancreatic B-cell. *J Biol Chem* 1999; 274:20197-205; PMID:10400636; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.29.20197>
  42. Tamarina NA, Kuznetsov A, Rhodes CJ, Bindokas VP, Philipson LH. Inositol (1,4,5)-trisphosphate dynamics and intracellular calcium oscillations in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 2005; 54:3073-81; PMID:16249428; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.54.11.3073>
  43. Islam MS. The ryanodine receptor calcium channel of  $\beta$ -cells: molecular regulation and physiological significance. *Diabetes* 2002; 51:1299-309; PMID:11978625; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.51.5.1299>
  44. Hellman B, Gylfe E. Mobilization of different intracellular calcium pools after activation of muscarinic receptors in pancreatic beta-cells. *Pharmacology* 1986; 32:257-67; PMID:3086908; <http://dx.doi.org/10.1159/000138178>
  45. Beauvois MC, Merezak C, Jonas JC. Glucose-induced mixed  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in mouse  $\beta$ -cells are controlled by the membrane potential and the SERCA3  $Ca^{2+}$ -ATPase of the endoplasmic reticulum. *Am J Cell Physiol* 2006; 290:C1503-11; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00400.2005>
  46. Denton RM, McCormack JG. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 1980; 119:1-8; PMID:7000543; [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80986-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(80)80986-0)
  47. Heart E, Corkey RF, Wikstrom JD, Shirihai OS, Corkey BE. Glucose-dependent increase in mitochondrial membrane potential, but not cytoplasmic calcium, correlates with insulin secretion in single islet cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290:E143-48; PMID:16144817; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00216.2005>
  48. Magnus G, Keizer J. Minimal model of  $\beta$ -cell mitochondrial  $Ca^{2+}$  handling. *Am J Physiol* 1997; 273: C717-33; PMID:9277370
  49. Tarasov AI, Semplici F, Ravier MA, Bellomo EA, Pullen TJ, Gilon P, Sekler I, Rizzuto R, Rutter GA. The mitochondrial  $Ca^{2+}$  uniporter MCU is essential for glucose-induced ATP increases in pancreatic  $\beta$ -cells. *PLoS ONE* 2012; 7:e39722; PMID:22829870; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0039722>
  50. Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, et al. NCLX is an essential component of mitochondrial  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:436-41; PMID:20018762; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0908099107>
  51. Maechler P. Mitochondrial function and insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 379:12-8; PMID:23792187; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.019>
  52. Wiederkehr A, Wollheim CB. Impact of mitochondrial calcium on the coupling of metabolism to insulin secretion in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Cell Calcium* 2008; 44:64-76; PMID:18191448; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2007.11.004>
  53. Wiederkehr A, Wollheim CB. Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 353:128-37; PMID:21784130; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.016>
  54. Prentki M, Matschinsky FM, Madiraju SRM. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab* 2013; 18:162-85; PMID:23791483; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.018>
  55. Li J, Shuai HY, Gylfe E, Tengholm A. Oscillations of sub-membrane ATP in glucose-stimulated beta cells depend on negative feedback from  $Ca^{2+}$ . *Diabetologia* 2013; 56:1577-86; PMID:23536115; <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-013-2894-0>
  56. Takahashi N, Kadowaki T, Yazaki Y, Ellis-Davies GC, Miyashita Y, Kasai H. Post-priming actions of ATP on  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:760-5; PMID:9892707; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.2.760>
  57. Wiederkehr A, Szcanda G, Akhmedov D, Matak C, Heizmann CW, Schoonjans K, Pozzan T, Spät A, Wollheim CB. Mitochondrial matrix calcium is an activating signal for hormone secretion. *Cell Metab* 2011; 13:601-11; PMID:21531342; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.015>
  58. Civelek VN, Deeney JT, Shalovsky NJ, Tornheim K, Hansford RJ, Prentki M, Corkey BE. Regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mitochondrial metabolism: influence of  $Ca^{2+}$ , substrate and ADP. *Biochem J* 1996; 318:615-21; PMID:88099055
  59. McCormack JG, Longo EA, Corkey BE. Glucose-induced activation of pyruvate dehydrogenase in isolated rat pancreatic islets. *Biochem J* 1990; 267:527-30; PMID:2185742
  60. Denton RM. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787:1309-16; PMID:19413950; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.005>
  61. Krippel-Drews P, Düfer M, Drews G. Parallel oscillations of intracellular calcium activity and mitochondrial membrane potential in mouse pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267:179-83; PMID:10623595; <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1999.1921>
  62. Kindmark H, Köhler M, Brown G, Bränström R, Larsson O, Berggren PO. Glucose-induced oscillations in cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  concentration precede oscillations in mitochondrial membrane potential in the pancreatic  $\beta$ -cell. *J Biol Chem* 2001; 276:34530-6; PMID:11445566; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M102492200>
  63. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287(4):C817-33; PMID:15355853
  64. Pralong WF, Spät A, Wollheim CB. Dynamic pacing of cell metabolism by intracellular  $Ca^{2+}$  transients. *J Biol Chem* 1994; 269:27310-4; PMID:7961642
  65. Hellman B, Idahl L-A, Lernmark A, Sehlin J, Taljedal I-B. The pancreatic  $\beta$ -cell recognition of insulin secretagogues. Effects of calcium and sodium on glucose metabolism and insulin release. *Biochem J* 1974; 138:33-45; PMID:4601168
  66. Fridlyand LE, Philipson LH. Glucose sensing in the pancreatic beta cell: a computational systems analysis. *Theor Biol Med Model* 2010; 7:15; PMID:20497556; <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4682-7-15>
  67. Fridlyand LE, Philipson LH. Mechanisms of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell: A computational systems-



- based analysis. *Islets* 2011; 3:224-30; PMID:21814042; <http://dx.doi.org/10.4161/isl.3.5.16409>
68. Maechler P, Kennedy ED, Pozzan T, Wollheim CB. Mitochondrial activation directly triggers the exocytosis of insulin in permeabilized pancreatic  $\beta$ -cells. *EMBO J* 1997; 16:3833-41; PMID:9233793; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.13.3833>
  69. Nilsson T, Schultz V, Berggren PO, Corkey BE, Tornheim K. Temporal patterns of changes in ATP/ADP ratio, glucose 6-phosphate and cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  in glucose-stimulated pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem J* 1996; 314:91-4; PMID:8660314
  70. Kennedy HJ, Pouli AE, Ainscow EK. Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 1999; 274(19):13281-91; PMID:10224088; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.19.13281>
  71. Kennedy RT, Kauri LM, Dahlgren GM, Jung S-K. Metabolic oscillations in  $\beta$ -cells. *Diabetes* 2002; 51(Suppl 1):S152-61; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S152>
  72. Ainscow EK, Rutter GA. Glucose-stimulated oscillations in free cytosolic ATP concentration imaged in single islet  $\beta$ -cells: evidence for a  $Ca^{2+}$ -dependent mechanism. *Diabetes* 2002; 51(Suppl 1):S162-70; PMID:11815476; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S162>
  73. Luciani DS, Misler S, Polonsky KS.  $Ca^{2+}$  controls slow NAD(P)H oscillations in glucose-stimulated mouse pancreatic islets. *J Physiol* 2006; 572:379-92; PMID:16455690; <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2005.101766>
  74. Jung SK, Aspinwall CA, Kennedy RT. Detection of multiple patterns of oscillatory oxygen consumption in single mouse islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259:331-5; PMID:10362508; <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1999.0784>
  75. Tengholm A, Gylfe E. Oscillatory control of insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 297:58-72; PMID:18706473; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2008.07.009>
  76. Smolen P. A model for glycolytic oscillations based on skeletal muscle phosphofructokinase kinetics. *J Theor Biol* 1995; 174:137-48; PMID:7643610; <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.1995.0087>
  77. Bertram R, Satin LS, Pedersen MG, Luciani DS, Sherman A. Interaction of glycolysis and mitochondrial respiration in metabolic oscillations of pancreatic islets. *Biophys J* 2007; 92:1544-55; PMID:17172305; <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.097154>
  78. Detimary P, Gilon P, Henquin J. Interplay between cytoplasmic  $Ca^{2+}$  and the ATP/ADP ratio: a feedback control mechanism in mouse pancreatic islets. *Biochem J* 1998; 333:269-74; PMID:9657965
  79. Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, Takashima S, Fukuoka H, Noji H, Kakizuka A, Imamura H. Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial  $Ca^{2+}$  influx and subsequent  $Ca^{2+}$  oscillations. *J Biol Chem* 2014; 289:2205-16; PMID:24302735; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.499111>
  80. Maechler P, Carobbio S, Rubi B. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell B* 2006; 38(5-6): 696-709; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2005.12.006>
  81. Blake R, Trounce IA. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840:1404-12; PMID:24246956; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.007>
  82. Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Sign* 2010; 12:537-77; <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2009.2531>
  83. Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, Del Prato S, Rabuazzo AM, Purrello F, Marchetti P. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2005; 48:282-9; PMID:15654602; <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-004-1627-9>
  84. Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, Torri S, Pollera M, Boggi U, Mosca F, et al. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54(3):727-35; PMID:15734849; /10.2337/diabetes.54.3.727
  85. Dean PM, Matthews EK. Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* 1968; 219:389-90; PMID:4873864; <http://dx.doi.org/10.1038/219389a0>
  86. Dean PM, Matthews EK. Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells. *J Physiol* 1970; 210:255-64; PMID:5501259
  87. Kinard TA, de Vries G, Sherman A, Satin LS. Modulation of the bursting properties of single mouse pancreatic  $\beta$ -cells by artificial conductances. *Biophys J* 1999; 76:1423-35; PMID:10049324; [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77303-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77303-0)
  88. Gilon P, Ravier MA, Jonas JC, Henquin JC. Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. *Diabetes* 2002; 51(Suppl 1):S144-51; PMID:11815474; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S144>
  89. Chay TR, Keizer J. Minimal model for membrane oscillations in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Biophys J* 1983; 42:181-9; PMID:6305437; [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(83\)84384-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(83)84384-7)
  90. Atwater I, Rosario L, Rojas E. Properties of the Ca-activated  $K^+$  channel in pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell Calcium* 1983; 4:451-61; PMID:6323007; [http://dx.doi.org/10.1016/0143-4160\(83\)90021-0](http://dx.doi.org/10.1016/0143-4160(83)90021-0)
  91. Kukuljan M, Goncalves AA, Atwater I. Charybdoxin-sensitive  $K_{(Ca)}$  channel is not involved in glucose-induced electrical activity in pancreatic  $\beta$ -cells. *J Membrane Biol* 1991; 119:187-95; <http://dx.doi.org/10.1007/BF01871418>
  92. Houamed KM, Sweet IR, Satin LS. BK channels mediate a novel ionic mechanism that regulates glucose-dependent electrical activity and insulin secretion in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *J Physiol* 2010; 588:3511-23; PMID:20643769; <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2009.184341>
  93. Rorsman P, Trube G. Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic  $\beta$ -cells under voltage-clamp conditions. *J Physiol* 1986; 374:531-50; PMID:2427706
  94. Chay TR. The effect of inactivation of calcium channels by intracellular  $Ca^{2+}$  ions in the bursting pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell Biophys* 1987; 11(1): 77-90; PMID:2450671; <http://dx.doi.org/10.1007/BF02797114>
  95. Plant TD. Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *J Physiol* 1988; 404:731-47; PMID:2855352
  96. Cook D. Intracellular ATP directly blocks  $K^+$  channels in pancreatic B-cells. *Nature* 1984; 311:271-3; PMID:6090930; <http://dx.doi.org/10.1038/311271a0>
  97. Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJH. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* 1984; 312:446-8; PMID:6095103; <http://dx.doi.org/10.1038/312446a0>
  98. Rorsman P, Eliasson L, Kanno T, Zhang Q, Göpel S. Electrophysiology of pancreatic  $\beta$ -cells in intact mouse islets of Langerhans. *Prog Biophys Mol Biol* 2011; 107:224-35; PMID:21762719; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2011.06.009>
  99. Keizer J, Magnus G. ATP-sensitive potassium channel and bursting in the pancreatic beta cell. A theoretical study. *Biophys J* 1989; 56:229-42; PMID:2673420; [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82669-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82669-4)
  100. Magnus G, Keizer J. Model of  $\beta$ -cell mitochondrial calcium handling and electrical activity. II. Mitochondrial variables. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 274:1158-73;
  101. Magnus G, Keizer J. Model of  $\beta$ -cell mitochondrial calcium handling and electrical activity. I. Cytoplasmic variables. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 274:1174-84.
  102. Smolen P, Keizer J. Slow voltage inactivation of  $Ca^{2+}$  currents and bursting mechanisms for the mouse pancreatic beta-cell. *J Membrane Biol* 1992; 127:9-19; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00232754>
  103. Larsson O, Kindmark H, Brandstrom R, Fredholm B, Berggren PO. Oscillations in  $K_{ATP}$  channel activity promote oscillations in cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  concentration in the pancreatic  $\beta$  cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:5161-5; PMID:8643546; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.10.5161>
  104. Düfer M, Haspel D, Krippel-Dreus P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Dreus G. Oscillations of membrane potential and cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in SUR1 $^{-/-}$  beta cells. *Diabetologia* 2004; 47:488-98; PMID:14872319; <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-004-1348-0>
  105. Ravier MA, Nenquin M, Miki T, Seino S, Henquin JC. Glucose controls cytosolic  $Ca^{2+}$  and insulin secretion in mouse islets lacking adenosine triphosphate-sensitive  $K^+$  channels owing to a knockout of the pore-forming subunit Kir6.2. *Endocrinology* 2009; 150:33-45; PMID:18787024; <http://dx.doi.org/10.1210/en.2008-0617>
  106. Fridlyand LE, Tamarina N, Philipson LH. Modeling of  $Ca^{2+}$  flux in pancreatic  $\beta$ -cells: role of the plasma membrane and intracellular stores. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:138-54
  107. Diederichs F. Mathematical simulation of membrane processes and metabolic fluxes of the pancreatic  $\beta$ -cell. *B Math Biol* 2006; 68:1779-818; <http://dx.doi.org/10.1007/s11538-005-9053-9>
  108. Diederichs F. Ion homeostasis and the functional roles of SERCA reactions in stimulus-secretion coupling of the pancreatic  $\beta$ -cell: A mathematical simulation. *Biophys Chem* 2008; 134:119-43; PMID:18321634; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2008.02.001>
  109. Smith PA, Ashcroft FM, Rorsman P. Simultaneous recordings of glucose dependent electrical activity and ATP-regulated  $K^+$ -currents in isolated mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *FEBS Lett* 1990; 261:187-90; PMID:2407553; [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80667-8](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)80667-8)
  110. Bertram R, Smolen P, Sherman A, Mears D, Atwater I, Martin F, Sorra B. A role for calcium release-activated current (CRAC) in cholinergic modulation of electrical activity in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biophys J* 1995; 2323-32; PMID:7647236; [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80414-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80414-5)
  111. Chay TR. Electrical bursting and luminal calcium oscillation in excitable cell models. *Biol Cybern* 1996; 75:419-31; PMID:8983163; <http://dx.doi.org/10.1007/s004220050307>
  112. Sherman A. Lessons from models of pancreatic beta cells for engineering glucose-sensing cells. *Math Biosci* 2010; 227:12-9; PMID:20580727; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2010.05.005>
  113. Gilon P, Henquin J-C. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic  $\beta$ -Cell function. *Endocr Rev* 2001; 22(5):565-604; PMID:11588141
  114. Göpel S, Kanno T, Barg S, Eliasson L. Activation of  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels contributes to rhythmic firing of action potentials in mouse pancreatic  $\beta$  cells. *J Gen Physiol* 1999; 114:759-69; PMID:10578013; <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.114.6.759>
  115. Goforth PB. Calcium-activated  $K^+$  Channels of mouse  $\beta$ -cells are controlled by both store and cytoplasmic

- Ca<sup>2+</sup>: experimental and theoretical studies. *J Gen Physiol* 2002; 120:307-22; PMID:12198088; <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.20028581>
116. Fridlyand LE, Ma L, Philipson LH. Adenine nucleotide regulation in pancreatic  $\beta$ -cells: modeling of ATP/ADP-Ca<sup>2+</sup> interactions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E839-48; PMID:15985450; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00595.2004>
  117. Grapengiesser E. Glucose induces cytoplasmic Na<sup>+</sup> oscillations in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226:830-5; PMID:8831697; <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1996.1436>
  118. Cha CY, Nakamura Y, Himeno Y, Wang J, Fujimoto S, Inagaki N, Earm YE, Noma A. Ionic mechanisms and Ca<sup>2+</sup> dynamics underlying the glucose response of pancreatic  $\beta$  cells: a simulation study. *J Gen Physiol* 2011; 138:21-37; PMID:21708953; <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.201110611>
  119. Cha CY, Santos E, Amano A, Shimayoshi T, Noma A. Time-dependent changes in membrane excitability during glucose-induced bursting activity in pancreatic  $\beta$  cells. *J Gen Physiol* 2011; 138:39-47; PMID:21708954; <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.201110612>
  120. Bertram R, Sherman A, Satin LS. Metabolic and electrical oscillations: partners in controlling pulsatile insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293:E890-E900; PMID:17666486; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00359.2007>
  121. Bertram R, Satin L, Zhang M, Smolen P, Sherman A. Calcium and glycolysis mediate multiple bursting modes in pancreatic islets. *Biophys J* 2004; 87:3074-87; PMID:15347584; <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.049262>
  122. Ren J, Sherman A, Bertram R, Goforth PB, Nunemaker CS, Waters CD, Satin LS. Slow oscillations of K<sub>ATP</sub> conductance in mouse pancreatic islets provide support for electrical bursting driven by metabolic oscillations. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305:E805-17; PMID:23921138; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00046.2013>
  123. Merrins MJ, Van Dyke AR, Mapp AK, Rizzo MA, Satin LS. Direct measurements of oscillatory glycolysis in pancreatic islet  $\beta$ -cells using novel fluorescence resonance energy transfer(FRET) biosensors for pyruvate kinase M2 activity. *J Biol Chem* 2013; 288(46):33312-22; PMID:24100037; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.508127>
  124. Merrins MJ, Bertram R, Sherman A, Satin LS. Phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase modulates oscillations of pancreatic islet metabolism. *PLoS ONE* 2012; 7:e34036; PMID:22532827; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034036>
  125. Merrins M, Fendler B, Sherman A. Metabolic oscillations in pancreatic islets depend on the intracellular Ca<sup>2+</sup> level but not Ca<sup>2+</sup> Oscillations. *Biophys J* 2010; 99:76-84; PMID:20655835; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.012>
  126. Watts M, Fendler B, Merrins MJ, Satin LS. Calcium and Metabolic Oscillations in Pancreatic Islets: Who's Driving the Bus?. *SIAM J Appl Dyn Syst* 2014; 13(2):683-703; <http://dx.doi.org/10.1137/130920198>
  127. Meyer-Hermann ME. The electrophysiology of the  $\beta$ -Cell based on single transmembrane protein characteristics. *Biophys J* 2007; 93:2952-68; PMID:17573431; <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.106096>
  128. Fridlyand LE, Jacobson DA, Kuznetsov A, Philipson LH. A model of action potentials and fast Ca<sup>2+</sup> dynamics in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biophys J* 2009; 96:3126-39; PMID:19383458; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.01.029>
  129. Brissava M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers AC. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 2005; 53:1087-97; PMID:15923354; <http://dx.doi.org/10.1369/jhc.5C6684.2005>
  130. Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M. Islet architecture: A comparative study. *Islets* 2009; 1:129-36; PMID:20606719; <http://dx.doi.org/10.4161/isl.1.2.9480>
  131. Harrison DE, Christie MR. Properties of isolated human islets of Langerhans: insulin secretion, glucose oxidation and protein phosphorylation. *Diabetologia* 1985; 28:99-103; PMID:3884420
  132. Henquin JC, Dufrene D, Nenquin M. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* 2006; 55:3470-7; PMID:17130494; <http://dx.doi.org/10.2337/db06-0868>
  133. Braun M, Ramracheya R, Johnson PR, Rorsman P. Exocytotic properties of human pancreatic  $\beta$ -cells. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1152:187-93; PMID:19161389; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03992.x>
  134. Rosati B, Marchetti P, Crociani O, Lecchi M, Lupi R, Arcangeli A, Olivotto M, Wanke E. Glucose-and arginine-induced insulin secretion by human pancreatic  $\beta$ -cells: the role of HERG K<sup>+</sup> channels in firing and release. *FASEB J* 2000; 14:2601; PMID:11099479; <http://dx.doi.org/10.1096/fj.00-0077.com>
  135. Herrington J, Sanchez M, Wunderler D, Yan L, Bugianesi RM, Dick IE, Clark SA, Brocho RM, Priest BT, Kohler MG, et al. Biophysical and pharmacological properties of the voltage-gated potassium current of human pancreatic  $\beta$ -cells. *J Physiol* 2005; 567:159-75; PMID:15932888; <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2005.089375>
  136. Bertram R, Sherman A, Satin LS. Electrical bursting, calcium oscillations, and synchronization of pancreatic islets. *Adv Exp Med Biol* 2010; 654:261-79; PMID:20217502; [http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3\\_12](http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3_12)
  137. Pedersen MG, Cortese G, Eliasson L. Mathematical modeling and statistical analysis of calcium-regulated insulin granule exocytosis in  $\beta$ -cells from mice and humans. *Prog Biophys Mol Biol* 2011; 107:257-64; PMID:21839108; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2011.07.012>
  138. Pedersen MG, Bertram R, Sherman A. Intra- and inter-islet synchronization of metabolically driven insulin secretion. *Biophys J* 2005; 89:107-19; PMID:15834002; <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.055681>
  139. Sherman A, Rinzel J. Model for synchronization of pancreatic  $\beta$ -cells by gap junction coupling. *Biophys J* 1991; 59:547-59; PMID:1646657; [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82271-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82271-8)
  140. Han K, Kang H, Kim J, Choi M. Mathematical models for insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Islets* 2012; 4:94-107; PMID:22627505; <http://dx.doi.org/10.4161/isl.19569>
  141. Chew YH, Shia YL, Lee CT, Majid FAA, Chua LS, Sarmidi MR, Aziz RA. Modeling of oscillatory bursting activity of pancreatic beta-cells under regulated glucose stimulation. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 307:57-67; PMID:19524127; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.03.005>
  142. Georgiou P, Toumazou C. A silicon pancreatic beta cell for diabetes. *IEEE Trans Biomed Circuits Syst* 2007; 1:39-49; PMID:23851519; <http://dx.doi.org/10.1109/TBCAS.2007.893178>
  143. Sherman AS, Li YX, Keizer JE. Whole-cell models. In Fall CP, Marland ES, Wagner JM, Tyson JJ, editors. *Computational Cell Biology*. New York: Springer; 2002 pp. 101-139

## **Artículo 3**

**Effects of impaired ATP production and glucose sensitivity  
on human  $\beta$ -cell function: a simulation study.**

Artículo publicado en la **Revista Mexicana de Ingeniería  
Biomédica** (2014).



## Effects of Impaired ATP Production and Glucose Sensitivity on Human $\beta$ -Cell Function: A Simulation Study

G.J. Félix-Martínez \*

J. Azpiroz-Leehan \*

R. Ávila-Pozos \*\*

J.R. Godínez Fernández \*

\* Departamento de  
Ingeniería Eléctrica  
Universidad Autónoma  
Metropolitana Unidad  
Iztapalapa

\*\* Área Académica de  
Matemáticas y Física  
Universidad Autónoma del  
Estado de Hidalgo

### ABSTRACT

In this paper we used a mathematical model to explore the effects of impaired ATP production and glucose sensitivity on the electrical response and insulin secretion of human  $\beta$ -cells. The model was extended by the addition of explicit empirical equations that describe recent experimental observations, namely, the increase of ATP as a function of glucose concentration and the oscillations in ATP at high glucose levels. Simulations were performed at selected glucose concentrations from an oral glucose tolerance test in normal subjects to evaluate the response of the human  $\beta$ -cell in normal and pathological scenarios. Our simulations reproduced experimental observations, such as the impaired insulin secretion as a consequence of  $\beta$ -cell dysfunction and restoration of electrical activity by the use of a sulfonylurea. Our results suggest that both reduced glucose sensitivity and impaired ATP production could be related to the pathogenesis of type 2 diabetes.

**Keywords:** action potentials,  $\beta$ -cell, diabetes, insulin, OGTT, calcium, ATP.

Correspondencia:  
Gerardo J. Félix Martínez  
Edificio AT-221 San Rafael  
Atlixco 186 Col. Vicentina,  
Iztapalapa C.P.09340 México,  
D.F.  
Correo electrónico:  
gjfelix2005@gmail.com

*Fecha de recepción:*  
*23 de marzo de 2014*  
*Fecha de aceptación:*  
*15 de julio de 2014*

## RESUMEN

En este artículo usamos un modelo matemático para explorar los efectos de alteraciones en la producción de ATP y sensibilidad a la glucosa en la respuesta eléctrica y la secreción de insulina en células  $\beta$  humanas. El modelo fue extendido al añadir ecuaciones empíricas explícitas que describen recientes observaciones experimentales, como el incremento en el ATP como función de la concentración de glucosa y las oscilaciones en el ATP a altos niveles de glucosa. Se realizaron simulaciones a niveles de glucosa alcanzados durante una prueba de tolerancia a la glucosa para evaluar la respuesta de la célula  $\beta$  humana en escenarios normales y patológicos. Nuestras simulaciones reprodujeron varias observaciones experimentales, tales como la secreción de insulina alterada como consecuencia de la disfunción de la célula  $\beta$  y la restauración de la actividad eléctrica al aplicar una sulfonilurea. Nuestros resultados sugieren que tanto una reducción en la sensibilidad a la glucosa como la alteración en la producción de ATP podrían estar relacionadas a la patogénesis de la diabetes tipo 2.

**Palabras clave:** potenciales de acción, célula  $\beta$ , diabetes, insulina, OGTT, calcio, ATP.

## INTRODUCTION

Insulin is the only hormone capable of lowering blood glucose levels. At the systemic level, insulin inhibits the release of glucose from kidney and liver, facilitates glucose uptake in muscle and adipose tissue, and promotes the formation of glycogen in the liver[1]. Insulin is secreted by the pancreatic  $\beta$ -cells, located in the islets of Langerhans, where the glucagon-, somatostatin-, and pancreatic polypeptide-producing cells ( $\alpha$ ,  $\delta$  and PP cells respectively) are also located[2]. Under normal conditions, insulin is secreted from the pancreatic  $\beta$ -cells by means of a well-established process known as glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) or  $K_{ATP}$  dependent pathway: An increase in the external glucose concentration stimulates metabolism of  $\beta$ -cells, leading to ATP production and the closure of ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) channels. The resulting depolarization promotes the onset of electrical activity, allowing the influx of calcium ions ( $Ca^{2+}$ ) through voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels, which eventually triggers insulin secretion (Fig. 1). It is known

that GSIS is potentiated by the activation of both a neurohormonal (external) and metabolic (intrinsic) amplifying pathways[3]. The former involves the regulatory effects of hormones and neurotransmitters on insulin secretion, e.g. incretins, hormones secreted by the gastrointestinal tract that amplify the insulin response especially during oral glucose stimulation. On the other hand, the mechanisms involved in the metabolic amplifying pathway remain elusive, though it is known that a  $Ca^{2+}$ -independent effect of glucose on insulin secretion is involved. Furthermore, cell-cell interactions also participate in the regulation of insulin secretion, via paracrine interactions between the  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  and PP-cells within the islets of Langerhans[4] and the direct coupling of  $\beta$ -cells through gap-junctions[5].

Proper functioning of  $\beta$ -cells is essential for glucose homeostasis, since alterations in  $\beta$ -cells are highly related to impaired fasting glucose (IFG) and/or impaired glucose tolerance (IGT), which eventually progress to type 2 diabetes (T2D)[7], a disease characterized by insulin

resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. At the cellular level, several factors could impair the adequate secretion of insulin. For example, mutations in ionic channels from human  $\beta$ -cell have been associated to a higher diabetes risk [9,10]. Other authors have demonstrated that a defective  $\beta$ -cell sensitivity and impaired metabolism could result in hyperglycemia and eventually T2D[12].

Regulation of insulin secretion has been studied extensively in rodents both experimentally and theoretically. As a complement to experimental work, mathematical models have contributed to the knowledge of  $\beta$ -cell physiology (reviewed in [14]). However, several important differences between human and rodent  $\beta$ -cells have been reported. For example, some ion channels expressed in humans are different compared to those expressed in rodents[6,10,15,16]. It is thought that these differences are responsible for the variations in the electrical behavior and secretory response. Mathematical models for human  $\beta$ -cells have been developed recently[6,17], aiming to analyze the mechanisms involved in the regulation of insulin secretion.

The oral glucose tolerance test (OGTT) is commonly used to assess the possible defects in  $\beta$ -cell function in terms of glucose sensitivity and insulin secretion [7,12,18]. In this paper we use a mathematical model and data from an OGTT in normal subjects to explore the possible causes of  $\beta$ -cell dysfunction in humans, one of the key aspects leading to T2D.

## METHODS

### Model of the human pancreatic $\beta$ -cell

The model developed by Fridlyand, Jacobson and Philipson[6] was selected in this study to describe the electrical activity of human  $\beta$ -cells. The model was designed to evaluate the role of ionic channels in the regulation of the firing of action potentials (APs),  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics and insulin secretion. Plasma membrane ion transport comprised ten ion channels (L,T and P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents, voltage-gated and background  $\text{Na}^{+}$  currents, delayed rectifier  $\text{K}^{+}$  current, SK and BK  $\text{Ca}^{2+}$ -

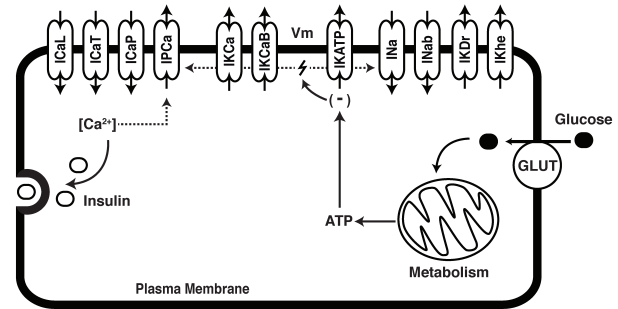


Fig. 1. Schematic diagram of the model of Fridlyand, Jacobson and Philipson [6]. The model structure composed 10 ion channels: Type L, T, and P  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $\text{ICaL}$ ,  $\text{ICaT}$ ,  $\text{ICaP}$ ), voltage-gated  $\text{Na}^{+}$  current ( $\text{INa}$ ),  $\text{Na}^{+}$  background current ( $\text{INab}$ ), delayed rectifier  $\text{K}^{+}$  current ( $\text{IKDr}$ ), ERG  $\text{K}^{+}$  current ( $\text{IKhe}$ ), ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  current ( $\text{IK}_{ATP}$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  and high voltage  $\text{K}^{+}$  current ( $\text{IKCaB}$ ),  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  current ( $\text{IKCa}$ ). The plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is represented by  $\text{IPCa}$ . Glucose-dependent ATP production is described by Eq. 1 and 2. Adapted from ref. [6].

dependent  $\text{K}^{+}$  currents, ERG  $\text{K}^{+}$  current, ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  current) and one transporter (plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase). The model is shown schematically in Fig. 1.

In the original model, the relation between glucose and nucleotides concentrations was not considered. Instead, an increase in glucose was simulated by arbitrarily reducing the concentration of ADP, thus regulating the conductance of the  $\text{K}_{ATP}$  channels.

Moreover, the affinity and inhibition constants used in the original model are based on previous models of rodent  $\beta$ -cells[19]. In contrast, we extended the model by deriving empirical equations from experimental observations of the production of ATP as a function of glucose concentration in human  $\beta$ -cells (see below) [13]. To our knowledge, the  $\text{K}_{ATP}$  channels expressed in the human  $\beta$ -cell have not been characterized in terms of the affinity and inhibition constants for ADP, ATP and  $\text{MgADP}$ . Values for these parameters were estimated in order to reproduce the known electrical behavior of the human  $\beta$ -cell (i.e. the glucose threshold at which firing of APs has been detected), while maintaining

Table 1. Modified and added parameters

Parameter	Value
$K_{dd}$	78 $\mu\text{M}$
$K_{td}$	100 $\mu\text{M}$
$K_{tt}$	16.7 $\mu\text{M}$
$N_T$	6500 $\mu\text{M}$
$\text{ATP}_0$	3500 $\mu\text{M}$

the other known parameters (nucleotide total concentration and ATP basal concentration) fixed at the reported values. In addition, in our simulations the amount of MgADP was slightly reduced to 0.4ADP (0.55 ADP in the original model). Estimated and added parameters are shown in Table 1. Besides these changes, all the other parameters and formulations of the original model were adopted without modifications.

It is important to mention that both in the original and the modified model, the mechanism of insulin secretion was modeled in a minimal manner. It is known that insulin granules are distributed in distinct pools in the intracellular space, and that in response to a  $\text{Ca}^{2+}$  signal, granules are mobilized in order to be docked and fused with the cell membrane where the SNARE proteins (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) play a key role[20]. In mouse  $\beta$ -cells, it was demonstrated that the exocytotic sites are closely associated with the  $\text{Ca}^{2+}$  ionic channels[21]. Surprisingly, similar studies in human  $\beta$ -cells have not been performed. However, it is reasonable to hypothesize that a similar distribution is present in the human  $\beta$ -cell. Recently Braun *et al.*[16] described the role of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the secretory response of the human  $\beta$ -cell. The minimal model used in this work correctly takes into account the role of  $\text{Ca}^{2+}$  channels and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the exocytosis of insulin, though the details of the molecular machinery involved in the mobilization of insulin granules and the fusion with the cell membrane were not considered.

## Glucose-induced ATP dynamics

ATP links changes in glucose metabolism to electrical activity in  $\beta$ -cells via the influence of ATP in the conductance of the  $K_{ATP}$  channels[8]. Early studies in human  $\beta$ -cells reported a glucose-dependent increase in the ATP/ADP ratio[11] which is consistent with recent experimental observations[13] that showed the relationship between glucose concentration ( $[G]$ ) and the increase of sub-membrane ATP ( $\Delta\text{ATP}$ ). This relationship was fitted to a Hill function with a half-maximal effect ( $K_{\Delta\text{ATP}}$ ) of 5.2 mM, as reported in ref. [13]. The best fit was obtained with a Hill exponent of 5:

$$\Delta\text{ATP} = 0.59 \frac{[G]^5}{[G]^5 + K_{\Delta\text{ATP}}^5} [mM] \quad (1)$$

Both the experimental data and the fitted Hill function are shown in Fig. 2A. A basal ATP concentration ( $\text{ATP}_0$ ) of 3.5 mM and a total nucleotide concentration ( $N_T$ ) of 6.5 mM were assumed in accordance with the ranges reported in other studies[19].

According to experimental observations in human  $\beta$ -cells, high glucose ( $[G] > 9\text{mM}$ ) produce oscillations in ATP, while at low glucose, oscillations were only observed occasionally[13,22]. The glucose-dependent ATP and ADP concentrations were calculated as:

$$\text{ATP} = k_P(\text{ATP}_0(1 + \Delta\text{ATP}) + A_{\text{ATP}} \sin(ft)) \quad (2)$$

$$\text{ADP} = N_T - \text{ATP} \quad (3)$$

For low and intermediate glucose ( $[G] < 9\text{mM}$ ), we assumed the frequency of oscillations  $f = 0$  in Eq. 2 (non-oscillatory ATP). For high glucose, Li *et al.* [13] reported periods of oscillation ( $T$ ) of 330, 296 and 180 seconds at 9, 11 and 20 mM  $[G]$  respectively, with an approximate constant amplitude ( $A_{\text{ATP}}$ ). An amplitude of 12% of the basal ATP concentration was estimated from the data reported by Ainscow *et al.*[22] and Li *et al.*[13] ( $A_{\text{ATP}} = 0.12\text{ATP}_0$ ).

For the high glucose scenarios, the frequency of oscillations ( $f$  in Eq. 2) was calculated as  $f = 2\pi/T$ . The parameter  $k_P$  is a scaling factor



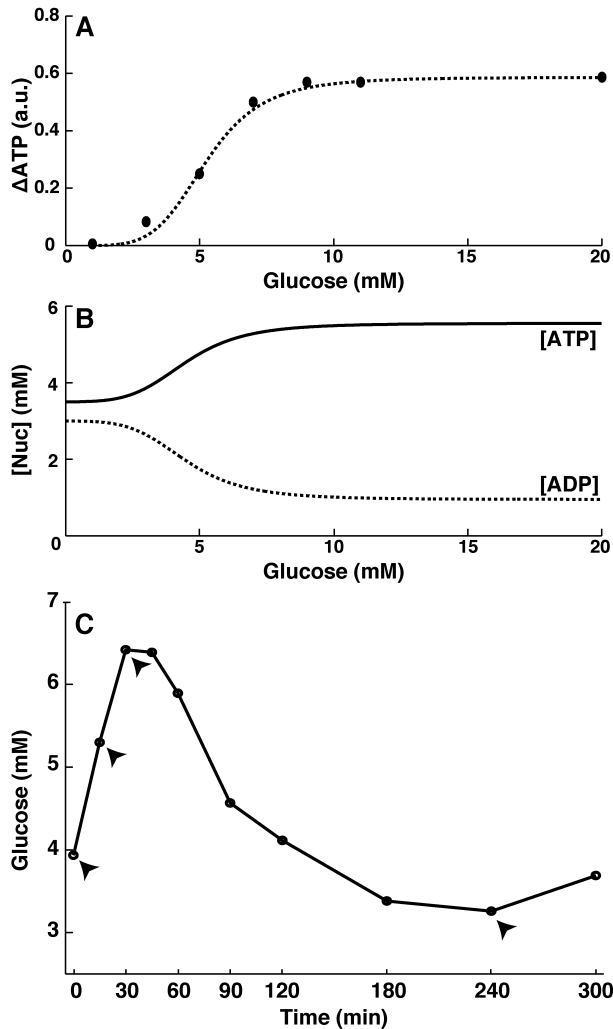


Fig. 2. A. Glucose-dependent increases of sub-membrane ATP measured experimentally by Li *et al.*[13] Data were fitted (dashed line) by a Hill equation (Eq. 1). B. Resulting nucleotides (ATP and ADP) assuming a basal ATP concentration of 3.5 mM and a total nucleotide concentration of 6.5 mM [19]. C. Average glucose measured during an oral glucose tolerance test (data from ref. [23]). Input glucose levels for the model are shown (arrows). At  $t = 0, 15, 45$  and 240 minutes, the corresponding glucose levels are 3.97, 5.35, 6.48 and 3.29 mM.

used to simulate an impaired ATP production. The resultant glucose-dependent nucleotides concentrations ( $\text{ATP}_0 + \Delta\text{ATP}$ ) are shown in Fig. 2B. For high glucose concentrations ( $[\text{G}] > 9\text{mM}$ ), oscillations generated by the second term of Eq. 2 are added to the values of ATP shown in Fig. 2B.

## Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

The model was tested in selected glucose concentrations achieved during an oral glucose tolerance test (OGTT). Data from Ganda *et al.*[23] consisting in two OGTTs in 26 normal subjects were used to estimate the glucose concentrations (Fig. 2C). All simulations at selected glucose levels were performed in steady state ( $[\text{G}]$  constant).

## Simulating $\beta$ -cell dysfunction

Impaired glucose sensitivity was simulated by shifting the half-maximal concentration of the curve of ATP production ( $K_{\Delta\text{ATP}}$ , Eq. 1) to higher levels of glucose (see Fig. 5). On the other hand, a defective ATP production was simulated by decreasing the scaling factor  $k_p$  in Eq. 2. Values used for  $K_{\Delta\text{ATP}}$  and  $k_p$  are given in the figure captions. The normal physiological conditions are given by  $K_{\Delta\text{ATP}} = 5.25$  mM[13] and  $k_p = 1$  (normal production of ATP).

## Numerical methods

Numerical simulations were performed in Matlab, Version 2011b (MathWorks, Natick, MA). The 4th order Runge-Kutta method was used to solve the system of ordinary differential equations.

## RESULTS

### Onset of electrical activity

Simulations at low glucose concentrations are shown in Fig. 3. For 2 mM G, the  $\beta$ -cell remains electrically silent at a membrane potential of -64 mV, while  $[\text{Ca}^{2+}]$  and insulin secretion (IS) are maintained at basal levels. As glucose is increased to 3 mM, low amplitude oscillations in  $V_m$  and  $[\text{Ca}^{2+}]$  become apparent, with no noticeable effect on IS. Above the critical value of 3.5 mM G, low frequency action potentials emerged after a short delay, ranging from -70 to 10 mV. Changes of  $[\text{Ca}^{2+}]$  are shown in Fig. 3C. As expected,  $[\text{Ca}^{2+}]$  oscillates in synchrony with the changes in membrane potential, given that calcium entry depends on the activity of



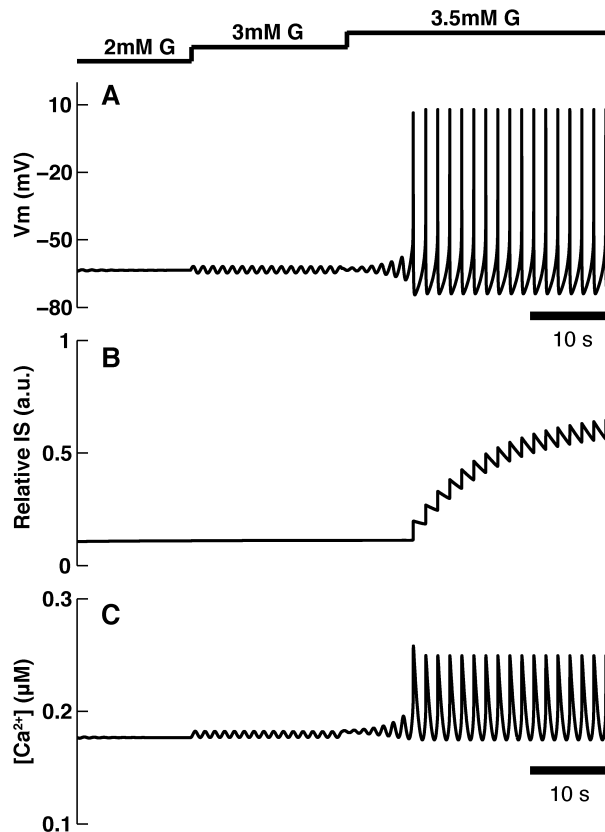


Fig. 3. Onset of the electrical activity. Simulations of A. Membrane potential ( $V_m$ ), B. Insulin secretion (IS) and C. Intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]$ ). Glucose changes are shown at the top of the figure.

the voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. Low amplitude oscillations of  $[Ca^{2+}]$  were incapable of triggering insulin secretion at 3mM G. When proper electrical activity occurred ( $\sim 3.5$  mM G), each action potential produced a greater increase in  $[Ca^{2+}]$ , which in turn triggered IS. Henquin *et al.*[24] reported a glucose threshold between  $\sim 3$ -4 mM for initiation of secretion in humans.

The onset of electrical activity results from the increased production of ATP at expenses of ADP as glucose levels rise, promoting the inhibition of  $K_{ATP}$  channels, membrane depolarization and activation of the voltage-dependent channels responsible for the upstroke of the APs. A threshold ATP concentration of 3.74 mM was needed to trigger electrical activity.

### Electrical response of human $\beta$ -cell during an OGTT

Selected input glucose levels from the OGTT curve and the corresponding ATP values are displayed in Fig. 2C. Average glucose levels during an OGTT in normal subjects range from  $\sim 3.2$  mM to  $\sim 6.5$  mM[23]. At low and intermediate glucose concentrations ATP remains approximately constant [13]. Eq. 2 was used to calculate the ATP level, resulting in a constant glucose-dependent increase from basal ATP (Fig. 2B). Steady state simulations were performed for each input glucose both for physiological and altered conditions (Fig. 4).

In normal physiological conditions ( $k_p = 1$ , Fig. 4A), as glucose was increased from 3.97 mM to the maximal level of 6.48 mM ( $[G]$  at  $t = 0$  and  $t = 30$  min during an OGTT respectively), APs showed a higher frequency, reflected in the oscillations of IS, which is always in synchrony with the electrical activity and the changes of  $[Ca^{2+}]$ . The amplitude of the APs remained approximately constant (not shown). Once glucose was decreased to the minimum value of  $\sim 3.29$  mM ( $[G]$  after 240 min during an OGTT), insulin secretion ceased as a consequence of the repolarization of the membrane to the resting potential.

### Effects of impaired production of ATP on the electrical activity of human $\beta$ -cell

Impaired production of ATP was simulated by reducing ATP by a certain percentage from the calculated value ( $k_p = 0.85, 0.74, 0.68$  in Eq. 2). Reducing ATP by 15% completely inhibited electrical activity and insulin secretion at 3.97 mM G (Fig. 4A,  $k_p = 0.85$ ). The same results were obtained when basal ATP level was reduced by the same amount (not shown). Increasing glucose to 5.35 and 6.48 mM restored secretion, though a reduced level was observed with respect to the normal case. These results suggest that a defective production of ATP or a reduced basal ATP concentration could result in an impaired insulin secretion, one of the key characteristics of T2D. At the highest glucose level during an OGTT (6.48 mM), reducing ATP by 26% ( $k_p = 0.74$ ) completely inhibited electrical activity and

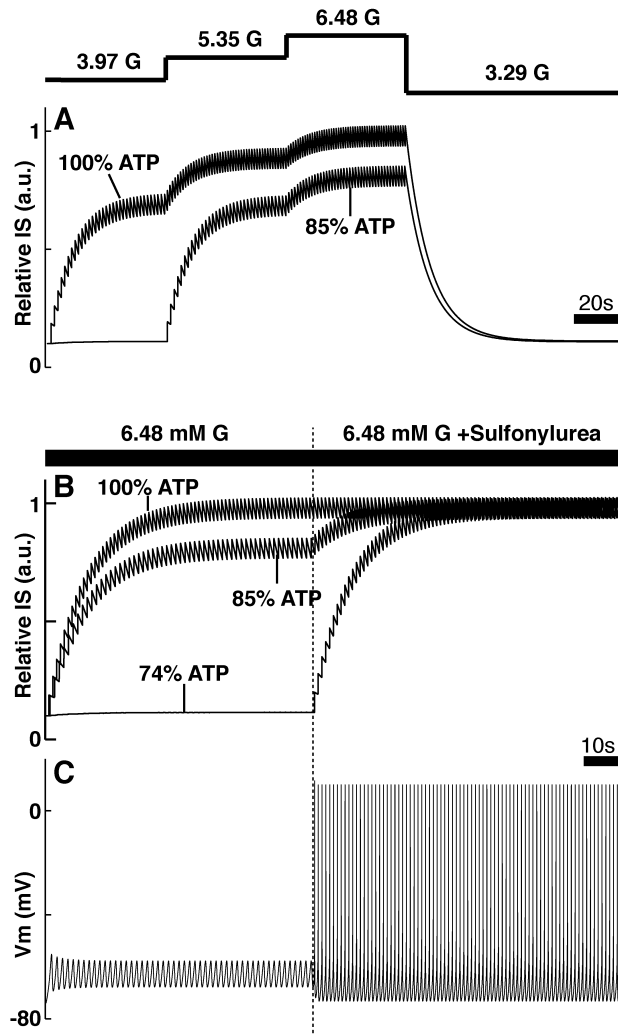


Fig. 4. Steady state simulation of the secretory response at the selected glucose levels from the OGTT. Impaired ATP production is specified as the percentage from the normal value (100% ATP,  $k_p = 1$ ). A. Normal secretory response (100% ATP,  $k_p = 1$ ). Impaired ATP production ( $k_p = 0.85$ , 85%ATP). Changes of glucose are shown at the top of the figure. B. Secretory response at the peak glucose value during an OGTT (6.48 mM). Impaired ATP is shown as in A. The vertical dashed line indicates the addition of the sulfonylurea. C. Electrical activity corresponding to the secretory response of the case of impaired ATP production (74% ATP,  $k_p = 0.74$ ) showed in B.

insulin secretion (Fig. 4B). This pathological state was reverted by the action of a sulfonylurea, simulated by reducing the maximal conductance of the  $K_{ATP}$  channels ( $g_{K_{ATP}}$ , Fig. 4B and C).

Both decreased ( $k_p = 0.85$ ) and full inhibited secretion ( $k_p = 0.74$ ) were reverted to normal levels by reducing  $g_{K_{ATP}}$  by 20 and 33% respectively from the normal value of 45nS[6]. In Fig. 4C the restoration of the electrical activity for the case of a reduction of 26% in ATP ( $k_p = 0.74$ ) is shown. Stimulation of insulin secretion by tolbutamide, a commonly used sulfonylurea, has been demonstrated experimentally in human  $\beta$ -cells[25]. Our simulations satisfactorily reproduce these observations.

### Effects of impaired glucose sensitivity on the electrical activity of human $\beta$ -cells

Impaired glucose sensitivity was simulated by shifting the function of the increase of ATP ( $\Delta ATP$ ). Fig. 5A illustrates the effect of shifting the half-maximal increase of ATP ( $K_{\Delta ATP}$ ) from the normal value of 5.2 mM to higher glucose levels. Shifting  $K_{\Delta ATP}$  to 7.5mM reduced the frequency of the APs, resulting in a decreased secretion (Fig. 5B-C). On the other hand, increasing  $K_{\Delta ATP}$  further to 11mM inhibited the upstroke of the APs, producing only low amplitude oscillations in  $V_m$  while secretion remained at the basal level (Fig. 5B-C).

$\beta$ -cell glucose sensitivity represents the dependence of insulin secretion on the glucose concentration during an OGTT[12]. In Fig. 6, simulated insulin secretion is plotted against glucose levels achieved during an OGTT. It can be seen that a shift in the half-maximal concentration of the production of ATP ( $K_{\Delta ATP}$ ) resembles the glucose sensitivity calculated for normal, IFG and IGT subjects (compare Fig. 6 to Fig. 2A in ref. [12]).

### Nucleotide oscillations and electrical activity at high glucose levels

High glucose levels are not reached during an OGTT under normal physiological conditions, however, it has been shown that in IFG and IGT subjects, glucose can achieve high concentrations ( $\sim 9$ mM)[12]. In addition, during an intravenous glucose tolerance test (IVGTT), glucose measurements as high as  $\sim 16$  mM have been reported in normal subjects[23].

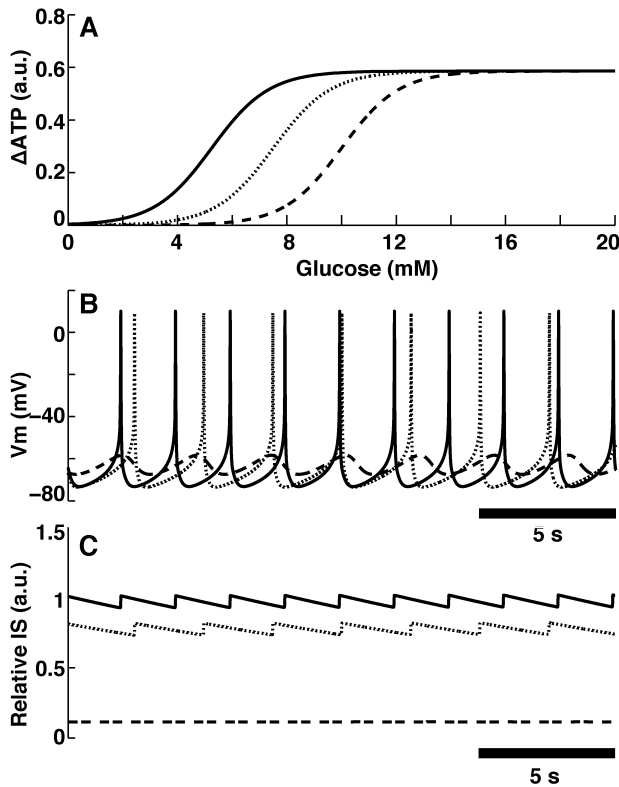


Fig. 5. Simulation of a reduced glucose sensitivity. A. Glucose-dependent increase of ATP (Eq. 1). B. Electrical response for normal and impaired glucose sensitivity ( $[G] = 6.48$  mM). C. Insulin secretion corresponding to the electrical activity shown in B. Normal glucose sensitivity ( $K_{\Delta ATP} = 5.2$  mM, solid line). Impaired glucose sensitivity ( $K_{\Delta ATP} = 7.5$  and 10 mM, dotted and dashed line respectively).

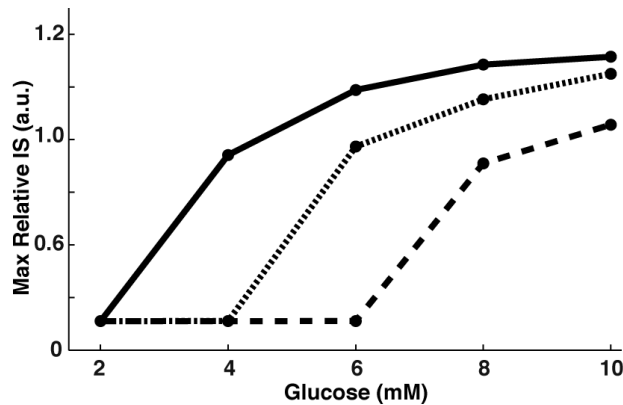


Fig. 6. Maximal simulated secretory response at different glucose levels. Normal glucose sensitivity ( $K_{\Delta ATP} = 5.2$  mM, solid line). Impaired glucose sensitivity  $K_{\Delta ATP} = 7.5$  and 10 mM, dotted and dashed lines respectively).

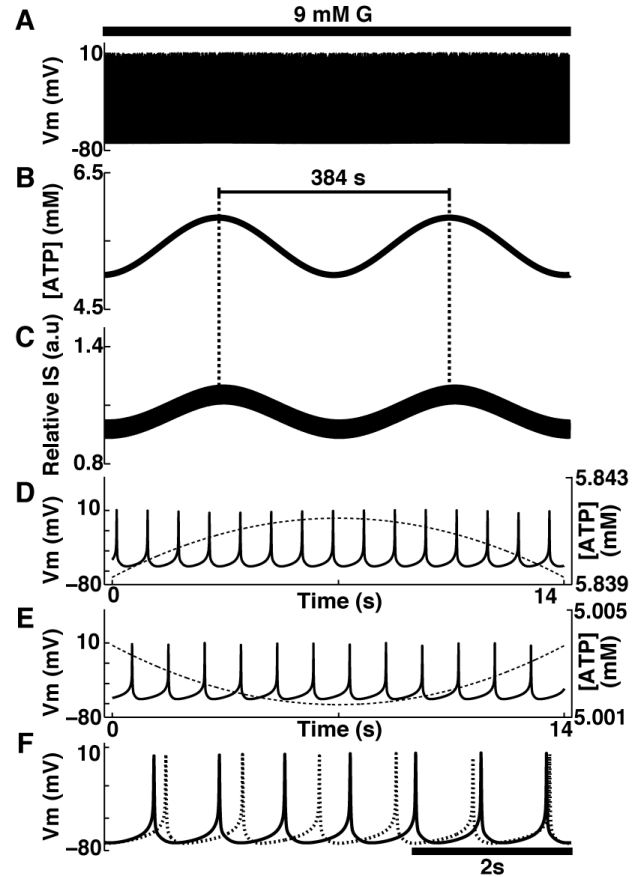


Fig. 7. Role of the oscillations of ATP at high glucose levels (9 mM). Simulations of A. Electrical activity, B. Oscillatory ATP concentration, C. Insulin secretion, D(E). Membrane potential ( $V_m$ ) at the maximal (minimal) oscillatory ATP concentration (shown in B). F. Action potentials shown in D and E were superimposed to show the differences in frequency at the maximal and minimal value of the oscillatory ATP.

According to the observations of Li *et al.*[13], less than 20% of the cells oscillated at 9mM G, 60% of the cells presented oscillations at 11mM G, while ~98% oscillated at 20mM G. Using these data, an oscillatory ATP concentration was calculated using Eq. 2. Simulations for the case of 9mM G are presented in Fig. 7. Oscillations of ATP between 5 and 5.8 mM produced changes in the frequency of the APs (Fig. 7D-F), which in turn caused an oscillatory insulin secretion.

Impaired production of ATP was evaluated at high glucose and oscillatory ATP (Fig. 8). Reducing ATP by 32% ( $k_p = 0.68$ ) produced

trains of APs and a pulsatile release of insulin at glucose levels greater than 9mM. As can be seen in Fig. 8, trains of action potentials occurred when the maximal values of the oscillating ATP were achieved.

The resulting pulses of insulin had a reduced amplitude compared to the normal case (see Fig. 9). In addition, the extent of the impairment of ATP production needed to generate trains of APs was glucose-dependent. While at 9mM G a 26% decrease ( $k_p = 0.74$ ) on ATP generated long duration pulses of insulin secretion (Fig. 9A), reducing ATP by the same amount at 20mM G only produced a decreased level of secretion, maintaining the same oscillatory behavior than the normal case (Fig. 9B).

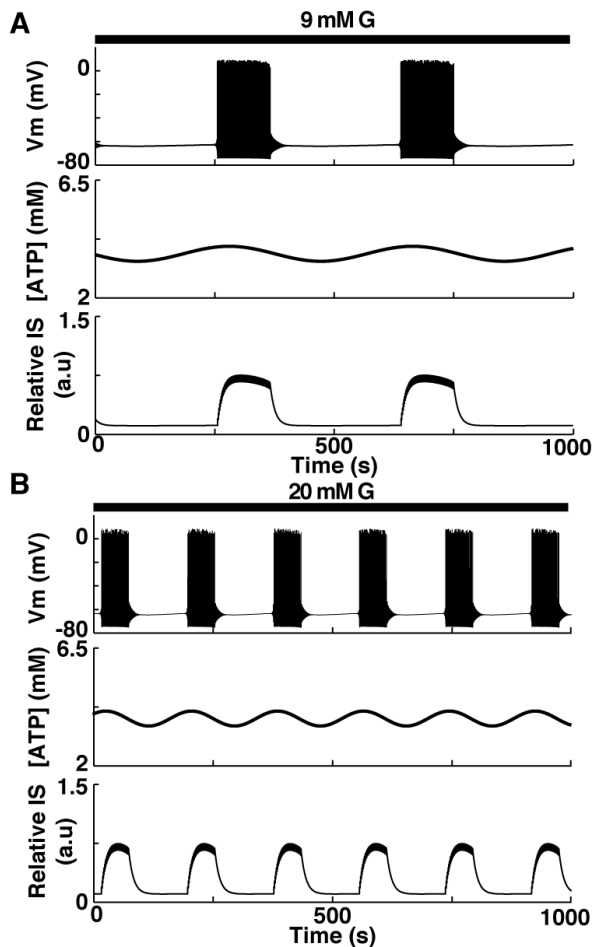


Fig. 8. Impaired ATP production simulated at high glucose levels and oscillatory ATP (A. 9mM, B. 20mM). Top : membrane potential ( $V_m$ ), Middle: ATP concentration, Bottom: Insulin secretion.

The pulsatile secretion caused by the trains of action potentials was reverted by the use of a sulfonylurea (Fig.10 A-B), as in the case of constant ATP. At 11 mM G, insulin pulses produced by a reduction of 32% of total ATP ( $k_p = 0.68$ ) returned to normal levels by decreasing  $g_{K_{ATP}}$  by 45%, though the amplitude of the oscillations of insulin was slightly smaller compared with the normal case.

Altered glucose sensitivity at high glucose levels impaired insulin secretion but to a lesser extent in comparison to the case for low glucose and constant ATP (compare Fig. 10C and Fig. 5). As can be seen in Fig. 10C, at 11mM G, increasing  $K_{\Delta ATP}$  from 5.2 to 10mM only reduced insulin secretion, while at  $\sim 6.5$ mM G, a  $K_{\Delta ATP}$  of 10mM inhibited completely both electrical activity and insulin secretion (Fig. 5B). Trains of action potentials were generated for  $K_{\Delta ATP} = 15$  mM, resembling the results for impaired ATP production (Fig. 9).

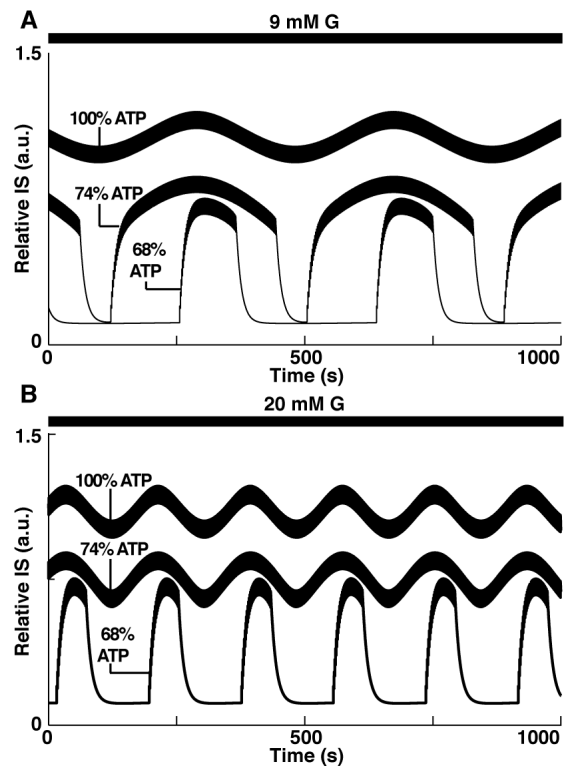


Fig. 9. Insulin secretion for 9mM G (Top) and 20mM G (Bottom). Impaired ATP production is indicated as the percentage from the normal value (100% ATP,  $k_p = 1$ ). The same reduction on ATP produced different responses depending on the glucose levels.

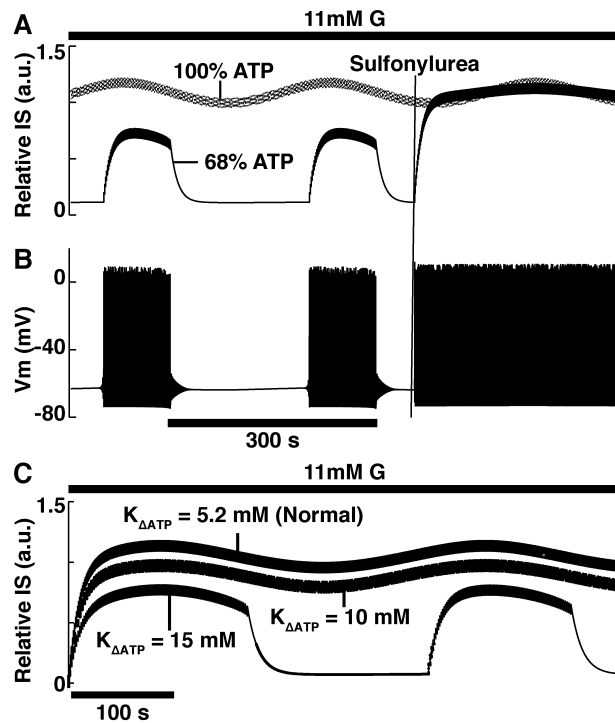


Fig. 10. Normal electrical activity was restored by the addition of a sulfonylurea at high glucose levels (11mM) and oscillatory ATP. Simulations of A. Insulin secretion for normal (100% ATP,  $k_p = 1$ ) and impaired (68% ATP,  $k_p = 0.68$ ) ATP production. B. Membrane potential ( $V_m$ ). C. Effects of reduced glucose sensitivity on the secretory response at 11mM G.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Using a mathematical model of an isolated human  $\beta$ -cell we explored possible mechanisms of  $\beta$ -cell dysfunction under physiological and pathological conditions. In a recent publication, Fridlyand and Philipson[6] developed a model for the human  $\beta$ -cell including  $Ca^{2+}$  dynamics and a minimal model of insulin secretion. This model does not consider the relationship between glucose and metabolism explicitly. For this reason, we extended this model by adding empirical equations relating glucose and ATP production based on recent experimental data from human  $\beta$ -cells[13]. The proposed relations allowed us to perform simulations in various normal and pathological scenarios.

Detailed data about the relationship between glucose and electrical activity in human  $\beta$ -cell is lacking. Human  $\beta$ -cell exhibits a variable electrical activity pattern in response to a glucose stimulus. According to several studies[6,10,16], at intermediate glucose levels ( $\sim 6$ mM), firing of individual action potentials occurs in most of the cases, while bursting is only occasionally observed. To our knowledge, the threshold glucose level for the onset of electrical activity in human  $\beta$ -cell is unknown. Physiological glucose levels in humans are maintained between 3 and 7 mM[10,23]; however, insulin secretion has been detected at glucose concentrations as lower as 3mM [10,26], probably as a result of a low metabolic activity maintaining a low basal rate of insulin secretion. Interestingly, experimental measurements of  $[Ca^{2+}]$  in human  $\beta$ -cells showed that at 3mM G,  $[Ca^{2+}]$  remains at the basal level[27]. Our simulations were consistent with these observations. First we evaluated the response of the model at low glucose concentrations. At 2mM, a steady basal level was observed for  $V_m$ ,  $[Ca^{2+}]$  and insulin secretion. Increasing glucose to 3mM G triggered low amplitude oscillations both in the membrane potential and  $[Ca^{2+}]$ . The onset of electrical activity occurred at 3.5 mM G. This glucose threshold seems reasonable given that the glucose transporters found in human  $\beta$ -cells, GLUT1 and GLUT3[10,15,25,28], have a half maximal activity of 6 and 1mM G respectively, and glucokinase, a key enzyme in glucose metabolism have a half maximal activity at  $\sim 4$ mM G[29].

We can speculate that at low concentrations, glucose could be transported into the cell even at very low concentrations through GLUT 3, producing only a small amount of ATP unable to trigger electrical activity in form of action potentials. As glucose increases to higher levels, both GLUT 1 and GLUT 3 would transport glucose, accelerating metabolism further, resulting in an elevated ATP concentration, membrane depolarization and the onset of electrical activity, triggering insulin secretion.

In order to evaluate the model under realistic conditions, input glucose values were estimated

from data obtained from normal subjects during an OGTT by Ganda *et al.*[23]. Glucose levels at  $t = 0, 15, 30$  and  $240$  min, corresponding to  $G = 3.97, 5.35, 6.48$  and  $3.29$  mM respectively were selected (Fig.2C). Insulin secretion increased in a glucose dependent manner as expected (Fig. 6).

Based on experimental data, Mari *et al.*[30] concluded that hyperglycaemia results from an intrinsic  $\beta$ -cell defect rather than an inadequate compensation for insulin resistance. We simulated the electrical and secretory response of a human  $\beta$ -cell to a glucose stimulus under pathological conditions (defective glucose sensitivity and impaired ATP production).

It has been demonstrated recently that in mouse and clonal  $\beta$ -cells, an impaired function of the  $\text{Ca}^{2+}$ -selective mitochondrial uniporter (MCU) reduces the glucose-induced ATP/ADP increases [31]. This can be explained by the fact that the uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  into the mitochondria activates metabolism, enhancing the production of ATP through the activation of mitochondrial enzymes[22,31]. We simulated such alterations by reducing the calculated ATP concentration ( $k_p < 1$  in Eq. 2). Our results showed that reducing ATP by 15% abolished electrical activity and insulin secretion at  $\sim 3.97$ mM G, while at the peak of glucose during an OGTT (6.48mM), insulin secretion was considerably impaired due to a reduced AP frequency. Application of a sulfonylurea, simulated by reducing the conductance of the  $K_{ATP}$  channels, restored the normal cell function. Based on these results, we hypothesize that a perturbation in the metabolism of  $\beta$ -cells (e.g. oxidative stress) could impair the adequate closure of the  $K_{ATP}$  channels, resulting in a decreased insulin secretion in human  $\beta$ -cells. Recently, Doliba *et al.*[29] showed that a defective metabolism resulting in a decreased ATP production is a key factor on the onset of TD2. Our simulations support these observations.

Oscillations of sub-membrane ATP in human  $\beta$ -cells were reported at high glucose levels, with a period of several minutes[13], resembling the periodicity of the well known pulsatile release of insulin in normal subjects[32]. Interestingly, in T2D, these oscillations of insulin are disrupted[32,33]. Our simulations showed that

oscillations in ATP at high glucose (9, 11, 20mM) cause an oscillatory secretion with the same time period. According to the model, the cause of the oscillatory secretion is the change in frequency of the APs due to the effects of ATP in the  $K_{ATP}$  channels. When ATP production was reduced by certain amount, simulating an impaired metabolism, the average secretion level decreased ( $k_p = 0.85$ ), or a pulsatile secretion appeared ( $k_p = 0.68$ ). It should be noticed that while at 9mM G, reducing ATP by 24% ( $k_p = 0.76$ ) was enough to cause an impaired pulsatile secretion, at 20mM G the same effect was obtained by a greater reduction ( $\sim 32\%$ ,  $k_p = 0.68$ ).

We showed that at high glucose concentrations a decreased oscillating ATP level could produce trains of action potentials with a period of several minutes, accompanied by a decreased pulsatile insulin secretion. In contrast to rodent cells, human  $\beta$ -cells show a very fast bursting behavior only occasionally[10,14]. A standard model for bursting is still unknown, even for rodent  $\beta$ -cells. The model of Fridlyand and Philipson[6] is capable of generating a complex electrical behavior, consisting in spikes with several maximums with a period of a few seconds. This complex behavior is obtained by reducing the maximal conductance of the  $K_{ATP}$  or  $K_{Ca}$  channels. To our knowledge, there is not experimental evidence relating a reduced channel conductance with the appearance of bursting electrical activity. In contrast, the extended model here presented produced slow bursting electrical activity when an impaired oscillatory ATP was considered (Fig. 8-10) while maintaining the maximal conductances of the ionic channels unchanged. These results resemble the slow bursting pattern obtained with the model of Bertram *et al.* [34]. In rodent cells, both fast and slow oscillations have been observed, and several hypothesis have been proposed to explain this heterogeneous behavior (see for example ref. [14]). A feedback cycle during glycolysis resulting in an oscillatory production of ATP has been proposed as a mechanism explaining slow oscillations in rodent cells[34,35]. This proposal is consistent with experimental observations of metabolic

oscillations with a similar periodicity [36,37]. On the other hand, some authors propose that the interplay between  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATP production and ATP-consuming processes have a role in the oscillations[22,38]. The periodical release of insulin could have its origin at the oscillations of ATP, via cyclic periodic changes in  $K_{ATP}$  channel activity[8]. Although oscillations in the cytosolic ATP concentration have been observed in human  $\beta$ -cells[13,22], more studies are needed to elucidate the mechanisms involved and the differences with other species.

Impaired glucose sensitivity is a key characteristic of T2D, and it is decreased in both IFG and IGT subjects[12]. In rat  $\beta$ -cells it has been associated to glucose phosphorylation rather than glucose transport [39]. Our simulations of decreased glucose sensitivity were based on this idea. We explored this pathology by shifting the curve for  $\Delta\text{ATP}$  to higher glucose value. At low glucose concentrations (constant ATP), shifting the curve from  $K_{\Delta\text{ATP}} = 5.2\text{mM}$  (normal value) to  $7.5\text{mM}$  produced a reduced insulin secretion while  $K_{\Delta\text{ATP}} = 10$  completely inhibited electrical activity and insulin secretion. On the other hand, at high glucose levels (oscillatory ATP), the same scenarios caused a noticeable but small impairment on insulin secretion. In fact, only shifting  $K_{\Delta\text{ATP}}$  to  $15\text{mM}$  inhibited normal functioning.

It is worth noting that the extended model only includes the mechanisms involved in the  $K_{ATP}$ -dependent pathway in an isolated human  $\beta$ -cell, thus omitting other regulatory processes. An important extension to the model would be to incorporate the effect of incretins such as glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptid (GIP), which are known to potentiate the secretory response during oral glucose stimulation (as in an OGTT)[40]. This would allow us to address the known differences in the secretory response during oral and intravenous stimulation, namely, that oral glucose produces a greater secretory response in comparison to intravenous glucose[41]. On the other hand, both the original and the extended model use a minimal model to simulate the exocytosis of insulin granules. A more detailed model could

be incorporated in future work to describe in more detail the mechanisms of cell secretion, including the mobilization to the cell membrane and exocytosis of insulin granules in  $\beta$ -cells.

In the extended model presented here, simulations assuming a steady state were performed. In other words, we have simulated the response of the isolated human  $\beta$ -cell due to a constant glucose stimulus estimated from the plasma glucose concentration curve following an OGTT.

Future modeling work should be done using a multiscale approach in order to incorporate both cell-cell interactions and crucial systemic processes (e.g. glucose uptake by muscle and adipose tissue, the effects of insulin on liver and kidney and the neurohormonal amplifying pathway), which will allow us not only to evaluate the function of the  $\beta$ -cell dynamically, but also to simulate the response of the glucose-insulin system in the healthy, prediabetic and diabetic states.

We can conclude that the proposed relationship between glucose and ATP production, in conjunction with the model of human  $\beta$ -cells of Fridlyand, Jacobson and Philipson[6] was able to reproduce several experimental observations, both in normal and impaired conditions. The results of the simulations showed that at the cellular level, both reduced glucose sensitivity and impaired ATP production could be related to the pathogenesis of T2D.

## REFERENCES

1. M.Z. Shrayyef, J.E. Gerich, Normal glucose homeostasis, In: Principles of Diabetes Mellitus, Springer US, 2009: pp. 19-35.
2. M. Brissova, Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy, J Histochem Cytochem. 53 (2005) 1087-1097.
3. J.C. Henquin, The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in  $\beta$ -cells, Diabetes Res Clin Pr. 93 (2011) S27-S31.

4. D.S. Koh, J.-H. Cho, L. Chen, Paracrine interactions within islets of Langerhans, *J Mol Neurosci.* 48 (2012) 429-440.
5. J.V. Rocheleau, *et al.*, Critical role of gap junction coupled  $K_{ATP}$  channel activity for regulated insulin secretion, *PLoS Biol.* 4 (2006) e26.
6. L.E. Fridlyand, *et al.*, Ion channels and regulation of insulin secretion in human  $\beta$ -cells: a computational systems analysis, *Islets.* 5 (2013) 1-15.
7. A. Basu, *et al.*, Prediabetes: Evaluation of  $\beta$ -Cell Function, *Diabetes.* 61 (2012) 270-271.
8. S. Dryselius, *et al.* Hellman, Variations in ATP-Sensitive  $K^+$  channel activity provide evidence for inherent metabolic oscillations in pancreatic  $\beta$ -cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 205 (1994) 880-885.
9. A.H. Rosengren, *et al.*, Reduced insulin exocytosis in human pancreatic  $\beta$ -cells with gene variants linked to type 2 diabetes, *Diabetes.* 61 (2012) 1726-1733.
10. P. Rorsman, M. Braun, Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets, *Annu Rev Physiol* 75 (2013) 155-179.
11. P. Detimary, *et al.*, The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in  $\beta$  cells but not in cells and are also observed in human islets, *J Biol Chem.* 273 (1998) 33905-33908.
12. M. Kanat, A. *et al.*, Distinct  $\beta$ -cell defects in impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance, *Diabetes.* 61 (2012) 447-453.
13. J. Li, H.Y. Shuai, E. Gylfe, A. Tengholm, Oscillations of sub-membrane ATP in glucose-stimulated beta cells depend on negative feedback from  $Ca^{2+}$ , *Diabetologia.* 56 (2013) 1577-1586.
14. L.E. Fridlyand, N. Tamarina, L.H. Philipson, Bursting and calcium oscillations in pancreatic beta-cells: specific pacemakers for specific mechanisms, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299 (2010) E517-32.
15. M. Hiriart, L. Aguilar-Bryan, Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295 (2008) E1298-306.
16. M. Braun, *et al.*, Voltage-gated ion channels in human pancreatic  $\beta$ -cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion, *Diabetes.* 57 (2008) 1618-1628.
17. M. Riz, *et al.*, Mathematical modeling of heterogeneous electrophysiological responses in human  $\beta$ -cells, *PLoS Comp Biol.* 10 (2014) e1003389.
18. E. Ferrannini, *et al.*,  $\beta$ -Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis, *J Clin Endocrinol Metab.* 90 (2005) 493-500.
19. L.E. Fridlyand, *et al.*, Adenine nucleotide regulation in pancreatic  $\beta$ -cells: modeling of ATP/ADP- $Ca^{2+}$  interactions, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289 (2005) E839-48.
20. S. Nagamatsu, M. Ohara-Imaizumi, Mechanism of insulin exocytosis analyzed by imaging techniques, In: *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*, Springer Japan, 2008: pp. 177-193.
21. K. Bokvist, *et al.*, Co-localization of L-type  $Ca^{2+}$  channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *EMBO J*, 14(1) (1995) 50-57.
22. E.K. Ainscow, G.A. Rutter, Glucose-stimulated oscillations in free cytosolic ATP concentration imaged in single islet  $\beta$ -cells: evidence for a  $Ca^{2+}$ -dependent mechanism, *Diabetes.* 51 Suppl 1 (2002) S162-70.



23. O.P. Ganda, *et al.*, Reproducibility and comparative analysis of repeated intravenous and oral glucose tolerance tests, *Diabetes*. 27 (1978) 715-725.
24. J.C. Henquin, *et al.*, Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets, *Diabetes*. 55 (2006) 3470-3477.
25. S.G. Straub, *et al.*, Glucose activates both  $K_{ATP}$  channel-dependent and  $K_{ATP}$  channel-independent signaling pathways in human islets, *Diabetes*. 47 (1998) 758-763.
26. M. Braun, *et al.*, Exocytotic properties of human pancreatic  $\beta$ -cells, *Ann NY Acad Sci* 1152 (2009) 187-193.
27. I. Quesada, *et al.*, Glucose induces opposite intracellular  $Ca^{2+}$  concentration oscillatory patterns in identified  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells within intact human islets of Langerhans, *Diabetes*. 55 (2006) 2463-2469.
28. L.J. McCulloch, *et al.*, GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: Implications for understanding genetic association signals at this locus, *Mol Genet Metab*. 104 (2011) 648-653.
29. N.M. Doliba, *et al.*, Glucokinase activation repairs defective bioenergetics of islets of Langerhans isolated from type 2 diabetics, *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 302 (2012) E87-E102.
30. A. Mari, *et al.*, Impaired beta cell glucose sensitivity rather than inadequate compensation for insulin resistance is the dominant defect in glucose intolerance, *Diabetologia*. 53 (2010) 749-756.
31. A.I. Tarasov, *et al.*, The mitochondrial  $Ca^{2+}$  uniporter MCU is essential for glucose-induced ATP increases in pancreatic  $\beta$ -cells, *PloS One*. 7 (2012) e39722.
32. A. Tengholm, E. Gylfe, Oscillatory control of insulin secretion, *Mol Cell Endocrinol* 297 (2009) 58-72.
33. P. Bergsten, Pathophysiology of impaired pulsatile insulin release, *Diabetes Metab Res Rev*. 16 (2000) 179-191.
34. R. Bertram, *et al.*, Interaction of glycolysis and mitochondrial respiration in metabolic oscillations of pancreatic islets, *Biophys J*. 92 (2007) 1544-1555.
35. M.J. Merrins, *et al.*, Phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase modulates oscillations of pancreatic islet metabolism, *PloS One*. 7 (2012) e34036.
36. R.T. Kennedy, *et al.*, Metabolic oscillations in  $\beta$ -cells, *Diabetes* 51 Suppl 1 (2002) S152-61.
37. D.S. Luciani,  $Ca^{2+}$  controls slow NAD(P)H oscillations in glucose-stimulated mouse pancreatic islets, *J Physiol*. 572 (2006) 379-392.
38. P. Detimary, *et al.*, Interplay between cytoplasmic  $Ca^{2+}$  and the ATP/ADP ratio: a feedback control mechanism in mouse pancreatic islets, *Biochem J*. 333 (Pt 2) (1998) 269-274.
39. H. Heimberg, *et al.*, Heterogeneity in glucose sensitivity among pancreatic  $\beta$ -cells is correlated to differences in glucose phosphorylation rather than glucose transport, *Embo J*. 12 (1993) 2873-2879.
40. S. Klinger, B. Thorens, *Molecular Biology of Gluco-Incretin Function*, In: *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*, Springer Japan, 2008: pp. 315-334.
41. E.R. Pearson, *et al.*, Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations, *N Engl J Med*. 355 (2006) 467-477.

## Artículo 4

$\text{Ca}^{2+}$  Microdomains in the Pancreatic  $\beta$ -Cell: a  
Three-Dimensional Modeling Approach.

Presentado como parte del programa de la *International  
Conference on Mathematical Methods and Models in  
Biosciences and Young Scientists School* llevada a cabo en  
Sofia, Bulgaria en 2014.

# Ca<sup>2+</sup> Microdomains in the Pancreatic $\beta$ -Cell: a Three-Dimensional Modeling Approach

Gerardo J. Félix Martínez, J. Rafael Godínez Fernández

Department of Electrical Engineering  
Universidad Autónoma Metropolitana, México.  
gjfelix2005@gmail.com, gfjr@xanum.uam.mx

*Keywords:  $\beta$ -Cell, Glucose, Insulin, Calcium, Ca<sup>2+</sup>, Microdomains.*

$\beta$ -cells are responsible for secreting insulin as a response to an increase in blood glucose levels. Being electrically excitable,  $\beta$ -cells exhibit electrical activity in response to a glucose stimulus driven by a well established mechanism involving glucose metabolism, ionic channels and calcium signaling [1]. The purpose of  $\beta$ -cell electrical activity is to allow the influx of Ca<sup>2+</sup> through ionic channels located in the plasma membrane in order to generate a high Ca<sup>2+</sup> microdomain, which is the key signal triggering insulin exocytosis [2]. It is known that Ca<sup>2+</sup> channels and insulin granules co-localize, and that they are not evenly distributed over the cell [3]. Accounting for these morphological characteristics we have developed a three-dimensional model of a  $\beta$ -cell. By including a mathematical description of the ionic channels, our model reproduces the electrical activity observed experimentally. This allow us to simulate the spatiotemporal distribution of Ca<sup>2+</sup> in the microdomain generated by the electrical activity pattern. Our modeling approach enable us to evaluate the effect of distinct distributions of Ca<sup>2+</sup> channels over the cell membrane. Besides reproducing experimental observations, we also assess the impact of impaired functioning of ionic channels on Ca<sup>2+</sup> microdomains, which could ultimately affect insulin secretion.

## References

- [1] J.C. Henquin, *The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in  $\beta$ -cells*, Diabetes Research and Clinical Practice. **93** S27-S31, 2011.
- [2] G.A. Rutter, T. Tsuboi, M.A. Ravier, *Ca<sup>2+</sup> microdomains and the control of insulin secretion*, Cell Calcium. **40** 539-551, 2006.
- [3] K. Bokvist, L. Eliasson, C. Ammälä, E. Renström, P. Rorsman, *Co-localization of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells*, The EMBO Journal, **14**(1) 50–57, 1995.

## **Artículo 5**

**Analysis of spiking electrical activity in human  $\beta$ -cells using mathematical models.**

Presentado como parte del programa del **VI Congreso Internacional de Ingeniería Biomédica CLAIB 2014** llevado a cabo en Paraná, Argentina en 2014.

# Analysis of Spiking Electrical Activity in Human $\beta$ -Cells Using Mathematical Models

G.J. Félix Martínez and J.R. Godínez Fernández

Department of Electrical Engineering, Universidad Autónoma Metropolitana, D.F., México  
jrgf@xanum.uam.mx, gjfelix2005@gmail.com

**Abstract**— In this paper we investigate the role of the ionic currents present in the human pancreatic  $\beta$ -cell in the generation of spiking electrical activity. The depolarization and repolarization segments of the action potential produced by a recent mathematical model were studied using the lead potential analysis method to estimate the contribution of the ionic channels to the generation and shape of the action potentials.

**Keywords**— action potential,  $\beta$ -cell, electrical activity, excitable cells, lead potential analysis

## I. INTRODUCTION

Pancreatic  $\beta$ -cells are responsible for insulin secretion in response to glucose stimulation. Insulin, the only hormone capable of reducing blood glucose levels, is secreted by a well known sequence of events[1], beginning with the transport of glucose into the cell to potentiate energy metabolism (i.e. ATP production) at expense of ADP, leading to an increase of the ATP/ADP ratio and membrane depolarization following the closure of the ATP-dependent  $K^+$  channels ( $K_{ATP}$ ). Voltage depolarization triggers electrical activity, allowing the influx of  $Ca^{2+}$  due to the opening of the voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels (VDCCs), resulting in an increase of the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, which is the triggering signal for insulin exocytosis. In human  $\beta$ -cells, action potential (AP) firing (spiking) is the most observed electrical pattern (Fig. 1A), although bursts of APs are also observed occasionally[2,3]. Electrical activity is produced by the concerted action of ionic transport mechanisms, like ionic channels, transporters and exchangers.

Mathematical models are commonly used as a tool to study of the role of the cellular mechanisms involved in the production of the electrical activity in  $\beta$ -cells (reviewed in [4]). Most of the models have been developed based on rodent data; however, given the known differences between species[2], models of the human  $\beta$ -cell have been built recently[3, 5, 6].

Measuring the contribution of each of the ionic transport mechanisms involved in the formation of the electrical pattern is practically impossible by means of experimental techniques. In addition, even though mathematical models allow to consider the interaction between all the ionic transport

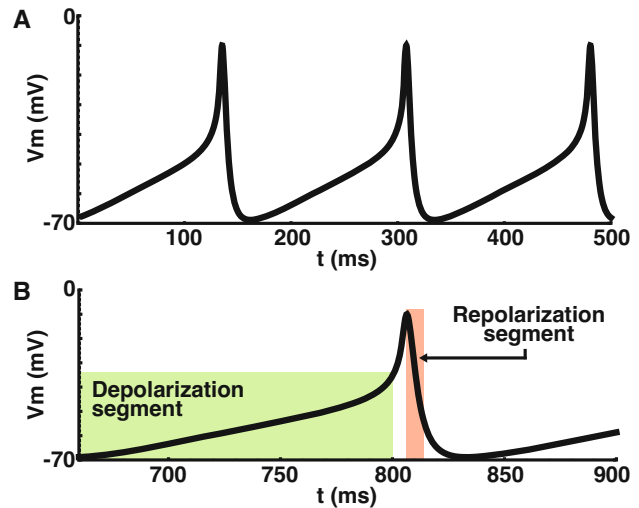


Fig. 1: **A.** Spiking electrical activity produced by the model of Pedersen and Riz[3,5] **B.** Single action potential. The analyzed depolarization (green) and repolarization (red) segments are shown.

mechanisms involved in electrical activity, it is still difficult to analyze the full range of variables in order to elucidate their contribution to the electrical behavior.

In this work we use the lead potential analysis method[7] to investigate the contribution of the ionic channels to the formation of an AP generated by a recent mathematical model of the electrical activity of the human  $\beta$ -cell[3].

## II. METHODS

### A. Mathematical model of electrical activity of the human $\beta$ -cell

Electrical activity of human  $\beta$ -cells were simulated with the model of Pedersen and Riz[3,5], that includes a unspecified leak current,  $Na^+$  channels ( $I_{Na}$ ), L, T, and PQ-type  $Ca^{2+}$  channels ( $I_L$ ,  $I_T$  and  $I_{PQ}$ ) and five types of  $K^+$  channels: delayed rectifier  $K^+$  channels ( $I_{Kv}$ ), ether-a-go-go (HERG)  $K^+$  channels, large-conductance  $K^+$  channels ( $I_{KCa}$ ),  $K_{ATP}$  channels, and small conductance  $K^+$  channels ( $I_{SK}$ ). Ionic currents were modeled using the Hodgkin-Huxley formalism as  $I_X = G_X(V_m - E_X)$ , where  $G_X = g_{X,max}p(o)$  is given

by the maximal conductance ( $g_{X,max}$ ) and the open probability ( $p(o)$ ) of the channel, determined by the product of the activation and inactivation functions describing each current (see Eqs. 4 and 5 in ref.[5]). The temporal changes in membrane potential ( $V_m$ ) are described by the following differential equation:

$$\frac{dV_m}{dt} = -\frac{\sum_X I_X}{C_m} \quad (1)$$

where  $\sum_X I_X = I_{SK} + I_{KCa} + I_{Kv} + I_{HERG} + I_{Na} + I_L + I_T + I_{PQ} + I_{KATP} + I_{leak}$ , and  $C_m$  is the membrane capacitance. Details of the model can be found in refs. [3,5]. Parameters and functions from the original model were used without modification. Spiking electrical activity generated by the model is shown in Fig. 1A.

### B. Lead potential analysis

The lead potential analysis is a method proposed by Cha et al.[7] to quantify the contribution of an individual ionic channels to the changes in  $V_m$ . In the absence of current sources, the lead potential ( $V_L$ ) is given by (see Eq. 8 in ref. [7]):

$$V_L = \frac{\sum_X G_X E_X}{\sum_X G_X} \quad (2)$$

and represents the equilibrium potential determined by the activation and inactivation variables at the time of observation. In short,  $V_m$  tends to approach  $V_L$  at each time point.  $V_L$  is called the lead potential because it leads the changes of  $V_m$ . The relative contribution  $r_c$  of each component is given by

$$r_c = \frac{\frac{dV_L}{dt} - \frac{dV_{L-Fix}}{dt}}{\frac{dV_L}{dt}} \quad (3)$$

where  $dV_{L-Fix}/dt$  is the temporal change in  $V_L$  when the component of interest is fixed. It should be mentioned that the sum of the relative contributions off all the ionic channels must be equal to 1 ( $\sum r_c = 1$ ) at every time. A positive  $r_c$  means that the corresponding component is operating to incline the slope of  $V_L$  ( $dV_L/dt$ ) in the same direction. On the other hand, a negative  $r_c$  indicate that the component is interfering with the temporal changes of  $V_L$ , thus inclining the slope of  $V_L$  in the opposite direction (see ref.[7] for a detailed description of the method).

The lead potential analysis method was used to determine the contributions of the ionic channels both to the depolarization and depolarization segments of an action potential (see Fig.1B).

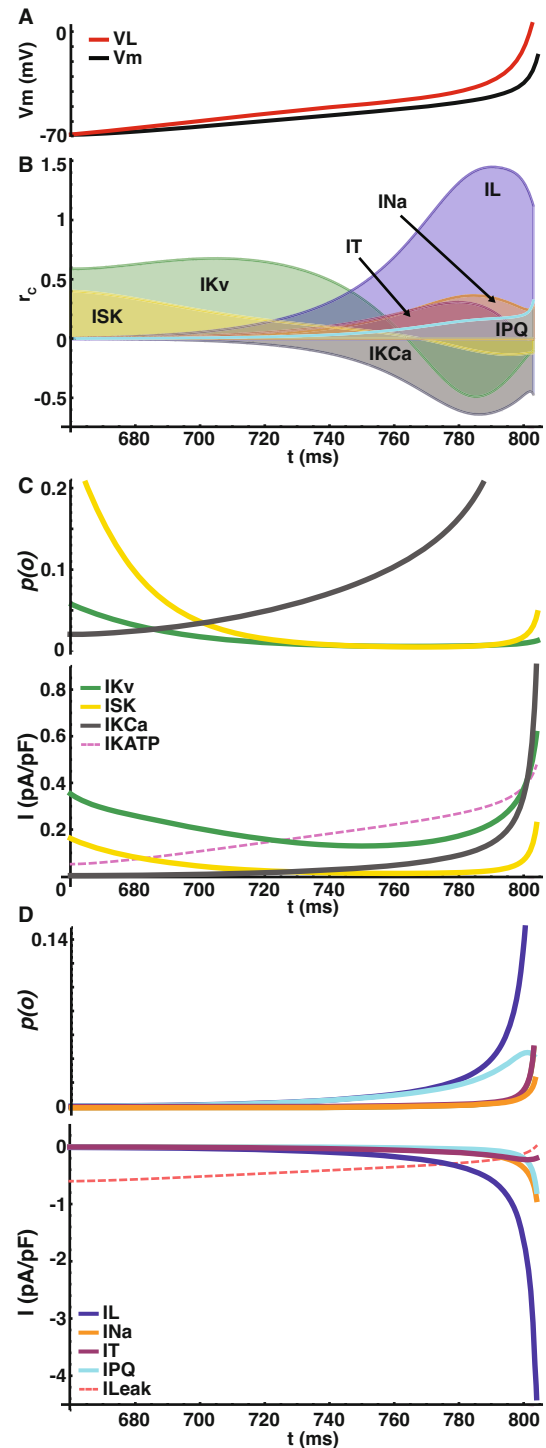


Fig. 2: A. Lead potential ( $V_L$ , red) and membrane potential ( $V_m$ ). B. Relative contribution ( $r_c$ ) of each ionic current to the depolarization segment of an action potential. C. Open probability ( $p(o)$ ) (top) and current traces (bottom) of the outward currents. D. Open probability (top) and current traces (bottom) of the inward currents

### C. Computational aspects

Implementation of the model of the electrical activity of human  $\beta$ -cells and analysis of the spiking electrical behavior were performed in Mathematica 9 (Wolfram Research, Inc., Champagne, IL).

## III. RESULTS AND DISCUSSION

### A. Depolarization of the action potential

The depolarization segment analyzed (shown in Fig. 1B) comprises from the beginning of the slow initial depolarization to the end of the rising phase of the action potential. The lead ( $V_L$ ) and membrane ( $V_m$ ) potentials for the depolarization segment of the AP are shown in Fig. 2A. The relative contributions ( $r_c$ ) of the ionic currents are shown in Fig. 2B. It can be observed that the changes in  $V_m$  during the first half of the depolarization segment are determined mainly by the  $I_{Kv}$  and  $I_{SK}$  currents. Analyzing the open probability of these currents (Fig. 2C top), it can be seen that the initial depolarization is caused by the inhibition of both the  $I_{Kv}$  and  $I_{SK}$  currents (Fig. 2C bottom). On the other hand, during the second half of the depolarizing segment, the contribution of  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  currents (Fig. 2D bottom) becomes relevant, at the same time as the importance of  $I_{Kv}$  and  $I_{SK}$  decreases. It can be said that the second half of the depolarization phase is mainly driven by the contribution of  $I_L$ , while the  $I_T$ ,  $I_{PQ}$  and  $I_{Na}$  currents participate with a minor relevance. The activation of the  $I_{KCa}$  current (Fig. 2C) due to the entry of  $Ca^{2+}$  through the VDCCs is the main component limiting the changes of  $V_m$  ( $r_c < 0$ ), although it can be observed that both  $I_{Kv}$  and  $I_{SK}$  also have a negative effect on membrane depolarization, given that their contribution switched from positive to negative, as the decay of the open probability slows down (Fig. 2C). In fact, at the end of the depolarization segment, it can be seen that  $I_{Kv}$  and  $I_{SK}$  start to rise again (Fig. 2C (bottom)), while  $I_{KCa}$  increased monotonically during the whole depolarization segment.

### B. Repolarization of the action potential

The repolarization segment analyzed is shown in Fig. 1B. It comprises the decaying phase of the action potential.  $V_L$  and  $V_m$  for the segment are shown in Fig. 3A. In this scenario, membrane repolarization is driven initially by the inactivation of the  $I_L$  and  $I_{PQ}$  currents. This can be explained by the fact that the relative contribution of both currents is positive (Fig. 3B), while their open probability (Fig. 3D top) decreases monotonically, which is reflected in the amplitude of the currents (Fig. 3D bottom). Interestingly, the  $I_{KCa}$  current has a negative contribution, which is explained by its

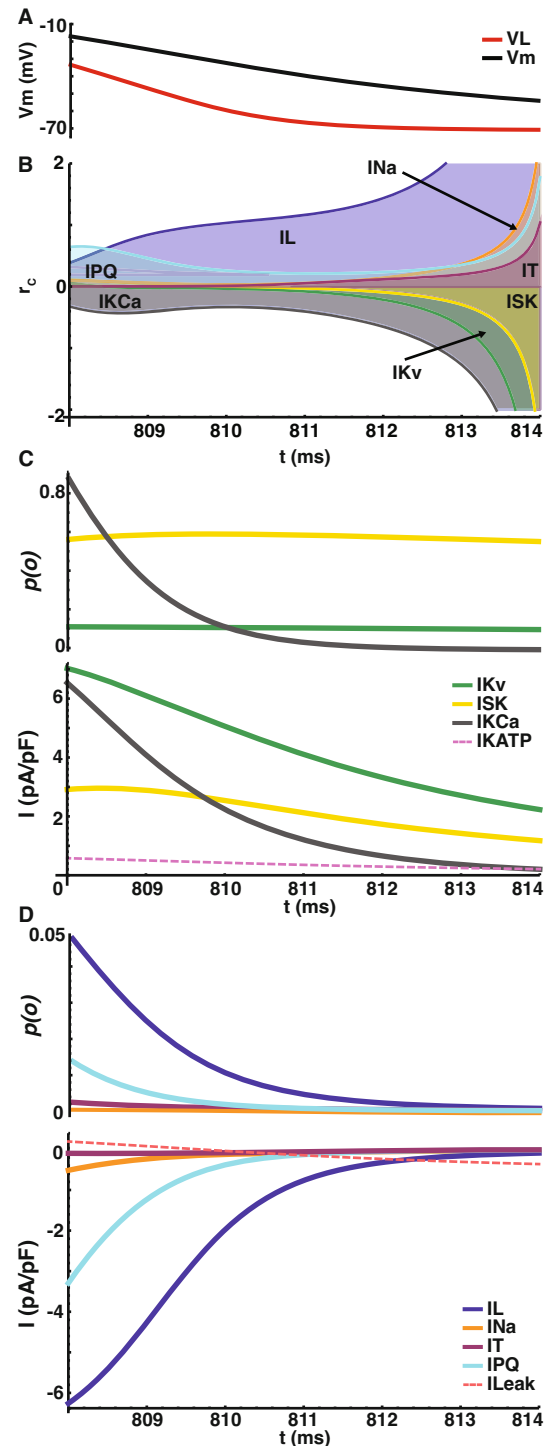


Fig. 3: A. Lead potential ( $V_L$ , red) and membrane potential ( $V_m$ ). B. Relative contribution ( $r_c$ ) of each ionic current to the repolarization segment of an action potential. C. Open probability ( $p(o)$ ) (top) and current traces (bottom) of the outward currents. D. Open probability (top) and current traces (bottom) of the inward currents

decreasing open probability (Fig. 3C top), as  $\text{Ca}^{2+}$  currents (i.e.  $\text{Ca}^{2+}$  influx) are inhibited, thus also inhibiting the activity of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels. Since  $I_{Kv}$  and  $I_{SK}$  only decrease slowly, their contribution to the repolarization phase seems to be minor, in contrast to the inactivation of the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $I_{KCa}$  currents. As all the inward currents ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$ ) approach zero near the end of the repolarization segment, their contribution to the repolarizing effect increases, although being counteracted by the effect of the  $I_{Kv}$  and  $I_{KCa}$  currents, whose contribution interfering membrane repolarization also becomes relevant.

#### IV. CONCLUSIONS

We have used the lead potential analysis method to evaluate the role of the ionic channels involved in the generation of spiking electrical activity in human  $\beta$ -cells. Given that it is practically impossible to measure the contribution of each ionic current to the electrical behavior experimentally, mathematical models are used instead as a tool to investigate how the cellular processes involved interact.

According with our analysis, initial depolarization of the AP is provoked mainly by the inhibition of the  $I_{Kv}$  and  $I_{SK}$  currents, being taken over by the activation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_L$ ), which is counteracted by the activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  currents ( $I_{KCa}$  and  $I_{SK}$ ) and the delayed rectifier  $\text{K}^+$  current ( $I_{Kv}$ ). The remaining inward currents (T and P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  currents and the  $\text{Na}^+$  current) also contributed to membrane depolarization but to a lesser extent if compared to the contribution of the  $I_L$  current. On the other hand, the repolarization phase is driven primarily by the inhibition of  $I_L$  and  $I_{KCa}$ , although the remaining inward and outward currents increased their contribution near the end of the repolarization segment.

The role of the ionic transport mechanisms in the human  $\beta$ -cell is still unclear for several reasons. In this work we have shown how mathematical models can be used as a complement to the experimental work to contribute to a better understanding of the interaction between the ionic currents involved in the spiking electrical behavior in human  $\beta$ -cells.

#### REFERENCES

- [1] P. Rorsman, L. Eliasson, T. Kanno, Q. Zhang, and S. Gopel. Electrophysiology of pancreatic  $\beta$ -cells in intact mouse islets of Langerhans. *Prog Biophys Mol Biol*, 107(2):224-235, 2011.
- [2] P. Rorsman and M. Braun. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol*, 75(1):155-

179, 2013.

- [3] M. Riz, M. Braun, and M. G. Pedersen. Mathematical modeling of heterogeneous electrophysiological responses in human  $\beta$ -cells. *PLoS Comp Biol*, 10(1):e1003389, 2014.

- [4] L. E. Fridlyand, N. Tamarina, and L. H. Philipson. Bursting and calcium oscillations in pancreatic  $\beta$ -cells: specific pacemakers for specific mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299:517-532, 2010.

- [5] M. G. Pedersen. A Biophysical model of electrical activity in human  $\beta$ -cells. *Biophys J*, 99(10):3200-3207, 2010.

- [6] L. E. Fridlyand, D. A. Jacobson, and L. H. Philipson. Ion channels and regulation of insulin secretion in human  $\beta$ -cells: A computational systems analysis. *Islets*, 5(1):1-15, 2013.

- [7] C. Y. Cha, Y. Himeno, T. Shimayoshi, A. Amano, and A. Noma. A novel method to quantify contribution of channels and transporters to membrane potential dynamics. *Biophys J*, 97(12):3086-3094, 2009.

Author: Gerardo J. Félix Martínez  
 Institute: Universidad Autónoma Metropolitana  
 Street: San Rafael Atlixco No 186, Iztapalapa, Vicentina, 09340  
 City: México D.F.  
 Country: México  
 Email: gjfelix2005@gmail.com



## **Artículo 6**

**Modeling buffered  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion in a single human  $\beta$ -cell:  
the role of endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffers and  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion  
mechanisms.**

Presentado como parte del programa del **Congreso Nacional de  
Ingeniería Biomédica 2014** llevado a cabo en Puerto Vallarta Jal.,  
México en 2014.

# Modeling buffered $\text{Ca}^{2+}$ diffusion in a single human $\beta$ -cell: the role of endogenous $\text{Ca}^{2+}$ buffers and $\text{Ca}^{2+}$ extrusion mechanisms

G.J. Félix-Martínez<sup>1</sup> and J.R. Godínez-Fernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Electrical Engineering, Universidad Autónoma Metropolitana, D.F., México

**Abstract**— In this paper, a model of the electrical activity of the human  $\beta$ -cell was used in conjunction with a reaction-diffusion model of  $\text{Ca}^{2+}$  in order to analyze the spatiotemporal distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  in the intracellular space. The model includes both  $\text{Ca}^{2+}$  influx and extrusion mechanisms, as well as a two endogenous buffer systems with different kinetic characteristics. The effect of buffering and clearance of  $\text{Ca}^{2+}$  on the time course of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal driven by spiking electrical activity was addressed.

**Keywords**—  $\beta$ -cell, calcium, diffusion, action potential, electrical activity

## I. INTRODUCTION

Insulin, the only hormone directly responsible for lowering the blood glucose levels, is secreted in response to an increase of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) following glucose stimulation[1]. In  $\beta$ -cells,  $\text{Ca}^{2+}$  transients are mediated by the electrical activity produced by the interplay of several cellular mechanisms, including ionic channels,  $\text{Ca}^{2+}$  handling mechanisms and metabolism. It is widely accepted that after being transported into the cell, glucose stimulates metabolism (i.e. ATP synthesis) producing an increase of the cytosolic ATP concentration, which inhibits the activity of the ATP-dependent  $\text{K}^+$  channels. The resulting depolarization of the membrane potential ( $V_m$ ) triggers the onset of the electrical activity allowing the influx of  $\text{Ca}^{2+}$  through the VDCCs and the increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  that finally triggers insulin secretion. Several cellular mechanisms contribute to the generation of the electrical activity of  $\beta$ -cells (for a review see Ref. [2]). In human  $\beta$ -cells, action potential (AP) firing (i.e. *spiking*) is the most common electrical behavior, although bursts of APs are also occasionally observed[2].

$\text{Ca}^{2+}$  signals in the intracellular space are shaped by several cellular mechanisms (e.g. pumps and exchangers). In addition, endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffers ( $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins) buffer  $\text{Ca}^{2+}$  to low levels, preventing an abnormal increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . It has been shown that the secretory sites co-localize with the VDCCs[3], where  $\text{Ca}^{2+}$  concentration reaches much higher levels than the rest of the cytosol, forming the so called  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains[4]. Given that the increase of cytosolic

$\text{Ca}^{2+}$  generated by the influx of  $\text{Ca}^{2+}$  through the VDCCs triggers both mobilization and exocytosis of the insulin granules, it is important to determine how the different mechanisms involved in  $\text{Ca}^{2+}$ -handling contribute to the shape of the  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  transients.

Mathematical modeling has been extremely useful to the understanding of the physiology of the  $\beta$ -cell, although the spatial aspects have been always neglected, assuming a uniform distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  throughout the cytosol. In contrast, in this work we have used a  $\text{Ca}^{2+}$  reaction-diffusion model in conjunction with a model of the electrical activity of the human  $\beta$ -cell to simulate the diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  through the intracellular space in response to changes in  $V_m$  that resemble the electrical behavior of the actual cell during glucose stimulation.

## II. MATERIAL AND METHODS

### A. Model of the electrical activity of the human $\beta$ -cell

The time course of  $V_m$  was simulated using the model of the human  $\beta$ -cell of Pedersen[5] without modifications. The model is based mainly on the electrophysiological data from Braun et al.[6] and includes  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  currents. Of special interest for this work are the  $\text{Ca}^{2+}$  currents, given that they are responsible for the influx of  $\text{Ca}^{2+}$  that produces the  $\text{Ca}^{2+}$  transients throughout the intracellular space. Three voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  currents (L-, T-, and P/Q type) were included. Thus, the total  $\text{Ca}^{2+}$  current is given by  $I_{Ca} = I_L + I_T + I_{PQ}$  (see Ref. [5] for the details of the model).

### B. Buffered diffusion

This model includes three species:  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , a fixed and a diffusible endogenous buffers ( $B_i$ ), and the  $\text{Ca}^{2+}$ -fixed buffer complexes ( $\text{CaB}_i$ ). It was assumed that the single human  $\beta$ -cell has a spherical shape, which is a reasonable approximation when the cell is isolated (Braun, 2013, personal communication). Neglecting the tangential components of diffusion and assuming that the VDCCs are homogeneously dis-

tributed over the cell membrane, the diffusion equation can be reduced to a one-dimensional equation:

$$\frac{\partial [Ca^{2+}]}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 D_{Ca} \frac{\partial [Ca^{2+}]}{\partial r} \right) - \sum_i R_i \quad (1)$$

$$\frac{\partial [B_i]}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 D_{B_i} \frac{\partial [B_i]}{\partial r} \right) - R_i \quad (2)$$

$$\frac{\partial [CaB_i]}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 D_{B_i} \frac{\partial [CaB_i]}{\partial r} \right) + R_i \quad (3)$$

where  $r$  is the radius of the cell,  $D_X$  is the diffusion coefficient for the corresponding species and  $R_i$  is the term of interaction between  $Ca^{2+}$  and  $i$  denotes the type of endogenous buffer (fixed  $f$  and movie  $m$ ).  $Ca^{2+}$  buffering follows a first order reaction, thus:

$$R_i = k_f [Ca^{2+}] \cdot [B_i] - k_r [CaB_i] \quad (4)$$

where  $k_f$  and  $k_r$  are the forward and backward binding rates for both the fixed and movie buffers, respectively.

### C. $Ca^{2+}$ influx and extrusion

$Ca^{2+}$  influx and extrusion were imposed only to the boundary representing the cell membrane. The influx of  $Ca^{2+}$  is mediated by the total  $Ca^{2+}$  current ( $I_{Ca}$ , see above). The plasma membrane ATPase (PMCA) and the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger are responsible for the extrusion of  $Ca^{2+}$  from the cytosol ( $I_{PMCA}$  and  $I_{NCX}$  respectively). Both extrusion mechanisms were simulated as in the model of Meyer-Hermann[7]:

$$I_{PMCA} = \rho_{PMCA} i_{PMCA} \frac{[Ca^{2+}]_{MD}^2}{[Ca^{2+}]_{MD}^2 + K_{PMCA}^2} \quad (5)$$

$$I_{NCX} = \rho_{NCX} i_{NCX} \frac{[Ca^{2+}]_{MD}}{[Ca^{2+}]_{MD} + K_{NCX}} \quad (6)$$

where  $\rho_{NCX}$  and  $\rho_{PMCA}$  are the densities of the NCX and PMCA respectively and  $i_{PMCA}$  and  $i_{NCX}$  are the maximal currents. In order to maintain a fixed  $[Ca^{2+}]_c$  at rest, a steady leakage of  $Ca^{2+}$  given by Eq. 5 with  $[Ca^{2+}]_{MD} = [Ca^{2+}]_0$  was included ( $J_{Leak}$ ). All the  $Ca^{2+}$  fluxes were calculated as  $J_X = I_X / (2FA)$ , where  $X$  indicate the corresponding mechanism (ICa, PMCA, NCX and Leak), and  $A$  is the surface area of the cell. Given that Braun et al.[6] reported an average capacitance of 9.9pF, assuming an equivalence between capacitance and surface area of 10 fF/ $\mu m^2$ [8], a radius of a surface area of 990  $\mu^2$  was calculated, corresponding to a radius of 8.8 $\mu m$ . The total  $Ca^{2+}$  flux through the cell membrane

is thus:

$$J_{Ca} = J_{ICa} - J_{PMCA} - J_{NCX} + J_{Leak} \quad (7)$$

The parameters used for the  $Ca^{2+}$  buffering systems are shown in Table 1. The parameters and expressions for the  $Ca^{2+}$  extrusion mechanisms (PMCA and NCX) can be consulted in Ref. [7] and were used without modification.

Table 1: Parameters for the model of buffered diffusion of  $Ca^{2+}$ . Obtained from Ref. [9]

Parameter	Value
$D_{Ca}$	220 $\mu m^2/s$
$D_{B_f}$	0 $\mu m^2/s$
$D_{B_m}$	15 $\mu m^2/s$
$k_f$	$5 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$
$k_d$	10 $\mu M$
$[B_f]$	0.5 mM
$[B_b]$	100 $\mu M$

### D. Computational Aspects

Simulations were performed in COMSOL Multiphysics 4.4, using the finite element method. The relative and absolute tolerance were 1E-7 and 1E-8 respectively. A maximum time step of 0.1 ms was used in all cases.

## III. RESULTS

### A. Effects of endogenous buffers on the time course of the $Ca^{2+}$ transients during spiking electrical activity

Figure 1A (top) shows the simulated electrical activity ( $V_m$ ) consisting in action potential (APs) firing with a frequency of 5 APs/s. Changes in  $V_m$  promotes the influx of  $Ca^{2+}$  through the VDCCs, resulting in an increase of  $[Ca^{2+}]_c$ . In Fig. 1A (bottom) the concentration of  $Ca^{2+}$  in the microdomain (at a distance of 10 nm from the membrane,  $[Ca^{2+}]_{MD}$ ) is shown both in the presence and absence of endogenous buffers. When endogenous buffers are not considered, it can be seen that the amplitude of the  $Ca^{2+}$  spikes remained approximately constant, while the baseline of  $[Ca^{2+}]_{MD}$  transiently increased upon a steady level of 1 $\mu M$ , where peak  $[Ca^{2+}]_{MD}$  reached  $> 5\mu M$ . In contrast, when endogenous buffers were included in the model, both peak  $[Ca^{2+}]_{MD}$  and the rise of the baseline were inhibited considerably (compare also Fig. 1 D1 vs. D2 and D3).

It can be observed that the time course of the free fixed endogenous buffer ( $[B_1]$ ) closely follows the behavior of

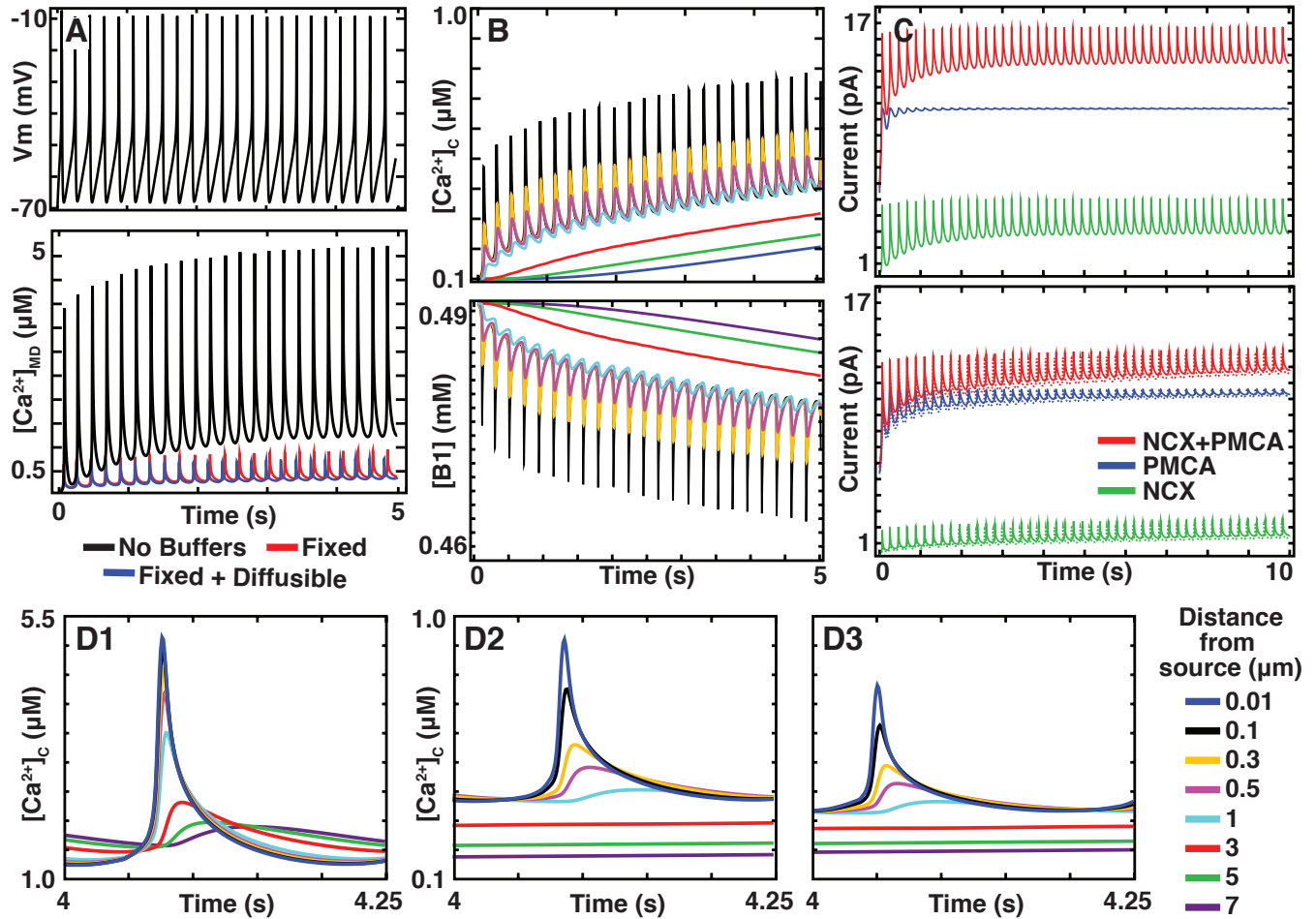


Fig. 1: A. Spiking electrical activity (*top*) and  $Ca^{2+}$  concentration at the microdomain (*bottom*). B.  $Ca^{2+}$  concentration at different depths of the intracellular space (*top*) and the corresponding free fixed endogenous buffer concentrations. Colors indicate different depths (see legend in D). C. Current due to the  $Ca^{2+}$  extrusion mechanisms in absence (*top*) and presence (*bottom*) of the fixed endogenous buffer. D. A single  $Ca^{2+}$  transient is shown at different depths of the intracellular space in absence (D1) of  $Ca^{2+}$  buffers; when a fixed endogenous buffer is included (D2) and when both a fixed and mobile endogenous buffers are considered (D3).

$[Ca^{2+}]_c$  (compare Fig. 1B *top* and *bottom*). It is important to mention that as  $[B_1]$  decreases, the complex  $[CaB_1]$  is formed in such a way that the total concentration of  $B_1$  is conserved (not shown). A single  $[Ca^{2+}]_c$  transient is shown in Figs. 1 D for the three cases simulated: absence of buffers, presence of a single fixed endogenous buffer and presence of both a fixed and a diffusable buffers. In the absence of buffers (Fig. 1 D1) the  $Ca^{2+}$  transient was observed even at 7  $\mu m$  of depth. In contrast, when endogenous buffers were added, the  $Ca^{2+}$  transient was only observed at depths  $\leq 1 \mu m$  (Figs. 1 D2 and D3), although  $[Ca^{2+}]_c$  remained increasing slowly at all depths (see Fig. 1 B *top*).

### B. The effect of $Ca^{2+}$ extrusion mechanisms on $[Ca^{2+}]_{MD}$

According to our simulations,  $Ca^{2+}$  extrusion mechanisms play an important role limiting the rise of  $[Ca^{2+}]_c$  (Fig. 2). In Fig. 1C it can be seen that in the absence of buffers, the activity of the PMCA was practically at its maximum level ( $I_{PMCA} \sim 10$  pA) given its higher sensitivity to  $Ca^{2+}$ . On the other hand, the NCX contributed in a lesser extent to the clearing of  $Ca^{2+}$  from the cytosol, as its sensitivity to  $Ca^{2+}$  is ten fold lower than that of the PMCA. Figure 2 clearly shows the effects of both the PMCA and NCX on  $[Ca^{2+}]_{MD}$  when a single fixed endogenous buffer is included. The presence of the  $Ca^{2+}$  extrusion mechanisms slows the accumulation of  $Ca^{2+}$  in the submembrane space. Similar results were ob-

tained when the diffusible buffer was included (not shown).

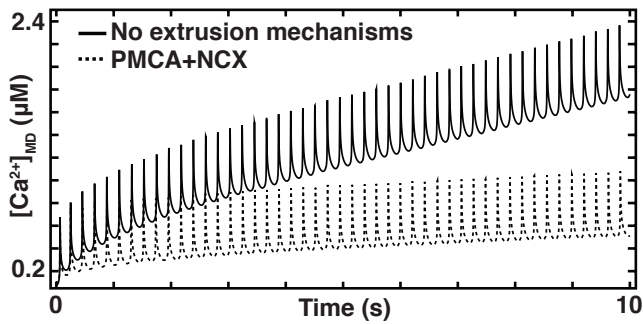


Fig. 2: Effects of  $Ca^{2+}$  extrusion mechanisms on  $[Ca^{2+}]_{MD}$

#### IV. DISCUSSION

In this work we have shown that endogenous buffers, in conjunction with the PMCA and NCX, limit to a great extent the increase of  $[Ca^{2+}]_c$  during repetitive firing of APs. In  $\beta$ -cells, it is known that insulin granules are released to the extracellular space in response to a increase in  $[Ca^{2+}]_{MD}$ . Moreover, insulin granules in the cytosol are also mobilized to the cell membrane by a  $Ca^{2+}$  signal. By means of computational simulations we have estimated that action potential firing, resembling the most common electrical behavior of the human  $\beta$ -cell, produces a  $Ca^{2+}$  transient observable even at a distance of  $\sim 1\mu m$  from the  $Ca^{2+}$  channels in the presence of endogenous buffers. To our knowledge, experimental measurements of  $[Ca^{2+}]_c$  in human  $\beta$ -cells are lacking, although some studies of  $[Ca^{2+}]_c$  in rodent  $\beta$ -cells have been performed. For instance, Theler et al.[10] reported a submembrane  $Ca^{2+}$  of less than  $1\mu M$ . In addition, other authors have reported slightly higher concentrations in the range of 1.8 to  $2.3\mu M$ [3]. Our simulations agree with these experimental reports.

Future development of the model must include a secretory component in order to be able to evaluate how  $Ca^{2+}$  oscillations regulates the mobilization of insulin granules in the intracellular space.

#### V. CONCLUSIONS

Computational models are very useful tools as a complement to the experimental work. In this paper we have shown how by combining a model of the electrical activity of the human  $\beta$ -cell with a model of the buffered diffusion of  $Ca^{2+}$  it is possible to estimate the cytosolic  $Ca^{2+}$  levels achieved during spiking electrical activity.

#### VI. REFERENCES

- [1] P. Gilon, R. M. Shepherd, and J. C. Henquin. Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  as evidences in single pancreatic islets. *J Biol Chem* 1993, 268(30):22265-22286.
- [2] P. Rorsman and M. Braun. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol* 2013, 75:155-179.
- [3] K. Bokvist, L. Eliasson, and C. Ammala. Co-localization of L-type  $Ca^{2+}$  channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *EMBO J* 1995, 14(1): 50-57.
- [4] G. A. Rutter, T. Tsuboi, and M. A. Ravier.  $Ca^{2+}$  microdomains and the control of insulin secretion. *Cell Calcium* 2006, 40(5):539-551.
- [5] M. G. Pedersen. A biophysical model of electrical activity in human  $\beta$ -cells. *Biophys J* 2010, 99(10): pp.3200-3207.
- [6] M. Braun, R. Ramracheya, M. Bengtsson, Q. Zhang, J. Karanauskaite, C. Partridge, P. R. Johnson, and P. Rorsman. Voltage-gated ion channels in human pancreatic  $\beta$ -cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 57(6):1618-1628.
- [7] M. E. Meyer-Hermann. The electrophysiology of the  $\beta$ -cell based on single transmembrane protein characteristics. *Biophys J* 2007, 93:2952-2968.
- [8] P. Rorsman, L. Eliasson, T. Kanno, Q. Zhang, and S. Gopel. Electrophysiology of pancreatic  $\beta$ -cells in intact mouse islets of Langerhans. *Prog Biophys Mol Biol* 2011, 107(2): 224-235.
- [9] J. Klingauf and E. Neher. Modeling buffered  $Ca^{2+}$  diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophys J* 1997, 72(2):674-690.
- [10] J. M. Theler, P. Mollard, N. Guerineau, P. Vacher, W. F. Pralong, W. Schlegel, and C. B. Wollheim, Video imaging of cytosolic  $Ca^{2+}$  in pancreatic  $\beta$ -cells stimulated by glucose, carbachol, and ATP., *J Biol Chem* 1992, 267(25):18110-18117.

Author: Gerardo J. Félix Martínez  
 Institute: Universidad Autónoma Metropolitana  
 Street: San Rafael Atlixco No 186, Iztapalapa, Vicentina, 09340  
 City: México D.F.  
 Country: México  
 Email: gjfelix2005@gmail.com

## **Artículo 7**

**Papel de la oscilación de la concentración de ATP en la actividad eléctrica de la célula  $\beta$ .**

Presentado como parte del programa del **Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica 2011** llevado a cabo en Ixtapa Gro., México en 2011.

# Papel de la Oscilación de la Concentración de ATP en la Actividad Eléctrica de las Células $\beta$ Pancreáticas

J.R. Godínez Fernández y G.J. Félix Martínez\*

Departamento de Ingeniería Eléctrica DCBI, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, D.F., México

\*e-mail: cbi209381756@xanum.uam.mx

**Resumen.-** La actividad eléctrica de las células  $\beta$  en forma de ráfagas de potenciales de acción es vital para una liberación eficiente de insulina. Las células  $\beta$  presentan este patrón de actividad eléctrica cuando la concentración de glucosa extracelular es igual o mayor a 7 mM. Los canales de  $K^+$  sensibles a la concentración de ATP intracelular juegan un papel crítico en el disparo de la actividad eléctrica. En este trabajo, empleando técnicas de simulación, analizamos el efecto de la glucosa extracelular sobre la concentración de ATP, la conductancia de los canales de  $K^+$ , la actividad eléctrica y los transitorios de  $Ca^{2+}$  intracelular. Nuestros resultados indican que la frecuencia de oscilación de la concentración de ATP es fundamental para la actividad eléctrica en ráfagas y transitorios de  $Ca^{2+}$  intracelular asociados con la liberación de insulina.

**Palabras clave:** ATP intracelular, Células  $\beta$ ,  $Ca^{2+}$  intracelular, canales de  $K^+$  sensibles al ATP, glucosa, potenciales de acción en ráfagas, simulación.

## I. INTRODUCCIÓN

El mecanismo propuesto para la liberación de insulina por las células  $\beta$  es el siguiente: Cuando la  $[glucosa]_e$  es baja ( $< 7$  mM), las células  $\beta$  presentan un potencial de reposo promedio de  $-60$  mV. Por otro lado, cuando la  $[glucosa]_e$  es mayor a 7 mM, presentan un patrón de actividad eléctrica en ráfagas de potenciales de acción. El potencial de reposo es mediado por canales de  $K^+$  entre los cuales destaca la población de canales de potasio sensibles a la concentración de ATP ( $K^+_{ATP}$ ). Cuando la  $[glucosa]_e$  incrementa, se introduce a las células  $\beta$  ocasionando un incremento en la concentración de ATP ( $[ATP]_i$ ) [1] lo que disminuye la fracción de canales  $K^+_{ATP}$  abiertos, despolarizando así a la célula [1]. Esta despolarización alcanza un nivel umbral que dispara las ráfagas de potenciales de acción. Las ráfagas son potenciales de acción montados sobre una meseta despolarizante. Los potenciales de acción son generados por corrientes de  $Ca^{2+}$  que incrementan la concentración del  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Este patrón de actividad eléctrica genera una elevación pulsátil de la  $[Ca^{2+}]_i$  (transitorios de  $Ca^{2+}$ ), que a su vez inducen el proceso de exocitosis de los paquetes de insulina [1].

En la descripción anterior, se destaca el incremento de la  $[ATP]_i$  como inductor de la actividad eléctrica en ráfagas de potenciales de acción; sin embargo, existen datos experimentales que indican que la  $[ATP]_i$  no es constante, sino oscilatoria [2]. De

acuerdo con estos datos, el periodo de oscilación incrementa con el aumento de la  $[glucosa]_e$ . Este hallazgo sugiere que la frecuencia de oscilación de la  $[ATP]_i$  podría determinar la frecuencia de las ráfagas de potenciales de acción y por lo tanto de los transitorios de  $Ca^{2+}_i$ , indispensables para la liberación de insulina. El carácter oscilatorio de la secreción de insulina se ve perturbado en personas con diabetes tipo 2 y sus parientes cercanos [9]. En este trabajo damos sustento teórico a esta hipótesis [2,10,11], en el sentido de que la frecuencia de oscilación de la  $[ATP]_i$  determina la frecuencia de las ráfagas y de los transitorios de  $Ca^{2+}_i$ , y más aún, que el periodo de oscilación de la  $[ATP]_i$  es crítico para el disparo adecuado de las ráfagas, con un peso mayor incluso que el incremento de la  $[ATP]_i$ . Los modelos matemáticos empleados [3-5] en la simulación se basan en funciones que se obtuvieron directamente de los datos experimentales reportados en la literatura especializada.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

Los programas se desarrollaron en un ambiente de MATLAB v.7 y Python 2.6, y fueron ejecutados en una computadora personal. El modelo matemático para la descripción de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  se tomó de Chay et. al. [3] modificado por Godínez et al. [4]. Este modelo describe las propiedades eléctricas de las células  $\beta$  y los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  asociados. Al modelo anterior se le incorporó el cambio en la conductancia de los canales  $K^+_{ATP}$  en función de la  $[ATP]_i$ , empleando la expresión matemática reportada por Fridlyand et. al. [5]. Además, se introdujo la función que describe el incremento promedio en la  $[ATP]_i$  al aumentar la  $[glucosa]_e$ , para lo cual se utilizaron los datos experimentales reportados por Detimary et. al [6]. Estos modelos son capaces de reproducir resultados experimentales relacionados a las variables de interés de este trabajo.

Para los cambios en el periodo de oscilación de la  $[ATP]_i$  se utilizaron los datos experimentales de Ainscow et al. [2]. Ellos reportan una oscilación periódica de la  $[ATP]_i$  con un periodo promedio de  $66 \pm 6$  s cuando la  $[glucosa]_e$  es baja (3 mM) y un aumento a  $167 \pm 32$  s en el periodo de oscilación cuando se eleva la  $[glucosa]_e$  a 15 mM. Mostraron además que la amplitud de la oscilación de la  $[ATP]_i$  no se ve afectada. Sumando la función periódica con la función



exponencial que describe el incremento promedio de la [ATP] por el aumento de la [glucosa]<sub>e</sub>, se obtuvo la expresión que determina el comportamiento de la [ATP] en función de la [glucosa]<sub>e</sub>.

La dependencia del periodo de oscilación de la [ATP] con respecto a la [glucosa]<sub>e</sub> se representó por medio de una relación de tipo dosis-respuesta con diferentes constantes de concentración de glucosa para la mitad del periodo máximo ( $G_{50}$ ) y diferentes coeficientes de Hill (Hill), con la finalidad de observar su efecto sobre la actividad eléctrica y los transitorios de  $Ca^{2+}_i$ . Los valores testigo del periodo máximo,  $G_{50}$  y Hill se obtuvieron de datos experimentales [2].

### III. RESULTADOS

Los resultados de las simulaciones de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  y los cambios asociados en la  $[Ca^{2+}]_i$  se muestran en forma gráfica. En todas las figuras se muestran el potencial de membrana (unidades eje izquierdo, línea negra) y la  $[Ca^{2+}]_i$  (unidades eje derecho, línea gris).

En la Fig. 1 se muestra el efecto del cambio en la  $G_{50}$  sobre el potencial de membrana ( $V_m$ ) y la  $[Ca^{2+}]_i$ . En (b) se muestra el patrón de actividad eléctrica y los transitorios de  $Ca^{2+}$  considerados normales cuando la [glucosa]<sub>e</sub> es de 14.7 mM, valor que se alcanza a los 60 minutos durante una prueba de tolerancia a la glucosa [12]. Cuando se incrementa la  $G_{50}$  observamos en (c), (d) y (e) que el periodo de las r-fagas disminuye, al igual que su duración, afectando negativamente los transitorios de  $Ca^{2+}_i$ , ya que, además de un cambio

notable en la frecuencia, la amplitud de los transitorios disminuye notablemente hasta prácticamente desaparecer en (e), aunque se observa también una elevación respecto al nivel basal, que podría inducir una deficiente secreción de insulina. Por el contrario, cuando se disminuye  $G_{50}$  (a), el periodo de las r-fagas aumenta, de la misma manera que su duración. Asimismo, se puede apreciar un incremento en el valor máximo y la duración de los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  cuando se lleva a cabo la simulación a una [glucosa]<sub>e</sub> umbral para el disparo de las r-fagas, esto es, a 7 mM (Fig. 2). Las r-fagas aparecen para valores de  $G_{50}$  control (b) y desaparecen (a,c,d) o se incrementan en frecuencia disminuyendo su duración (e), afectando gravemente los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  para diferentes valores de  $G_{50}$ .

En la Fig. 3 se muestran los resultados obtenidos al mantener el valor testigo de  $G_{50}$  pero modificando el coeficiente de Hill. El valor del coeficiente de Hill que obtuvimos tomando en cuenta datos experimentales de otros autores fue de 1; en (b) se muestra nuevamente el patrón de actividad eléctrica y transitorios de  $Ca^{2+}_i$  que se esperan de una [glucosa]<sub>e</sub> alta (14.7 mM) con un coeficiente de Hill igual a 1. Observamos en (c) y (d) que al aumentar el coeficiente de Hill se obtiene una disminución en el periodo de las r-fagas, junto con una disminución en su duración, abatiendo los transitorios de  $Ca^{2+}_i$ . Recíprocamente, al disminuir el coeficiente de Hill, el periodo de las r-fagas es mayor, su duración aumenta, y los valores máximos y duración de los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  son mayores.

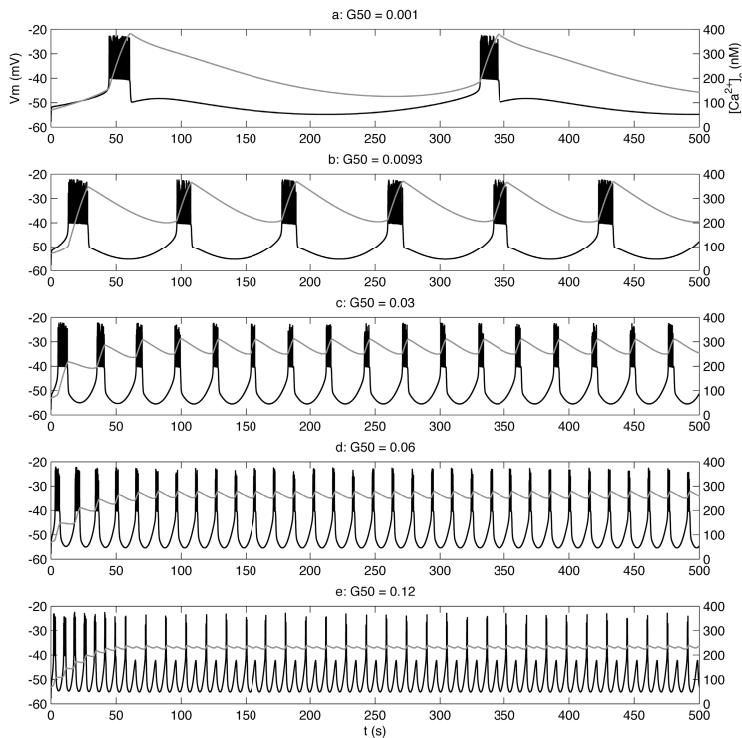
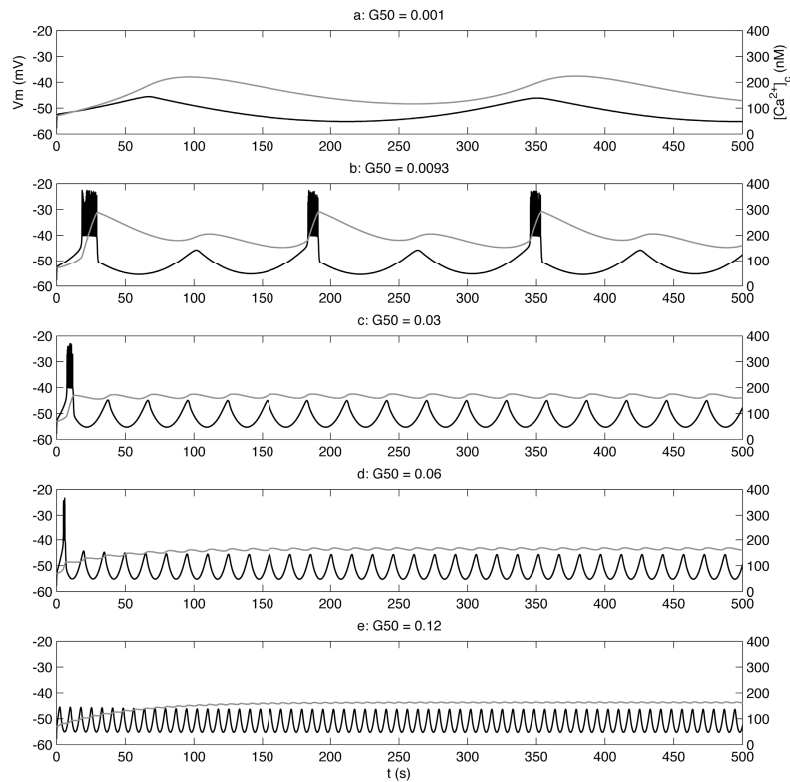


Fig 1. Simulación de la actividad eléctrica de las células  $\beta$  con alta [glucosa]<sub>e</sub> (14.7 mM) y diferentes valores de  $G_{50}$ . La línea negra indica el potencial de membrana ( $V_m$ ) y la gris la  $[Ca^{2+}]_i$ , con unidades en mV y nM respectivamente.



Fig 2. Simulación de la actividad eléctrica de las células  $\beta$  con baja  $[glucosa]_e$  (7.8 mM) y diferentes valores de  $g_{50}$ . Se muestra el potencial de membrana ( $V_m$ , línea negra) y la  $[Ca^{2+}]_i$  (línea gris) con unidades en mV y nM respectivamente.



A una  $[glucosa]_e$  umbral para el disparo de r fagas de potenciales de acción se obtuvieron resultados cualitativamente similares (datos no mostrados).

#### IV. DISCUSIÓN

El modelo aquí propuesto da sustento a la hipótesis de que el periodo de oscilación de la  $[ATP]$  es determinante para una adecuada secreción de insulina. Existen mecanismos que regulan la producción de ATP y se piensa que el control se da por un lado a nivel de algunas enzimas regulatorias que participan en el metabolismo energético [1] y por otro, al consumo de ATP debido al sistema de bombeo de  $Ca^{2+}$  a nivel de retículo endoplásmico [8] y otros procesos que consumen energía [7,8]. Si estos mecanismos de regulación son alterados, serán afectadas las propiedades eléctricas de las células  $\beta$  y por lo tanto la liberación de insulina. La  $[ATP]$  no es constante, sino oscilatoria [2]. El incremento en la  $[glucosa]_e$  incrementa la  $[ATP]$  promedio y el periodo de oscilación [2,6].

Existe consenso en cuanto a que el periodo de oscilación de la  $[ATP]$  solo participa en la frecuencia de las r fagas; sin embargo, nuestros resultados muestran un papel más destacado del periodo de oscilación, incluso mayor al de la magnitud de la  $[ATP]$  promedio.

Para analizar el periodo de oscilación, empleamos la relación dosis-respuesta con cambios en

$G_{50}$  y el coeficiente de Hill. Encontramos que un incremento anormal del periodo ante una carga de glucosa podría inhibir la actividad eléctrica en r fagas y los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  y a su vez la liberación de insulina. Coeficientes de Hill mayores que 1 incrementan el periodo de oscilación afectando sensiblemente la actividad eléctrica y los transitorios de  $Ca^{2+}_i$ . Asimismo, tomando los valores para la  $[ATP]$  a 14.7 mM de  $[glucosa]_e$ , se varió arbitrariamente el periodo de oscilación de la  $[ATP]$  para explorar los efectos del periodo sobre la actividad eléctrica y los transitorios de  $Ca^{2+}$  a alta concentración de glucosa. Encontramos que existe un periodo crítico inferior al cual la frecuencia de oscilación de  $[ATP]$  genera actividad eléctrica ineficaz para producir los transitorios de  $Ca^{2+}$  indispensables para la secreción de insulina (Fig. 4).

Nuestros resultados sugieren que existe un ancho de banda para el cual el periodo de oscilación de  $[ATP]$  es apropiado para la actividad eléctrica en forma de r fagas de potenciales de acción, los transitorios de  $Ca^{2+}_i$ , y la liberación de insulina. Por lo anterior, periodos fuera de este rango podrían afectar la liberación de insulina. Dado que una deficiente secreción de insulina tiene un papel central en el desarrollo de la diabetes tipo 2, proponemos que una alteración en el periodo de oscilación de la  $[ATP]$  podría ser un factor desencadenante de esta enfermedad. Sin embargo, son necesarios estudios experimentales que permitan comprobar los resultados aquí obtenidos.

Fig 3. Efecto de la variación del coeficiente de Hill sobre el potencial de membrana ( $V_m$ , línea negra) y transitorios de  $[Ca^{2+}]_c$  (línea gris). Se considera el valor de la constante de Hill=1 como el normal. Las gráficas muestran que a medida que incrementa el coeficiente de Hill la frecuencia de las ráfagas es mayor, su duración menor y tienden a desaparecer los transitorios de  $Ca^{2+}_i$ .

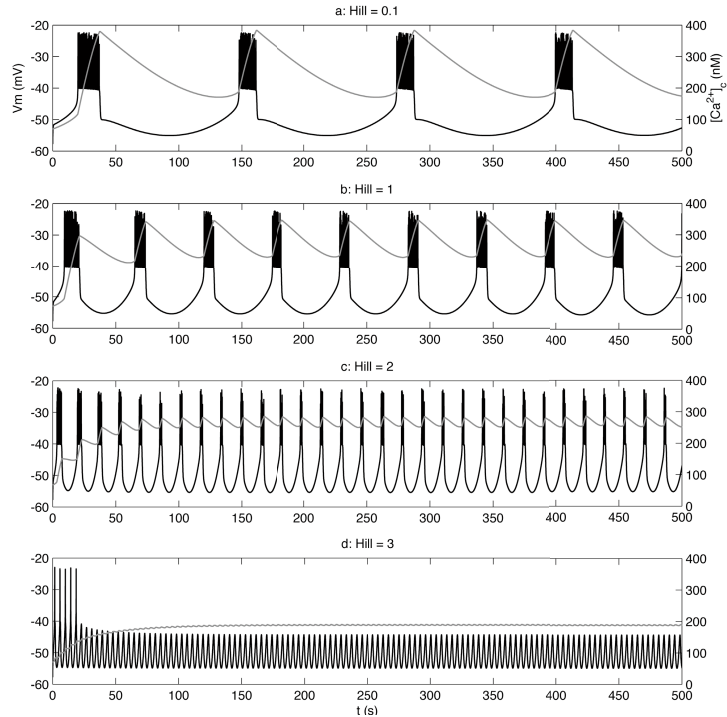
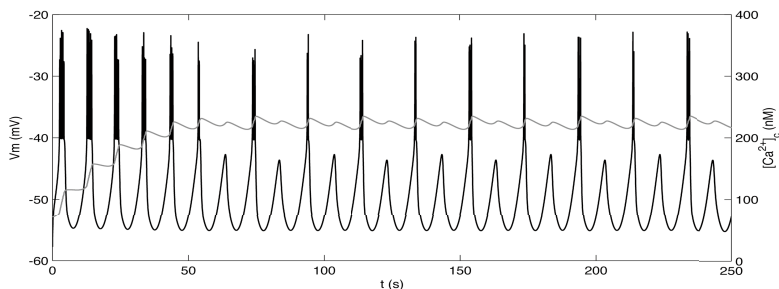


Fig 4. Periodo crítico bajo (alta frecuencia) de las oscilaciones en la  $[ATP]$  a alta concentración de glucosa (14.7 mM). Potencial de membrana,  $V_m$  (línea negra);  $[Ca^{2+}]_c$  (línea gris).



## REFERENCIAS

- [1] B. J. Brass, Z. Abelev, E. P. Liao, and L. Poretsky. Principles of Diabetes Mellitus, p. 37, Springer, New York (2010).
- [2] E. K. Ainscow, and G. A. Rutter. Glucose-stimulated oscillations in free cytosolic ATP concentration imaged in single islet  $\beta$ -cells. Diabetes 51, s162 (2002).
- [3] T. R. Chay, and J. Keizer. Minimal model for membrane oscillations in the pancreatic  $\beta$ -cell. Biophys. J. 42, 181 (1983).
- [4] J. R. Godínez and M. G. Urbina. Simulación de la actividad eléctrica de las células  $\beta$  del páncreas. Rev. Mex. de Ing. Biom. 16, 21 (1993).
- [5] L. E. Fridlyand, M. Li, and L. H. Philipson. Adenine nucleotide regulation in pancreatic  $\beta$ -cells: modeling of ATP/ADP- $Ca^{2+}$  interactions. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 289, E839 (2005).
- [6] P. Detimary, S. Dejonghe, Z. Ling, D. Pipeleers, F. Schuit, and J. C. Henquin. The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in  $\beta$  cells but not in  $\alpha$  cells and are also observed in human islets. The Journal of Biological Chemistry 273(51), 33905 (1998).

- [7] P. Detimary, P. Gilon, and J. C. Henquin. Interplay between cytoplasmic  $Ca^{2+}$  and the ATP/ADP ratio: a feedback control mechanism in mouse pancreatic islets. Biochem J 333 (Pt 2), 269-274 (1998).
- [8] L.E. Fridlyand, N. Tamarina and L. H. Philipson. Modeling of  $Ca^{2+}$  flux in pancreatic  $\beta$  cells: role of the plasma membrane and intracellular stores. Am J Physiol Endocrinol Metab 285:138-154, 2003.
- [9] D. Matthews, D. Lang, and M. Burnett. Diabetologia, Volume 24, Number 4. Diabetologia (1983).
- [10] P. Smolen, and J. Keizer. Slow voltage inactivation of  $Ca^{2+}$  currents and bursting mechanisms for the mouse pancreatic beta-cell. Journal of Membrane Biology 127, 9-19 (1992).
- [11] T. Nilsson, V. Schultz, P.O. Berggren, B.E. Corkey, and K. Tornheim. Temporal patterns of changes in ATP/ADP ratio, glucose 6-phosphate and cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  in glucose-stimulated pancreatic beta-cells. Biochem J 314 ( Pt 1), 91-94 (1996).
- [12] H. Trujillo-Arriaga and R. Román-Ramos. Fitting and evaluating the glucose curve during a quasi continuous sampled oral glucose tolerance test. Computers in Biology and Medicine 38, 185-195 (2008).