

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**José Radamés Ferreira da Silva**

**EFEITO DE PULSOS ELÉTRICOS EM CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS *IN SILICO* E DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EXPERIMENTAL PARA APLICAÇÃO DE BAIXAS VOLTAGENS EM ILHOTAS DE LANGERHANS DE RATOS *IN VITRO***

**Recife  
2019**

**José Radamés Ferreira da Silva**

**EFEITO DE PULSOS ELÉTRICOS EM CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS *IN SILICO* E DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EXPERIMENTAL PARA APLICAÇÃO DE BAIXAS VOLTAGENS EM ILHOTAS DE LANGERHANS DE RATOS *IN VITRO***

**Orientador:**

Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

**Co-orientador:**

Prof. Dr. Ramón Enrique Ramayo González

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

**Recife  
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586e Silva, José Radamés Ferreira da  
Efeito de pulsos elétricos em células  $\beta$  pancreáticas in silico e desenvolvimento de um sistema experimental para aplicação de baixas voltagens em ilhotas de Langerhans de ratos in vitro / José Radamés Ferreira da Silva. – 2019.  
72 f. : il.

Orientador: Romildo de Albuquerque Nogueira.  
Coorientador: Ramón Enrique Ramayo González.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2019.  
Inclui referências.

1. Simulação (Computadores) 2. Célula  $\beta$  pancreática 3. Pulsos de voltagem 4. Padrão de bursts 5. Espaço de fase 6. Arduino (Controlador programável) I. Nogueira, Romildo de Albuquerque, orient. II. González, Ramón Enrique Ramayo, coorient. III. Título

CDD 636.089

**José Radamés Ferreira da Silva**

**EFEITO DE PULSOS ELÉTRICOS EM CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS *IN SILICO* E DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EXPERIMENTAL PARA APLICAÇÃO DE BAIXAS VOLTAGENS EM ILHOTAS DE LANGERHANS DE RATOS *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Tese apresentada em 26 de fevereiro de 2019.

**Banca examinadora:**

---

Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira – Orientador - UFRPE

---

Dr. Thiago Salazar e Fernandes – UFPE

---

Dr. Edberghe Ventura Lola Costa – PPGBA – UFRPE

---

Dr. Victor Wanderley Costa de Medeiros – DEINFO – UFRPE

---

Dr. Emmanuel Viana Pontual – PPGBA – UFRPE

---

Dra. Jeine Emanuele Santos da Silva – DMFA – UFRPE (suplente)

---

Dra. Isvânia Maria Serafim da Silva – UFPE (suplente)

## DEDICATÓRIA

À minha mãe Fátima e irmã Patrícia por todo apoio e paciência mesmo nos momentos mais estressantes, aos meus tios Pedro e Antônio por todo apoio e incentivo para conclusão deste trabalho e a meus avós Elizabeth e Rômulo pelo suporte em todas as dificuldades.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira pela orientação maravilhosa, clara e precisa durante todo o curso de doutorado e por ser essa pessoa estupenda que me aceitou e acreditou que eu era capaz de cumprir a missão de realizar este projeto. Ao prof. Dr. Ramon Ramayo pela co-orientação deste trabalho sua contribuição nas simulações e análises de resultados foi fundamental para conclusão do mesmo. Ao prof. Dr. Victor Medeiros pela contribuição na montagem e teste do equipamento utilizado neste trabalho e toda participação na parte computacional.

A todos que compõem o LACREC e LABTEC, em especial ao Dr. Edbhergue Costa por todo companheirismo e contribuição na parte escrita e testes, a Cláudio de Castro por todo apoio e companheirismo sugestões nos momentos de maiores dúvidas e por ser este grande amigo, desculpe o trocadilho, mas não resisti. A Alceu, Leandro, Jeine, Ardiles, Hanna, Eva e Felipe, que proporcionam um ambiente de trabalho harmonioso e acolhedor.

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação em Biociência animal.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (Cetene) por permitir o uso de seus equipamentos.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa concedida.

## RESUMO

Estudos sobre a influência da exposição a campos elétricos e magnéticos em ilhotas pancreáticas ainda são escassos e controversos, sendo difícil comparar os estudos existentes devido aos diferentes métodos de pesquisa empregados. Neste trabalho, simulações computacionais foram usadas para estudar os padrões de *burst* durante a exposição de células  $\beta$  pancreáticas a pulsos de voltagens constantes. Os resultados *in silico* mostram que os padrões de *burst* nas células  $\beta$  pancreáticas são dependentes da voltagem externa aplicada e que algumas voltagens podem até inibir esse fenômeno. Foi mostrado nesses experimentos *in silico* existir voltagens críticas, como 2,16 mV, em que ocorre mudança da forma do *burst* de uma fase de oscilação média para uma fase de oscilação lenta. Enquanto numa voltagem de 3,5 mV ocorre uma transição no *burst* da fase de oscilação lenta para a rápida. Voltagens superiores a 3,5 mV em nossas simulações levaram a um padrão com ausência dos *bursts*, o que indica inibição no processo de secreção de insulina. Esses resultados são reforçados pela análise do espaço de fase, que apresenta um mapa de estados ou variáveis de equações diferenciais de um modelo dinâmico matemático. Para testar os resultados obtidos *in vitro* foi realizado, com o auxílio da plataforma Arduino, modificações num gerador de pulsos elétricos de código aberto, visando à aplicação de pulsos constantes de baixas voltagens em ilhotas de Langerhans.

## ABSTRACT

Studies on the influence of exposure to electric and magnetic fields on pancreatic islets are still scarce and controversial, and it is difficult to compare existing studies because of the different research methods employed. In this work, computational simulations were used to study burst patterns during exposure of pancreatic  $\beta$  cells to pulses of constant voltages. The *in silico* results show that the burst patterns in pancreatic  $\beta$  cells are dependent on the external voltage applied and that some voltages may even inhibit this phenomenon. It was shown in these *in silico* experiments that there are critical voltages, such as 2.16 mv, in which the burst shape changes from a medium oscillation phase to a slow oscillation phase. While at a voltage of 3.5 mv a transition occurs in the burst from the slow-to-rapid oscillation phase. Voltages greater than 3.5 mv in our simulations led to a pattern with absence of bursts, indicating inhibition in the insulin secretion process. These results are reinforced by phase space analysis, which presents a state map of differential equation system variables of a mathematical dynamic model. In order to test the results obtained *in vitro*, an open-source electrical pulse generator was developed with the aid of the arduino platform, aiming at the application of low voltages constant pulses in the islets of *Langerhans*.



## SUMÁRIO

Resumo .....	7
Abstract.....	8
1 Introdução.....	10
2 Revisão Bibliográfica.....	13
2.1 O diabetes.....	14
2.2 Pâncreas endócrino .....	14
2.3 Canais iônicos e secreção de insulina.....	17
2.3.1 Canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) .....	17
2.3.2 Canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Cav$ ) .....	18
2.3.3 Canais de potássio dependente voltagem ( $K_v$ ) .....	19
2.4 Modelo de Bertram e a secreção de insulina.....	20
2.5 Efeitos de campos elétricos e magnéticos na secreção de insulina. ....	22
2.6 Modelando o efeito do campo elétrico em células $\beta$ .....	23
2.7 Criticalidade .....	23
3 Objetivos.....	26
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos .....	27
4 Referências.....	28
5 Capítulo 1: Effects of external voltage in the dynamics of pancreatic $\beta$ -cells: implications in the treatment of diabetes. ....	35
6 Capítulo 2: Proposta de modificações em um gerador de pulsos elétricos de código aberto para controle da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans.....	56

## 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus é uma doença sistêmica que impossibilita o indivíduo de manter o nível normal de glicose no plasma por ocasionar deficiência na secreção de insulina nas células beta ou resistência na absorção de glicose pelas células do organismo. O número de pacientes com tal enfermidade é crescente em todo o mundo, principalmente do diabetes tipo 2. Conhecer os mecanismos que o pâncreas utiliza para secretar insulina e promover o controle do diabetes se mostra cada vez mais importante. (BRINKMAN, 2017; COSTABILE; SARNSAMAK; HAUGE-EVANS, 2018; CRAWFORD, 2017; D'ALEO et al., 2011; PEDERSEN et al., 2013; PROF DANEMAN, 2006; RORSMAN et al., 2011) O pâncreas através da sua função endócrina libera vários hormônios incluindo a insulina (CADE; HANISON, 2017; JOUVET; ESTALL, 2017; TAN, 2014). Este processo ocorre por conta da ação dos canais iônicos que reagem ao aumento do nível de glicose sanguínea promovendo a despolarização da membrana das células beta através do fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP e em consequência desse fechamento ocorre a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) que permitem o influxo de  $Ca^{2+}$ , que induzem os grânulos de insulina armazenados no citosol a fundirem-se na membrana das células beta, para promover a secreção de insulina. Durante este processo os canais de potássio dependentes de voltagem também são ativados e de forma mais lenta promovem a repolarização da membrana e interrompe o processo de secreção de insulina. (BERTRAM; SHERMAN; SATIN, 2010; CADE; HANISON, 2017; HELLMAN et al., 2012; JOUVET; ESTALL, 2017; RORSMAN; BRAUN; ZHANG, 2012; TAN, 2014)

Estes mecanismos de ação foram descritos através de modelos matemáticos que simulam o processo de secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, tais modelos utilizam equações diferenciais baseadas no modelo de Hodgkin-Huxley para neurônios.

Os conceitos de auto-organização e complexidade têm sido objeto de estudos em diversos ramos da ciência e relacionados a uma ampla gama de campos, incluindo física, geologia, ciência dos materiais, biologia, matemática, economia e até sociologia

Muitos destes sistemas físicos apresentam distribuições sobre leis de potência que são características da teoria das transições de fase de segunda ordem perto de um ponto crítico (MAURO 2018).

Para verificar a existência das transições de fase nos sistemas é necessário entender o comportamento dos sistemas dinâmicos, como o processo de secreção de insulina, e uma forma útil para facilitar essa compreensão é utilizar os espaços de fase que permitem a representação das variáveis dinâmicas pertencentes a um sistema, onde cada trajetória contida no espaço de fase representa a evolução temporal do sistema determinada pela evolução de suas variáveis relevantes.

Neste trabalho de doutorado estamos interessados em realizar um estudo teórico-experimental sobre os possíveis efeitos de pulsos elétricos constantes de diferentes intensidades em células  $\beta$  pancreáticas e nas ilhotas de Langerhans.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1 O diabetes

A Federação Internacional de Diabetes (IDF, sigla em inglês) estima que cerca de 425 milhões de pessoas possuíam diabetes em 2017 sendo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma das 10 principais causas de mortes no mundo (IDF 2017; OMS 2017). Se mantido os padrões de crescimento atuais, em 2045 deverão haver 629 milhões de pessoas portadoras dessa desordem metabólica (IDF, 2017).

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença sistêmica que se caracteriza pela alteração na liberação de insulina através das células  $\beta$ -pancreáticas ou pela redução da absorção da glicose pelas células do organismo por deficiência no transportador de glicose GLUT 4, que são os mecanismos responsáveis pela alteração nos níveis de glicose no sangue (BRINKMAN, 2017; COSTABILE; SARNSAMAK; HAUGE-EVANS, 2018; CRAWFORD, 2017; D'ALEO et al., 2011; DANEMAN, 2006; PEDERSEN et al., 2013; RORSMAN et al., 2011).

O diabetes tipo 1 (DM1), que é uma doença crônica autoimune, em que as células  $\beta$ -pancreáticas são destruídas, deixando o indivíduo dependente de insulina exógena para controlar os níveis de glicose no sangue. O seu diagnóstico precoce é dado pela identificação da presença de auto anticorpos de células de ilhotas e da proteína tirosina fosfatase (ASHCROFT; RORSMAN, 2012; BRINKMAN, 2017; COLLI et al., 2010; CRAWFORD, 2017; PROF DANEMAN, 2006)

Diabetes tipo 2 (DM2) é a forma mais comum da doença, cerca de 90% dos casos é influenciada por fatores como estilo de vida, gravidez, idade e obesidade, também deve ser considerada uma forte predisposição genética (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017; PÉREZ-ARMENDARIZ, 2013) O DM2 é caracterizado pela hiperinsulinemia, resistência à insulina e num estado avançado a falência das células  $\beta$  pancreáticas, que perdem cerca de 50% de seu volume (ASHCROFT; RORSMAN, 2012; BUTLER et al., 2003; CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017; COSTABILE; SARNSAMAK; HAUGE-EVANS, 2018; CRAWFORD, 2017; D'ALEO et al., 2011; DEFRONZO, 2004; NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011; SCHOEPF et al., 2012).

## 2.2 Pâncreas endócrino

O pâncreas é um órgão que possui duas funções, a função exócrina através de células acinares que compõem 98% de sua massa e são responsáveis pela

síntese, armazenamento e secreção de enzimas digestivas (por exemplo, lipase pancreática e amilase, fosfolipase, nucleases) no duodeno (JOUVET; ESTALL, 2017; TAN, 2014) e a função endócrina do pâncreas, presente em cerca de 2% de sua massa, é realizada pelas ilhotas de Langerhans. Estas ilhotas possuem ao menos cinco tipos de células:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , PP e  $\epsilon$ . As células  $\alpha$  secretam como principal substância o glucagon, as células  $\beta$  estão em maior número nas ilhotas e secretam insulina, amilina e peptídeo C, as células  $\delta$  que representam uma pequena porção das ilhotas e secretam somatostatina e as células  $\epsilon$  que também se encontram em número reduzido secretam grelina. As células PP secretam o polipeptídeo pancreático, que atua na auto regulação da função endócrina do pâncreas (CADE; HANISON, 2017; JOUVET; ESTALL, 2017; TAN, 2014).

A insulina é um polipeptídeo que consiste de duas cadeias peptídicas, A e B, ligadas por duas pontes de dissulfeto. É sintetizado como pré-pró-insulina, um precursor da insulina. A pré-pró-insulina é clivada no retículo endoplasmático para formar pró-insulina, clivada no aparelho de Golgi para formar insulina e peptídeo-C (Figura 1). Estes compostos são armazenados em grânulos no citoplasma da célula  $\beta$  e, posteriormente, secretados em função dos níveis de glicose no plasma (KUNT et al., 1999; TAN, 2014).

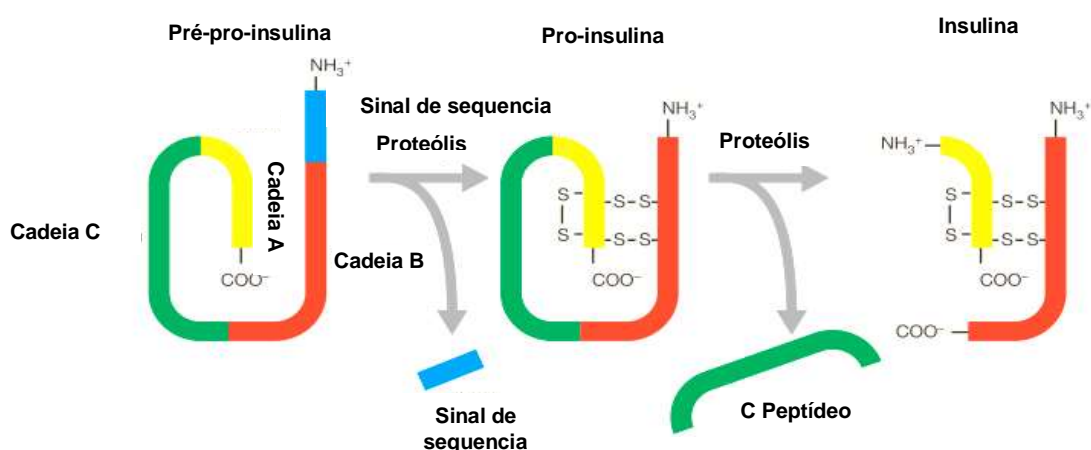


Figura 1: Síntese da insulina. Modificada de: CADE; HANISON, 2017

A secreção de insulina pelas células  $\beta$  tem papel fundamental na homeostase da glicose no sangue (JOUVET; ESTALL, 2017). O processo de secreção deste hormônio em indivíduos saudáveis inicia com a entrada da glicose nas células  $\beta$  através dos transportadores de glicose (GLUT2), após a entrada, a glicose sofre

fosforilação pela enzima glicoquinase (limitadora do metabolismo da glicose) gerando glicose-6-fosfato, que ao ser metabolizado na glicólise promove a formação de alta quantidade de Adenosina Trifostato (ATP). Os canais de potássio ( $K^+$ ) sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) são fechados na presença desse alto nível de ATP citoplasmático, ocasionando a despolarização da membrana das células  $\beta$  e em decorrência disto ocorre a ativação de isoformas da fosfolipase C (PLC), que gera o inositol 1-4-5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 ativa os canais de cálcio do retículo endoplasmático promovendo assim o aumento desse íon no citosol, por sua vez o DAG tem o mesmo efeitos sobre os canais de cálcio sensíveis a voltagem localizados na membrana, permitindo assim a entrada desse vindo do meio extracelular. Também é função do DAG ativar as proteínas quinase C (PKC) que ativam os grânulos secretórios de insulina que juntamente com o  $Ca^{2+}$ , irão promover a ativação do sistema de deslocamento dos grânulos de insulina até a membrana plasmática, na qual ocorre sua exocitose e liberação de insulina e peptídeo C na corrente sanguínea (BERTRAM; SHERMAN; SATIN, 2010; CADE; HANISON, 2017; HABER et al., 2005; HELLMAN et al., 2012; JOUVET; ESTALL, 2017; RORSMAN; BRAUN; ZHANG, 2012; TAN, 2014).

Durante o processo de secreção de insulina (figura 2) os canais de potássio dependentes de voltagem são ativados e devido a despolarização da membrana, esses canais são responsáveis por controlar a repolarização da membrana das células  $\beta$ , pois sua abertura permite o efluxo de potássio e assim de forma lenta a membrana vai repolarizando, ocasionando o fechamento dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem que por sua vez interrompe a entrada deste íon cessando temporariamente a secreção de insulina (WANG et al., 2015; WEIR, 2016; YANG et al., 2014).



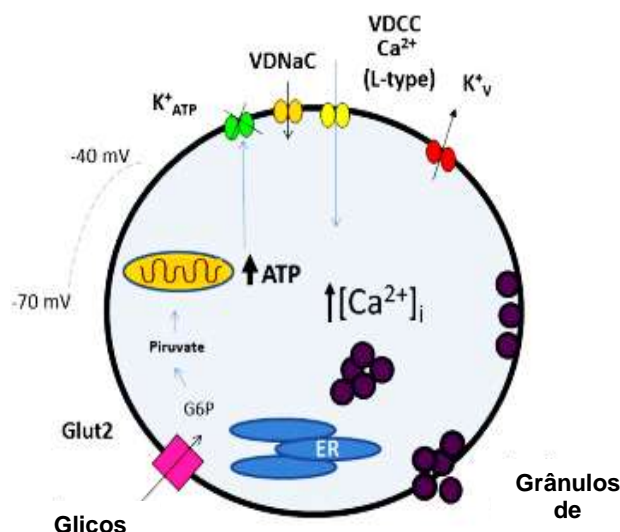


Figura 2: Processo de secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas em virtude da absorção de glicose pelas células. Modificado de Pérez-Armendariz, 2013.

## 2.3 Canais iônicos e secreção de insulina

O processo de secreção de insulina estimulada por glicose envolve a ativação de vários canais iônicos nas células  $\beta$  pancreáticas (FRIDLAND; JACOBSON; PHILIPSON, 2013). Dentre os principais canais que controlam o processo de secreção de insulina para controle da glicose no sangue podemos citar os canais de potássio sensível ao ATP ( $K_{ATP}$ ), os canais de potássio dependente de voltagem ( $K_v$ ) e os canais de cálcio dependente voltagem ( $Ca_v$ ) (ASHCROFT; RORSMAN, 1989; FRIDLAND; JACOBSON; PHILIPSON, 2013)

### 2.3.1 Canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ )

O  $K_{ATP}$  é amplamente encontrado em várias tecidos e células como o cérebro, coração, células  $\beta$  pancreáticas e os tecidos musculares esquelético e liso (LI et al., 2017; SEINO; MIKI, 2003). Nas células  $\beta$  pancreáticas a função do  $K_{ATP}$  está ligada ao início da secreção de insulina com a detecção indireta do aumento dos níveis de glicose no sangue, que promovem o aumento do ATP intracelular que irá provocar o fechamento desse canal e como consequência a despolarização da membrana das células  $\beta$ . Esta despolarização ativa os canais de cálcio dependentes de voltagem, e consequentemente, o conteúdo citoplasmático desse íon que é o indutor do processo da exocitose da insulina (ASHCROFT; RORSMAN, 1989; FLAGG et al., 2010; LI et al., 2017; SEINO; MIKI, 2003).

O canal KATP consiste em subunidades Kir6 formando os poros e receptores de sulfoniluréias (SUR) controlando a função do canal. O ATP inibe a ativação dos canais em Kir6.2, o Mg-ATP e difosfato de adenosina (ADP) ativam o canal através da subunidade SUR. Portanto, a concentração da relação do ATP / ADP intracelular determina a ativação do canal KATP. SUR é uma proteína, ATP-binding cassette, cujos subtipos (SUR1, SUR2A e SUR2B) são expressos nas células  $\beta$ -pancreáticas, músculo cardíaco, esquelético e liso. SUR1 está envolvido com a ligação de ATP nas células  $\beta$  do pâncreas, para bloquear os canais de KATP, que por sua vez induz a despolarização, assim, SUR1 desempenha um papel importante na secreção de insulina, controlando o potencial de membrana (FLAGG et al., 2010; FRIDLAND; JACOBSON; PHILIPSON, 2013; LI et al., 2017; NEVES, 2013; SEINO; MIKI, 2003).

### **2.3.2 Canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav)**

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (Cav) estão presentes em muitas estruturas celulares e tecidos tais como músculo esquelético, retina, neurônios e outros tecidos eletricamente excitáveis, coração, músculo liso, células sensoriais da orelha interna e células endócrinas como as  $\beta$  pancreáticas (SANDOVAL et al., 2017; ZUCCOTTI et al., 2011).

Os Cav são proteínas que atuam em resposta a uma despolarização sofrida pela membrana e sofrem uma alteração conformacional tornando-a permeável a  $\text{Ca}^{2+}$  e isso permite que o mesmo entre rapidamente no citoplasma, onde serve como um segundo mensageiro da sinalização elétrica iniciando diversas respostas celulares diferentes como liberação de neurotransmissores e hormônios, contração muscular e expressão gênica, entre muitos outros. (CATTERALL, 2011; SANDOVAL et al., 2017)

Os canais Cav são complexos de multi-subunidades formadas por subunidades distintas condutoras de íons  $\text{Cav}\alpha_1$ , que após a codificação do genoma humano foram reclassificadas em quatro subunidades  $\text{Cav}1.1$  a  $\text{Cav}1.4$  nos canais do tipo L que são encontrados em maior número nas células, ao mesmo tempo possuem subunidades auxiliares  $\text{Cav}\beta$ ,  $\text{Cav}\alpha_2$ ,  $\text{Cav}\delta$ , e, em alguns casos  $\text{Cav}\gamma$  (DOLPHIN, 2016; SANDOVAL et al., 2017; ZUCCOTTI et al., 2011)

A secreção de insulina é bifásica consistindo numa primeira fase (rápida) que envolve a secreção da insulina armazenada nas células  $\beta$  e possui duração em torno de 10 minutos, ocorre quando há um elevado do nível de glicose no plasma. A segunda fase (lenta) pode durar de 2h a 3h é iniciada se o alto nível de glicose persistir, neste caso a insulina recém formada é liberada afim de alcançar a homeostase da glicose sanguínea (CHEN et al., 2018; LIN et al., 2016).

Estes canais também possuem grande função no processo de secreção de insulina estimulada por glicose em sua primeira fase (rápida), pois promovem o aumento do cálcio intracelular e assim há a ligação com as os grânulos de insulina e posteriormente a secreção deste hormônio. Em indivíduos portadores do DM2 secreção de insulina da primeira fase é prejudicada, o que é uma característica para o diagnóstico precoce, enquanto a secreção de insulina de segunda fase se deteriora com a progressão da doença (DOLPHIN, 2016; LI; ZHANG, 2009).

### **2.3.3 Canais de potássio dependente voltagem ( $K_v$ )**

Os canais de potássio dependentes de voltagem ( $K_v$ ) são importantes reguladores da excitabilidade celular devido à sua influência no potencial de repouso da membrana e na frequência e duração potencial de ação. O  $K_v$  consiste em quatro subunidades idênticas, cada uma das quais compreende seis segmentos transmembrana S1-S6, estruturado como sensor modular de tensão (S1-S4) sendo S4 a região sensível à tensão caracterizada por múltiplas cargas positivas. O dobramento quaternário da proteína produz uma molécula a formação de poros em forma de anel, com os aminoácidos entre os segmentos S5 e S6. (WEIR, 2016; YANG et al., 2014)

Os canais  $K_v$  são ativados na fase inicial do potencial de ação e produzem uma corrente de  $K^+$  lenta, porém sustentada. Esta corrente lenta de potássio para o exterior da célula neutraliza a corrente rápida de  $Na^+$  para dentro da célula e repolariza a membrana plasmática celular trazendo o potencial de membrana de volta ao potencial de membrana em repouso. Esta repolarização fecha na célula os canais  $Ca_v$  e conseqüentemente, oclui a célula ao influxo de  $Ca^{2+}$ , sendo assim o canal retificador  $K_v$  funciona como um “freio” para secreção de insulina estimulada por glicose. (WEIR, 2016; YANG et al., 2014)

Muitos pesquisadores descrevem o mecanismo de secreção de insulina pelas células  $\beta$  com modelos matemáticos, que são importantes para o entendimento da dinâmica complexa das células  $\beta$ -pancreáticas. Tais modelos descrevem a atividade elétrica das células  $\beta$  utilizando as equações diferenciais do tipo Hodgkin-Huxley para descrever a cinética das principais correntes iônicas envolvidas com o potencial elétrico e sua regulação, e, portanto, com a secreção de insulina nas células  $\beta$ . (BENNINGER; PISTON, 2014; NEVES et al., 2014)

#### 2.4 Modelo de Bertram e a secreção de insulina

O modelo matemático para descrever as correntes iônicas envolvidas com o mecanismo de secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas foi o proposto por Bertram e colaboradores (BERTRAM et al., 2000, 2004, 2007; BERTRAM; SHERMAN; SATIN, 2010; PEDERSEN et al., 2013; WATTS et al., 2011) por ser um dos modelos mais utilizados atualmente. Na construção deste modelo, Bertram e colaboradores., (2000) usaram a técnica do *Dynamic clamp*, uma técnica que permite registrar a corrente nas células  $\beta$  pancreáticas utilizando um software que calcula a corrente em cada instante que deve ser injetada na célula para manter a condição de fixação de voltagem.

O modelo consiste num sistema de equações diferenciais construído a partir das correntes de membrana nas células  $\beta$  obtidas pela técnica de dynamic clamp. Neste modelo a simulação da atividade elétrica das células beta-pancreáticas é obtida a partir da resolução das equações diferenciais, descritas a seguir:

$$dV/dt = -(I_{Ca} + I_K + I_{S1} + I_{S2} + I_L)/C_m \quad (1)$$

onde  $dV/dt$  é a derivada do potencial no tempo e  $C_m$  é a capacitância da membrana.

As correntes de cálcio ( $I_{Ca}$ ), potássio ( $I_K$ ), de potássio ativado por cálcio ( $I_{KCa}$  ou  $I_{S1}$ ) e potássio ativado por ATP ( $I_{KATP}$  ou  $I_{S2}$ ) assim como a corrente de fuga  $I_L$  (leakage) são descritas pelas seguintes equações:

$$I_{Ca} = G_{Ca} m_{\infty}(V)(V - V_{Ca}) \quad (2)$$

$$I_K = G_K n(V - V_K) \quad (3)$$

$$I_{S1} = G_{S1} S_1(V - V_K) \quad (4)$$

$$I_{S2} = G_{S2} S_2 (V - V_K) \quad (5)$$

$$I_L = G_L (V - V_L) \quad (6)$$

Os parâmetros que representam as cinéticas dos canais de cálcio ( $m$ ), potássio dependente de voltagem ( $n$ ), potássio dependente de cálcio ( $s_1$ ) e potássio dependente de ATP ( $s_2$ ), são mostradas nas equações abaixo :

$$dn/dt = (n_\infty(V) - n) / \tau_n \quad (7)$$

$$ds_1/dt = (S_{1\infty}(V) - S_1) / \tau_{S1} \quad (8)$$

$$ds_2/dt = (S_{2\infty}(V) - S_2) / \tau_{S2} \quad (9)$$

No estado estacionário a cinética dessas partículas e a constante de tempo  $\tau_n$  são funções sigmóides para voltagem aplicada na membrana:

$$m_\infty(V) = 1 / \exp.[(-22 - V) / 7.5] \quad (10)$$

$$n_\infty(V) = 1 / \exp.[(-9 - V) / 10] \quad (11)$$

$$S_{1\infty}(V) = 1 / \exp.[(-40 - V) / 0.5] \quad (12)$$

$$S_{2\infty}(V) = 1 / \exp.[(-42 - V) / 0.4] \quad (13)$$

$$\tau_n(V) = 1 / \exp.[(V + 9) / 10] \quad (14)$$

Para simular nas equações acima os pulsos de voltagens externos aplicados, adicionamos à voltagem da membrana os valores dos pulsos constantes de voltagens.

Para resolver o sistema de equações descrito acima utilizamos o software XPPAUT versão 6.10 criado e modificado por ERMENTROUT (2002). O XPPAUT inicialmente carrega todas as equações com os seus parâmetros e condições iniciais. A seguir o sistema de equações foi resolvido usando-se a rotina cvide. O cvide é um pacote escrito em C usado para resolver numericamente o sistema de equações diferenciais com suas condições iniciais (COHEN S.D., HINDMARSH A.C., 1995). Na saída o programa permite traçar gráficos das diversas variáveis em estudo, possibilitando uma contínua observação de possíveis alterações dessas variáveis ao longo do tempo.

## **2.5 Efeitos de campos elétricos e magnéticos na secreção de insulina.**

Diversos resultados experimentais sugerem que a exposição a campos elétricos e magnéticos de baixa frequência afetam as funções celulares através de efeitos exercidos em proteínas intracelulares e de membrana, incluindo canais iônicos, receptores de membrana e enzimas (BARGER; DILLON, 2016; GRASSI et al., 2004; SALIPANTE; SHAPIRO; VLAHOVSKA, 2015).

Segundo LAITL-KOBIERSKA et al., (2002), a exposição de ratos a campos eletromagnéticos em longo prazo levou à síntese e aumento da secreção de insulina. PARAŠ et al., (2018) mostraram ocorrer um aumento significativo da secreção de insulina em ratos Wistar expostos a campos eletromagnéticos de alta frequência em relação ao grupo controle. Por outro lado, KHAKI; HEMMATI; NOBAHARI, (2015) ao expor ilhotas Langherans a campos eletromagnéticos de 50 Hz e 3 mT por seis semanas observaram uma redução do níveis séricos de insulina e redução significativa da área e perímetro das ilhotas em relação ao controle. CHEN et al., (2010) evidenciaram em seus estudos que a exposição a campos eletromagnéticos, para uma taxa média de absorção específica a radiação (SAR) de 0.04 mW/ml de plasma, produziu uma diminuição significativa da atividade da insulina em reduzir os níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos tipo I. Segundo os autores esta diminuição da afinidade da ligação entre a insulina e seu receptor deve envolver uma alteração da conformação do receptor de insulina causada pela exposição ao campo eletromagnético.

SAKURAI et al., (2004) verificou que a exposição de células das ilhotas pancreáticas ao campo magnético de frequência extremamente baixa (60 Hz e 5 mT) induz uma redução da secreção de insulina e alteração do influxo de cálcio. JOELLY et al. (1983) relatou que o conteúdo de íons de cálcio, o influxo desses íons e a secreção de insulina durante a estimulação de glicose foram reduzidas quando ilhotas isoladas de coelhos foram expostas a campos eletromagnéticos de baixa frequência. Portanto, os estudos avaliando a influência da exposição a campos elétricos e magnéticos em ilhotas pancreáticas ainda são escassos e controversos, sendo difícil comparar os estudos existentes por causa dos diferentes métodos de pesquisa utilizados.

## 2.6 Modelando o efeito do campo elétrico em células $\beta$

O modelo proposto por Bertram e colaboradores (2000), descrito anteriormente, foi adaptado por (NEVES et al., 2014) superpondo-se aos valores das voltagens de clamp uma onda de voltagem senoidal. Este novo parâmetro é um potencial elétrico senoidal proposto por Cain (1980) e aplicada ao modelo de Hodgkin e Huxley para estudar o efeito de campos elétricos na atividade do neurônio.

$$V_E = A \times \cos\omega t$$

Onde A é a amplitude da onda,  $\omega$  é igual a  $2\pi f$  e f é a frequência. Neste trabalho realizado a frequência usada foi de 60Hz com amplitude variando entre 0.5 e 4 mV. O novo parâmetro  $V_E$  atua como uma voltagem externa transmembrana aplicado nas células  $\beta$ -pancreáticas. Os resultados obtidos no referido trabalho *in silico* mostraram que a inserção de um campo elétrico nas equações de corrente causa alteração na formação dos burts que nos leva a crer que pode inibir ou aumentar a secreção de insulina dependente da amplitude da voltagem aplicada (NEVES et al., 2014)

A simulação da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas é realizada utilizando-se um conjunto de equações diferenciais em modelos matemáticos dinâmicos, portanto a utilização de métodos de análise de sistemas complexos se apresenta como uma boa maneira para tentar entender os resultados da solução de tais modelos.

## 2.7 Criticalidade

Os sistemas complexos geralmente estão à beira do caos, portanto ficam no limiar entre sistemas ordenados e caóticos, sendo assim é comum a presença de interações não lineares e loops de resposta frequentemente apresentando padrões de auto-organização. A auto-organização, criticalidade e complexidade têm sido objeto de estudos em diversos ramos da ciência e relacionados a uma ampla gama

de campos, incluindo física, geologia, ciência dos materiais, biologia, matemática, economia e até sociologia (CASTILHO PIQUEIRA, 2009; COTTA; SCHAEFER, 2017; MAURO et al., 2018).

Um dos primeiros modelos para descrever a criticalidade auto organizada foi o da avalanche em uma pilha de areia, proposto por Per Bak e colaboradores em 1987, visando explicar como comportamentos complexos na natureza podem surgir de origens relativamente simples. Para isto, Bak et. al. (1987) considerou uma pilha de areia onde os grãos individuais são lentamente polvilhados no seu topo. Na maioria das vezes, os grãos individuais apenas aumentam a pilha, no entanto, às vezes um único grão cria uma perturbação grande o suficiente para gerar um deslizamento da pilha. O tamanho do deslizamento de areia pode ser medido pelo número de grãos de areia envolvidos (LIU et al., 2012; MAURO et al., 2018).

Portanto nas pilhas de areia, cada deslizamento é causado por uma perturbação induzida por poucos grãos de areia, mas todos eles têm a mesma causa fundamental independente de seu tamanho pois, todos os eventos críticos têm uma origem subjacente comum chamada de ponto crítico. O termo “auto organizado” é usado porque o mesmo comportamento surge em diferentes escalas e são independentes das variações nos parâmetros individuais do experimento ou do modelo (MAURO et al., 2018).

Uma maneira de investigar a criticalidade de um sistema é o uso do espaço de fase, que é a representação das variáveis dinâmicas pertencentes a um sistema, no qual cada trajetória contida nesse espaço de fase representa a evolução temporal do sistema. Um espaço de fase ou plano de fase refere-se a um mapa de estados ou variáveis de equações diferenciais de um modelo dinâmico matemático, traçados um em função do outro. A análise de espaço de fase é usada a muitos anos para analisar diferentes problemas complexos, incluindo o comportamento “caótico” ou “turbulento” (DEGHAN-NIRI; AL-BEER, 2018).

Os espaços de fase possuem características simétricas, perturbações nessa simetria implicam em alterações no espaço de fase chamadas de transição de fase que representam uma mudança abrupta no comportamento do sistema. Tais transições são geradas pela presença de um ponto crítico que informa o instante que a transição ocorreu (LONGO E MONTÉVIL, 2013).



Em nossos experimentos *in silico* foi mostrada a existência de um ponto crítico para uma voltagem externa de 2,16 mV aplicada em células beta pancreáticas, e que tem como efeito mudar o espaço de fase através de uma transição de fase de segunda ordem, caracterizada pela mudança abrupta na simetria do espaço (RAMAYO; SILVA; NOGUEIRA,2018).

Os experimentos *in silico* realizados nesse trabalho abre a perspectiva para o uso alternativo de campos elétricos de baixas intensidades no tratamento da DM2.

### **3 OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo geral

Investigar *in silico* os possíveis efeitos da aplicação de pulsos elétricos de baixas voltagens em células  $\beta$  pancreáticas e desenvolver um sistema experimental, baseado em Arduino, para aplicação de pulsos de baixas voltagens em ilhotas de Langerhans de ratos *in vitro*.

### 3.2 Objetivos específicos

- Descrever usando um modelo teórico, adaptado a partir daquele proposto por Bertram e colaboradores (2000), o comportamento elétrico das células  $\beta$ -pancreáticas em resposta a pulso constantes de baixas voltagens.
- Construir um gerador de função programável específico para aplicar pulsos de baixa voltagem em ilhotas de Langerhans de ratos.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 54, n. 2, p. 87–143, 1989.
- ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the  $\beta$  cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160–71, 16 mar. 2012.
- BADAMASI, Y. A. **The working principle of an Arduino**. 2014 11th International Conference on Electronics, Computer and Computation (ICECCO). **Anais...IEEE**, set. 2014
- BARG, S. et al. Fast exocytosis with few  $\text{Ca}^{2+}$  channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 6, p. 3308–3323, 2001.
- BARGER, J. P.; DILLON, P. F. Near-membrane electric field calcium ion dehydration. **Cell Calcium**, v. 60, n. 6, p. 415–422, 2016.
- BENNINGER, R. K. P.; PISTON, D. W. Cellular communication and heterogeneity in pancreatic islet insulin secretion dynamics. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 8, p. 399–406, 2014.
- BERTRAM, R. et al. The phantom burster model for pancreatic beta-cells. **Biophysical journal**, v. 79, n. 6, p. 2880–92, dez. 2000.
- BERTRAM, R. et al. Calcium and glycolysis mediate multiple bursting modes in pancreatic islets. **Biophysical journal**, v. 87, n. 5, p. 3074–87, nov. 2004.
- BERTRAM, R. et al. Interaction of glycolysis and mitochondrial respiration in metabolic oscillations of pancreatic islets. **Biophysical journal**, v. 92, n. 5, p. 1544–55, 1 mar. 2007.
- BERTRAM, R.; RHOADS, J.; CIMBORA, W. P. A phantom bursting mechanism for episodic bursting. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 70, n. 7, p. 1979–1993, 2008.
- BERTRAM, R.; SHERMAN, A.; SATIN, L. S. Electrical bursting, calcium oscillations, and synchronization of pancreatic islets. **Adv Exp Med Biol**, n. 10, p. 261–279, 2010.
- BRINKMAN, A. K. Management of Type 1 Diabetes. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 4, p. 499–511, 2017.
- BUTLER, A. E. et al. Humans With Type 2 Diabetes. v. 52, n. January, 2003.
- CADE, J. E.; HANISON, J. The pancreas. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 18, n. 10, p. 527–531, 2017.
- CASTILHO PIQUEIRA, J. R. A mathematical view of biological complexity. **Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation**, v. 14, n. 6, p. 2581–2586, 2009.
- CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 8, p. a003947–a003947, 1 ago. 2011.
- CHA, C. Y.; POWELL, T.; NOMA, A. Analyzing electrical activities of pancreatic ?? cells using mathematical models. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 107, n. 2, p. 265–273, 2011.
- CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 389, n. 10085, p. 2239–2251, 2017.

- CHEN, Y. BIN et al. The effects of electromagnetic pulses (EMP) on the bioactivity of insulin and a preliminary study of mechanism. **International Journal of Radiation Biology**, v. 86, n. 1, p. 22–26, 13 jan. 2010.
- CHEN, S. H. et al. The Relationships Between Hemoglobin and Diabetes Factors (Insulin Resistance, Glucose Effectiveness, First- and Second-Phase Insulin Secretion) in Old Chinese. **International Journal of Gerontology**, 2018.
- COHEN S.D., HINDMARSH A.C. **CVODE, A STIFF/NONSTIFF ODE SOLVER IN C**. Disponível em: <<https://computation.llnl.gov/casc/nsde/pubs/u121014.pdf>>. Acesso em: 5 dez. 2017.
- COLLI, M. L. et al. MDA5 and PTPN2, two candidate genes for type 1 diabetes, modify pancreatic beta-cell responses to the viral by-product double-stranded RNA. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 1, p. 135–46, 1 jan. 2010.
- COSTABILE, A.; SARNSAMAK, K.; HAUGE-EVANS, A. C. Coffee, type 2 diabetes and pancreatic islet function – A mini-review. **Journal of Functional Foods**, v. 45, n. January, p. 409–416, 2018.
- COTTA, C.; SCHAEFER, R. Bioinspired algorithms and complex systems. **Journal of Computational Science**, v. 23, p. 192–194, 2017.
- CRAWFORD, K. Review of 2017 Diabetes Standards of Care. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 4, p. 621–663, 2017.
- D’ALEO, V. et al. Direct effects of rapid-acting insulin analogues on insulin signaling in human pancreatic islets in vitro. **Diabetes and Metabolism**, v. 37, n. 4, p. 324–329, 2011.
- D’AUSILIO, A. Arduino: a low-cost multipurpose lab equipment. **Behavior research methods**, v. 44, n. 2, p. 305–13, jun. 2012.
- DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847–858, 2006.
- DAVÌ, G.; VAZZANA, N.; SESTILI, S. Variability in the response to antiplatelet treatment in diabetes mellitus. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 98, n. 3–4, p. 48–55, 2012.
- DEAN, B. Y. P. M.; MATTHEWS, E. K. MATTHEWS From. p. 265–275, 1970.
- DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Medical Clinics of North America**, v. 88, n. 4, p. 787–835, 2004.
- DEHGHAN-NIRI, E.; AL-BEER, H. Phase-space topography characterization of nonlinear ultrasound waveforms. **Ultrasonics**, v. 84, p. 446–458, 2018.
- DOLPHIN, A. C. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 19, p. 5369–5390, 2016.
- ERMENTROUT, B. **Simulating, Analyzing, and Animating Dynamical Systems**. [s.l.] Society for Industrial and Applied Mathematics, 2002.
- FARASHI, S.; SASANPOUR, P.; RAFII-TABAR, H. Interaction of Low Frequency External Electric Fields and Pancreatic  $\beta$ -Cell: A Mathematical Modeling Approach to Identify the Influence of Excitation Parameters. **International Journal of Radiation Biology**, v. 0, n. 0, p. 1–33, 2018.

FÉLIX-MARTÍNEZ, G. J.; 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**, v. 270, p. 66–80, 2015.

FLAGG, T. P. et al. Muscle KATP Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 799–829, 2010.

FRIDLYAND, L. E.; JACOBSON, D. A.; PHILIPSON, L. H. Ion channels and regulation of insulin secretion in human  $\beta$ -cells: A computational systems analysis. **Islets**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2013.

FRIDLYAND, L. E.; TAMARINA, N.; PHILIPSON, L. H. Bursting and calcium oscillations in pancreatic beta-cells: specific pacemakers for specific mechanisms. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 299, n. 4, p. E517-32, 1 out. 2010.

GAO, J. et al. Inhibition of voltage-gated potassium channels mediates uncarboxylated osteocalcin-regulated insulin secretion in rat pancreatic  $\beta$  cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 777, p. 41–48, 2016.

GASTALDELLI, A. Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 93, n. SUPPL. 1, p. S60–S65, 2011.

GONZÁLEZ, R. E. R.; DA SILVA, J. R. F.; ALBUQUERQUE NOGUEIRA, R. Effects of External Voltage in the Dynamics of Pancreatic  $\beta$ -Cells: Implications for the Treatment of Diabetes. In: **Bioinformatics and Biomedical Engineering**. [s.l.] Springer, Cham, 2018. v. 10813p. 57–70.

GRASSI, C. et al. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. **Cell calcium**, v. 35, n. 4, p. 307–15, abr. 2004.

HABER, E. P. et al. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219–227, 2005.

HELLMAN, B. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Isolated mouse islets respond to glucose with an initial peak of glucagon release followed by pulses of insulin and somatostatin in antisynchrony with glucagon. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, n. 4, p. 1219–1223, 2012.

JIAOJIAO, Y. et al. Applying emerging technologies to improve diabetes treatment. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, n. September, p. 1225–1236, 2018.

JOLLEY, W. B. et al. Magnetic field effects on calcium efflux and insulin secretion in isolated rabbit islets of Langerhans. **Bioelectromagnetics**, v. 4, n. 1, p. 103–106, 1983.

JOUVET, N.; ESTALL, J. L. The pancreas: Bandmaster of glucose homeostasis. **Experimental Cell Research**, v. 360, n. 1, p. 19–23, 2017.

KHAKI, A. A.; HEMMATI, A. A.; NOBAHARI, R. A Study of the Effects of Electromagnetic Field on Islets of Langerhans and Insulin Release in Rats. **Crescent Journal of Medical and Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2015.

KOENKA, I. J.; SÁIZ, J.; HAUSER, P. C. Instrumentino: An open-source modular

- Python framework for controlling Arduino based experimental instruments. **Computer Physics Communications**, v. 185, n. 10, p. 2724–2729, out. 2014.
- KUNT, T. et al. The physiological impact of proinsulin C-peptide. **Pathophysiology**, v. 5, n. 4, p. 257–262, 1999.
- LAITL-KOBIERSKA, A. et al. Influence of alternating extremely low frequency ELF magnetic field on structure and function of pancreas in rats. **Bioelectromagnetics**, v. 23, n. 1, p. 49–58, jan. 2002.
- LANG, C. H. et al. Alterations in glucose kinetics induced by pentobarbital anesthesia. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 253, n. 6, p. E657-663, 1 dez. 1987.
- LI, D.-S. et al. A protocol for islet isolation from mouse pancreas. **Nature Protocols**, v. 4, n. 11, p. 1649–1652, 2009.
- LI, F.; ZHANG, Z.-M. Comparative identification of Ca<sup>2+</sup> channel expression in INS-1 and rat pancreatic beta cells. **World journal of gastroenterology**, v. 15, n. 24, p. 3046–50, 2009.
- LI, N. et al. Structure of a Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channel. **Cell**, v. 168, n. 1–2, p. 101- 110.e10, 2017.
- LIN, J. D. et al. Comparison of Second-Phase Insulin Secretion Derived from Standard and Modified Low-Dose Graded Glucose Infusion Tests. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 40, n. 6, p. 529–534, 2016.
- LIU, Y. T. et al. Self-organized criticality and learning a new coordination task. **Human Movement Science**, v. 31, n. 1, p. 40–54, 2012.
- MAURO, J. C. et al. Workplace accidents and self-organized criticality. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 506, p. 284–289, 2018.
- NEVES, G. F. **Análise teórica do efeito de campo eletromagnético de 60 Hz na atividade elétrica das células  $\beta$ -pancreáticas**. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2013.
- NEVES, G. F. et al. 60 Hz electric field changes the membrane potential during burst phase in pancreatic  $\beta$ -cells: in silico analysis. **Acta biotheoretica**, v. 62, n. 2, p. 133–43, jun. 2014.
- NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. **The Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169–181, 2011.
- PARAŠ, S. D. et al. Impact of High-Frequency Electromagnetic Fields on Secretion and Structure of Pancreas in Rats. In: [s.l.: s.n.]. v. 65p. 711–714.
- PEARCE, J. M. Building Research Equipment with Free, Open-Source Hardware. **Science**, v. 337, n. 6100, p. 1303–1304, 2012.
- PEDERSEN, M. G. Phantom bursting is highly sensitive to noise and unlikely to account for slow bursting in  $\beta$ -cells: Considerations in favor of metabolically driven oscillations. **Journal of Theoretical Biology**, v. 248, n. 2, p. 391–400, 2007.
- PEDERSEN, M. G. et al. Complex patterns of metabolic and Ca<sup>2+</sup> entrainment in pancreatic islets by oscillatory glucose. **Biophysical journal**, v. 105, n. 1, p. 29–39, 2



jul. 2013.

PENICAUD, L. et al. Effect of anesthesia on glucose production and utilization in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 252, n. 3, p. E365-369, 1 mar. 1987.

PÉREZ-ARMENDARIZ, E. M. Connexin 36, a key element in pancreatic beta cell function. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 557–566, 2013.

PROF DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847–858, 2006.

RIZ, M.; BRAUN, M.; PEDERSEN, M. G. Mathematical Modeling of Heterogeneous Electrophysiological Responses in Human  $\beta$ -Cells. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 1, 2014.

RORSMAN, P. et al. Electrophysiology of pancreatic  $\beta$ -cells in intact mouse islets of Langerhans. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 107, n. 2, p. 224–35, nov. 2011.

RORSMAN, P.; ASHCROFT, F. M. Pancreatic  $\beta$ -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 117–214, jan. 2018.

RORSMAN, P.; BRAUN, M.; ZHANG, Q. Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease. **Cell calcium**, v. 51, n. 3–4, p. 300–8, 2012.

SAKURAI, T. et al. An extremely low frequency magnetic field attenuates insulin secretion from the insulinoma cell line, RIN-m. **Bioelectromagnetics**, v. 25, n. 3, p. 160–166, abr. 2004.

SALIPANTE, P. F.; SHAPIRO, M. L.; VLAHOVSKA, P. M. Electric field induced deformations of biomimetic fluid membranes. **Procedia IUTAM**, v. 16, p. 60–69, 2015.

SANDERS, J. I.; KEPECS, A. A low-cost programmable pulse generator for physiology and behavior. **Frontiers in Neuroengineering**, v. 7, n. December, p. 1–8, 2014.

SANDOVAL, A. et al. Regulation of L-type CaV1.3 channel activity and insulin secretion by the cGMP-PKG signaling pathway. **Cell Calcium**, v. 66, p. 1–9, 2017.

SCHOEPF, D. et al. Type-2 diabetes mellitus in schizophrenia: increased prevalence and major risk factor of excess mortality in a naturalistic 7-year follow-up. **European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists**, v. 27, n. 1, p. 33–42, jan. 2012.

SEINO, S.; MIKI, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 81, n. 2, p. 133–176, 2003.

SHEIK ABDULAZEEZ, S. Diabetes treatment: A rapid review of the current and future scope of stem cell research. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 4, p. 333–340, 2013.

SHERMAN, A. Lessons from models of pancreatic beta cells for engineering glucose-sensing cells. **Mathematical Biosciences**, v. 227, n. 1, p. 12–19, 2010.

TAN, G. D. The pancreas. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 15, n. 10,

p. 485–488, 2014.

WANG, Y. W. et al. Inhibitory effects of imperatorin on voltage-gated K<sup>+</sup>channels and ATP-sensitive K<sup>+</sup>channels. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 1, p. 134–139, 2015.

WATTS, M. et al. Slow variable dominance and phase resetting in phantom bursting. **Journal of theoretical biology**, v. 276, n. 1, p. 218–28, 7 maio 2011.

WEIR, C. J. Ion channels, receptors, agonists and antagonists. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 17, n. 12, p. 645–651, 2016.

YANG, S.-N. et al. Ionic mechanisms in pancreatic  $\beta$  cell signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 21, p. 4149–4177, 2014.

ZADOROSNY, R. et al. Fenomenologia da Supercondutividade e Supercondutores Mesoscópicos. p. 1–12, 2015.

ZHAO, Y. et al. Microcystin-LR induces dysfunction of insulin secretion in rat insulinoma (INS-1) cells: Implications for diabetes mellitus. **Journal of Hazardous Materials**, v. 314, p. 11–21, 2016.

ZUCCOTTI, A. et al. Structural and functional differences between L-type calcium channels: Crucial issues for future selective targeting. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 6, p. 366–375, 2011.

**5 CAPÍTULO 1: EFFECTS OF EXTERNAL VOLTAGE IN THE DYNAMICS OF PANCREATIC B-CELLS: IMPLICATIONS IN THE TREATMENT OF DIABETES.**



**Challenges and Advances in Measurement and Self-Parametrization of Complex Biological Systems**

**Effects of External Voltage in the Dynamics of Pancreatic  $\beta$ -Cells: Implications for the Treatment of Diabetes**

*Ramón E.R. González, José Radamés Ferreira da Silva and Romildo Albuquerque Nogueira*

LNBI 10813, p. 57 ff.

Publicação realizada no periódico bioinformatics and biomedical engineering em abril de 2018.

## Effects of external voltage in the dynamics of pancreatic $\beta$ -cells: implications in the treatment of diabetes.

Ramón E. R. González<sup>1</sup>, José R. F. da Silva and Romildo A. Nogueira<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Sistemas Complexos e Universalidades. Departamento de Física, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC). Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

\* Author to whom correspondence should be addressed: e-mail: ran.pe@terra.com.br

### HIGHLIGHTS.

Computational simulations were used to study the pattern of the burst in pancreatic  $\beta$  cells in response to constant voltage pulses.

Stimulation with low amplitude voltage pulses leads to changes in the pattern of the burst in pancreatic  $\beta$  cells.

Criticality can be observed in the burst patterns for two voltage pulse values, 2.16 mV and 3.5 mV.

**Abstract.** The influence of exposure to electric and magnetic fields in pancreatic islets are still scarce and controversial, and it is difficult to conduct a comparison of existing studies due to the different research methods employed. Here, computational simulations were used to study the burst patterns in pancreatic  $\beta$  cell exposure to constant voltage pulses. Results show that burst patterns in pancreatic  $\beta$  cells are dependent on the applied voltage and that some voltages may even inhibit this phenomenon. There are critical voltages, such as 2.16 mV, in which the burst change from a medium oscillation to a slow oscillation phase or 3.5 mV that induces transition in the burst from slow to fast oscillation phase. Voltage pulse higher than 3.5 mV leads to the extinction of bursts and, therefore, inhibits the process of insulin secretion. These results are reinforced by phase plane analysis.

**Keywords:** computational simulations, pancreatic  $\beta$ -Cells, electrical activity, burst patterns, voltage pulses, phase plane.

### Introduction

The endocrine pancreas is a key regulator of glucose homeostasis. Secreting insulin through the pancreatic  $\beta$ -cells in response to high levels of blood glucose controls the glucose concentrations of healthy individuals (BERTRAM et al., 2000; BERTRAM; RHOADS; CIMBORA, 2008; PEDERSEN, 2007). Pancreatic  $\beta$ -cells are insulin-secreting cells located in the islets of Langerhans. When insufficient insulin is released in order to preserve normal levels of blood glucose (D'ALEO et al., 2011), a systemic disease is thus established, called diabetes mellitus (DM). Diabetes manifests itself in two ways, types 1 and 2. Type 1 diabetes

(T1D) is a chronic autoimmune disease in which pancreatic  $\beta$  cells are destroyed, and patients with this form of the disease require exogenous insulin to normalize the levels of blood glucose (ASHCROFT; RORSMAN, 2012; COLLI et al., 2010; RORSMAN et al., 2011). Type 2 diabetes (T2DM) is characterized by a progressive decline in  $\beta$ -cell function, which occurs because the ATP-dependent potassium channel no longer responds to the presence of this molecule. As a result, the pancreatic  $\beta$ -cells do not depolarize sufficiently to induce insulin secretion (GAO et al., 2016; ZHAO et al., 2016).

To control the sugar content in blood, characteristic changes take place in the electrical properties of the  $\beta$ -cell membranes induced by glucose, such as depolarization, in which the membrane of these cells presents voltage bursts, indicating a marked change in membrane permeability to various ions (FRIDLAND; TAMARINA; PHILIPSON, 2010). Bursting consists of an active phase of the plasma membrane, with voltages of between -60mV and -25mV, followed by silent

phases. The bursting process is repeated after each silent period when the  $\beta$ -cell reaches the threshold of excitability (FRIDLAND; TAMARINA; PHILIPSON, 2010; SHERMAN, 2010). Bursting events are generated by fast and slow gating mechanisms that control the membrane potential in this cell type.

Some researchers have described the mechanism of insulin secretion in  $\beta$ -cells with mathematical models, which are important for understanding the complex dynamics of these cells (FÉLIX-MARTÍNEZ; GODÍNEZ-FERNÁNDEZ, 2015; RIZ; BRAUN; PEDERSEN, 2014). These models describe the voltage variation in the pancreatic  $\beta$ -cell membrane, using a similar Hodgkin-Huxley model (Hodgkin and Huxley, 1990) to describe the kinetics of the primary ion currents involved in the phenomenon of insulin secretion and its regulation (BENNINGER; PISTON, 2014; NEVES et al., 2014). Bertram et al. (BERTRAM; SHERMAN; SATIN, 2010) using the dynamic clamp technique, developed a model to describe the formation of bursts using variables that have produced bursts of varying duration and amplitudes, such as those observed in pancreatic  $\beta$  cells.

Experimental studies suggest that exposure to low-frequency electrical and magnetic fields affect cellular function through the effects exerted onto intracellular and membrane proteins, including ion channels, membrane receptors and enzymes

(GRASSI et al., 2004). One example of this has been the exposure of rats to electromagnetic fields, which in the long term lead to the synthesis and increase in insulin secretion (LAITL-KOBIERSKA et al., 2002). Exposure of pancreatic islet cells to an extremely low frequency magnetic field induces a reduction in insulin secretion and a change in calcium uptake (SAKURAI et al., 2004). It is known that the contents of calcium ions and their flow and insulin secretion during stimulation by the presence of glucose are reduced when isolated islets of rabbits have been exposed to low-frequency electromagnetic fields (JOLLEY et al., 1983). However, studies examining the influence of exposure to electric and magnetic fields in pancreatic islets are still scarce and controversial, and it is difficult to conduct a comparison of existing studies due to the different research methods employed.

Our research group (NEVES et al., 2014) adapted the mathematical model proposed by Bertram et al. (BERTRAM; SHERMAN; SATIN, 2010) by inserting a sinusoidal voltage of 60 Hz with an amplitude range of between 0.5 and 4mV into the equations modelling electrical activity in pancreatic  $\beta$ -cells. The computer simulation of the Bertram et al (BERTRAM; SHERMAN; SATIN, 2010) model with the insertion of the sinusoidal voltage in the current equation (NEVES et al., 2014) can both decrease and increase the duration of the bursts, dependent on the amplitude of the applied external current. The interest of the present study is to investigate the sensitivity of the dynamics involved in the bursting process of pancreatic  $\beta$ -cells stimulated by constant voltage pulses with low amplitudes aiming find application of this experimental protocol in the treatment of diabetes.

## **Metodology**

### **Simulation of the electrical activity of pancreatic $\beta$ -cells.**

In order to simulate the effects of constant voltage pulses on the electrical activity of pancreatic  $\beta$ cells we introduced constant voltage pulses into the model proposed by Bertram et al. (BERTRAM; SHERMAN; SATIN, 2010). These model is able to simulate all three types of bursting encountered in  $\beta$  cells: fast (< 10 s), medium (10 - 60 s) and slow (> 60 s). We selected the average burst because this is the most common pattern encountered in these cells.

Simulation of the electrical activity of pancreatic  $\beta$ -cells was performed through solutions of the differential equations, described in Bertram et al. (BERTRAM; SHERMAN; SATIN, 2010) and showed below:

$$\frac{dV}{dt} = - \frac{(I_{Ca} + I_K + I_{S_1} + I_{S_2} + I_L)}{C_m} \quad (1)$$

Where  $\frac{dV}{dt}$  is the derivative of the membrane potential in time and  $C_m$  is the capacitance of the membrane. The currents are represented by  $I_{Ca}$  (calcium),  $I_K$  (potassium),  $I_{S_1}$  or  $I_{KCa}$  (calcium-activated potassium),  $I_{S_2}$  or  $I_{KATP}$  (ATP-activated potassium) and  $I_L$  (leakage). The currents are represented by:

$$I_{Ca} = G_{Ca} m_{\infty}(V)(V - V_{Ca} + V_E) \quad (2)$$

$$I_K = G_K n(V - V_K + V_E) \quad (3)$$

$$I_{S_1} = G_{S_1} S_1(V - V_K + V_E) \quad (4)$$

$$I_{S_2} = G_{S_2} S_2(V - V_K + V_E) \quad (5)$$

$$I_L = G_L(V - V_L + V_E) \quad (6)$$

The  $G$ 's are the conductances for the calcium, potassium, calcium-activated potassium and ATP-activated potassium ions, respectively, as well as the conductance for the leakage current.  $V = V(t)$  is the voltage through the membrane along the time,  $V_{Ca}$ ,  $V_K$  and  $V_L$  are the reversal potential to calcium, potassium and leakage and  $V_E$  is the external voltage applied.

The dynamics of the gating particles are represented by the following differential equations:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{(n_{\infty}(V) - n)}{\tau_n} \quad (7)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{(S_{1\infty}(V) - S_1)}{\tau_{S_1}} \quad (8)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{(S_{2\infty}(V) - S_2)}{\tau_{S_2}} \quad (9)$$

The gating particles  $m, n, S_1$  and  $S_2$  respectively control the kinetics of the calcium, the voltage-dependent potassium, the calcium-dependent potassium and the ATP-dependent potassium channels. The activation curves at the steady state for the gating particles and the time constant  $\tau_n$  are sigmoid functions for the voltage applied to the membrane, as presented in the equations below:

$$m_{\infty}(V) = \frac{1}{1+e^{((-22-V)/7.5)}} \quad (10)$$

$$n_{\infty}(V) = \frac{1}{1+e^{((-9-V)/10)}} \quad (11)$$

$$S_{1\infty}(V) = \frac{1}{1+e^{((-40-V)/0.5)}} \quad (12)$$

$$S_{2\infty}(V) = \frac{1}{1+e^{((-42-V)/0.4)}} \quad (13)$$

$$\tau_n(V) = \frac{1}{1+e^{((V+9)/10)}} \quad (14)$$

The parameters and values used in the simulation of the electrical activity of pancreatic  $\beta$  cells are presented in Table 1.

**Table 1.** Parameter values used in the simulation of the electrical activity of pancreatic  $\beta$  cells.

Values	Parameters
4524 fF	Membrane capacitance ( $C_m$ )
280 pS	Conductance of the fast $Ca^{2+}$ channel ( $G_{Ca}$ )
1300 pS	Conductance of the fast $K^+$ channel ( $G_K$ )
25 pS	Conductance Leakage current ( $G_L$ )
7 pS	Conductance of the slow $K^+$ channel ( $G_{S1}$ )
32 pS	Conductance of the very slow $K^+$ channel ( $G_{S2}$ )
100 mV	Reversal Potential of $Ca^{2+}$ ( $V_{Ca}$ )
-80 mV	Reversal Potential of $K^+$ ( $V_K$ )
-40 mV	Reversal Potential of leakage ( $V_L$ )
1 s	Time constant of $S_1$ ( $\tau_{S1}$ )
2 min	Time constant of $S_2$ ( $\tau_{S2}$ )

The values of the initial conditions used were:  $V = -43$  mV,  $n = 0.03$ ,  $S_1 = 0.1$ ,  $S_2 = 0.434$  (SHEIK ABDULAZEEZ, 2013),  $G_{S1} = 7$  pS and the integration time was equal to 600s. To simulate the applied external voltage pulses in the equations above, the values of the constant pulse voltages were added to the voltage of the membrane.

### Computational routine and statistical analysis

In order to solve the above mentioned system of equations, we used XPPAUT (ERMENTROUT, 2002). Initially, XPPAUT loads all the equations with their parameters and initial conditions. After this, the system of equations is solved using the CVODE routine. The CVODE is a package written in C used to numerically solve

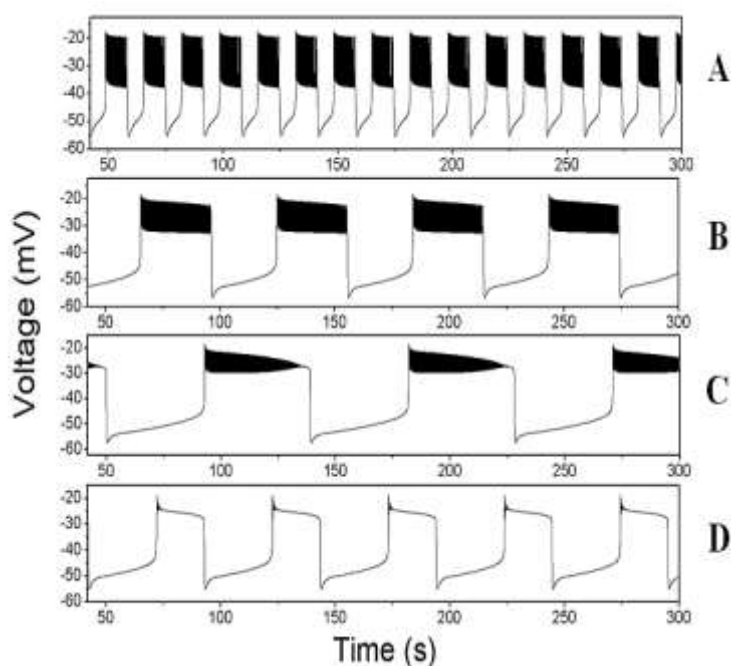


the system of differential equations with their initial conditions (COHEN S.D., HINDMARSH A.C., 1995) The program is able to output graphs of different variables in the study, thus enabling the continuous observation of possible changes in these variables over time. We used the ANOVA statistical test and the post-hoc Tukey test whenever necessary, at a significance level of 5%.

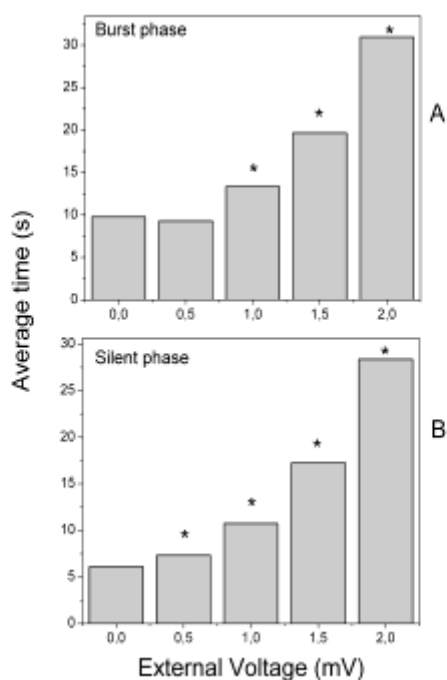
## Results

### Simulations.

The simulation of the Bertram et al. (BERTRAM; SHERMAN; SATIN, 2010) model modified by inserting constant low amplitude external voltage pulses in the current equations revealed that the pulses may change the behaviour of both the burst and the silent period. Figures 1A and 1B demonstrate that the voltage pulses of amplitudes ranging between 0.5 and 2.5mV increase the duration of the bursts and the silent periods in comparison to the control. Voltage values higher than 2mV changed profile of the electrical activity of pancreatic  $\beta$  cells (Fig. 1C) and values of 3.5mV and over inhibited the electrical activity in pancreatic  $\beta$  cells (Fig. 1D). The duration of the bursts for voltage pulse with amplitudes equal to 1, 1.5 and 2.0mV were significantly different from the control, although pulse of 0.5mV did not significantly alter the duration of the burst (Fig. 2). Figure 2B demonstrates that the durations of the silent periods are significantly different from the control (0 mV) for all values of voltage pulse amplitudes between 0.5 and 2.0 mV.



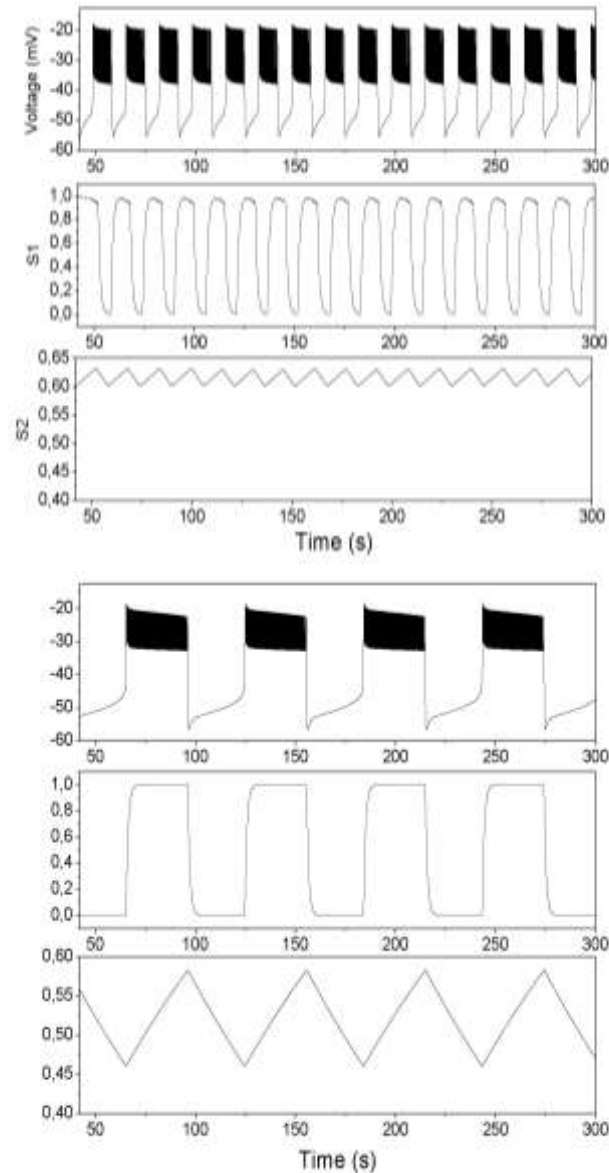
**Fig. 1.** Simulation of the electrical activity of pancreatic  $\beta$  cells. A-control, B-voltage pulse of 2mV C-voltage pulse of 2.5mV and D-voltage pulse of 3.5mV.



**Fig. 2.** Duration of burst (A) and silent phase (B) at different values of voltage pulses (0.5-2mV). Significant statistical difference in relation to the control (0 mV) (\*).

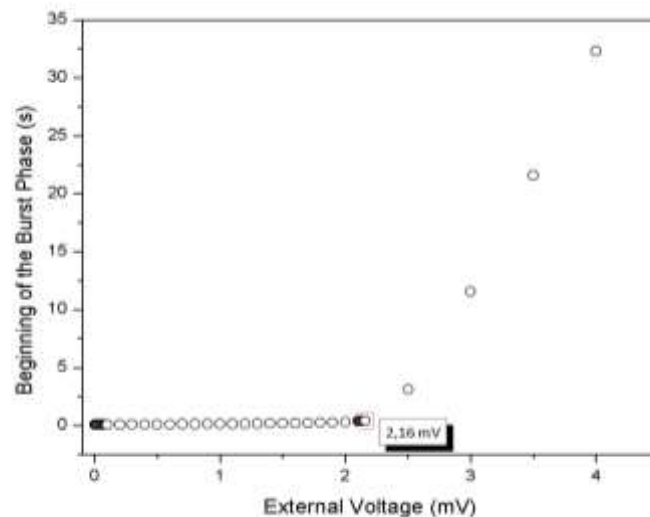
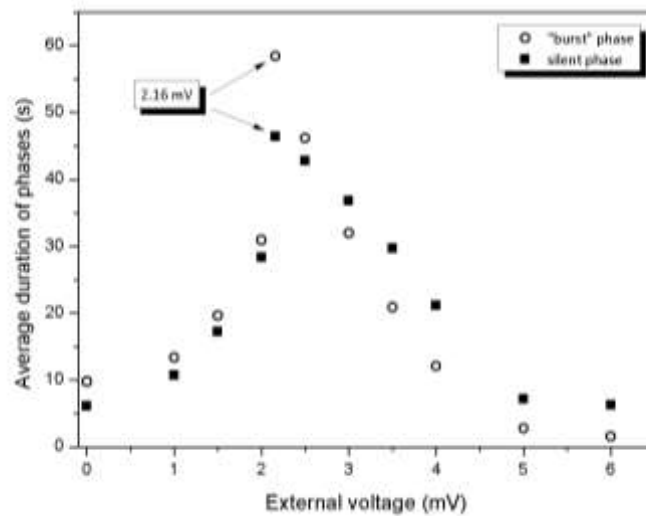
In Fig. 3 it may be observed that the kinetics of gating particles  $S_1$  and  $S_2$  present time periods similar to those of the bursts and silent periods, under both conditions control (Fig 3 top) and in the presence of a voltage pulse of 2 mV (Fig. 3 bottom panel). These data demonstrate that voltage pulses may change the kinetics

of gating particles  $S_1$  and  $S_2$ , and thus modify the response of the electrical activity in pancreatic  $\beta$  cells, increasing their burst and silent periods.



**Fig. 3.** Simulation of the electrical activity and the gating particles that regulate the K-Ca ( $S_1$ ) and K-ATP ( $S_2$ ) channels in pancreatic  $\beta$  cells. Top-control, Bottom-voltage pulse with amplitude of 2 mV.

From external voltage value of 2.16 mV, there is a reduction both in the duration of the silent and the burst periods (Figure 4, top panel).

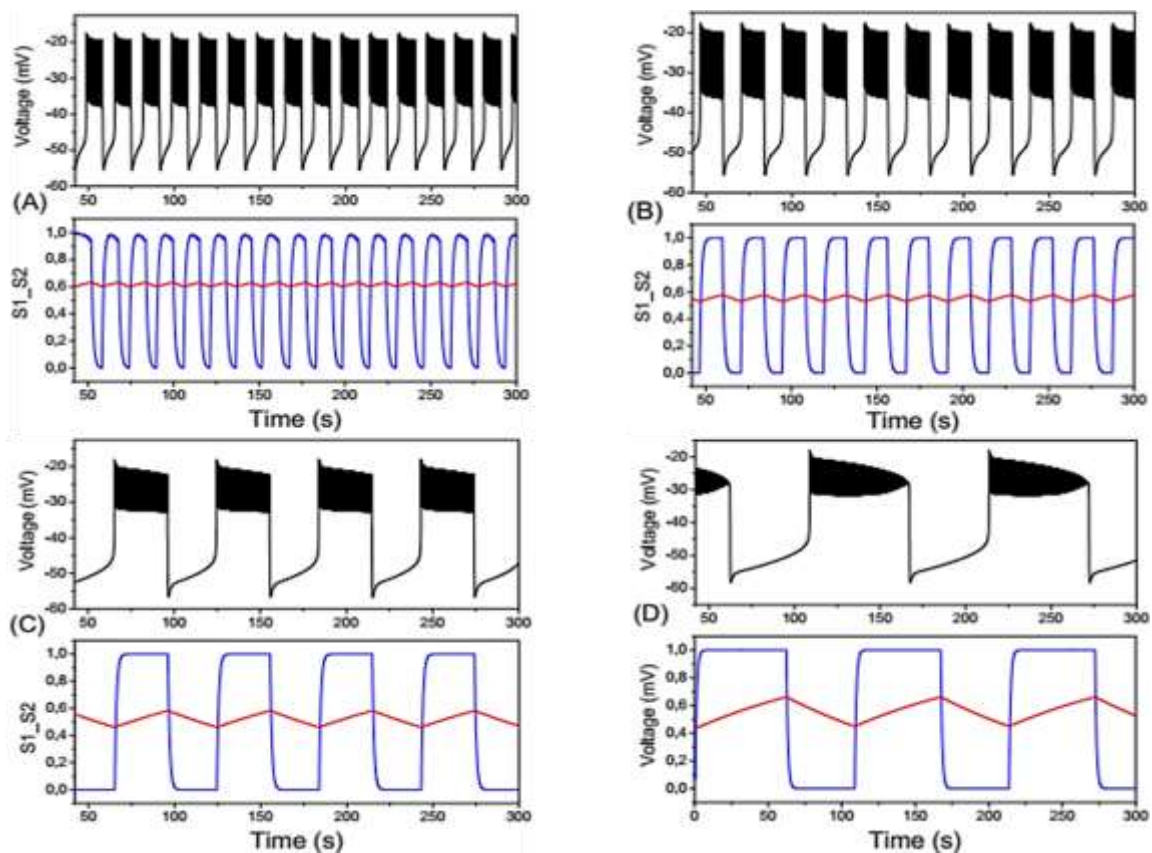


**Fig. 4.** Top panel: duration of burst (open circles) and silent (closed squares) phases for different values of applied external voltage. Bottom panel: beginning of the burst phase for different values of applied external voltage.

The obtained data also reveals that the application of an external voltage higher than 2.16 mV produces a delay in the time required for triggering the first burst (Fig. 4, bottom panel). This stems from the fact that for voltages higher than 2.16 mV the gating particles that control the burst takes longer to be activated, reflecting directly on the behaviour of the electric activity of the burst. This relationship between the kinetics of ion channels, the phases of the burst and insulin secretion and exocytosis implies changes in the ionic conductance of the membrane of pancreatic  $\beta$  cells, directly influencing the behaviour of the burst and the silent periods.

Simulations conducted by Bertram et al. (BERTRAM et al., 2000; BERTRAM; RHOADS; CIMBORA, 2008) and Watts et al. (WATTS et al., 2011) reproduced three

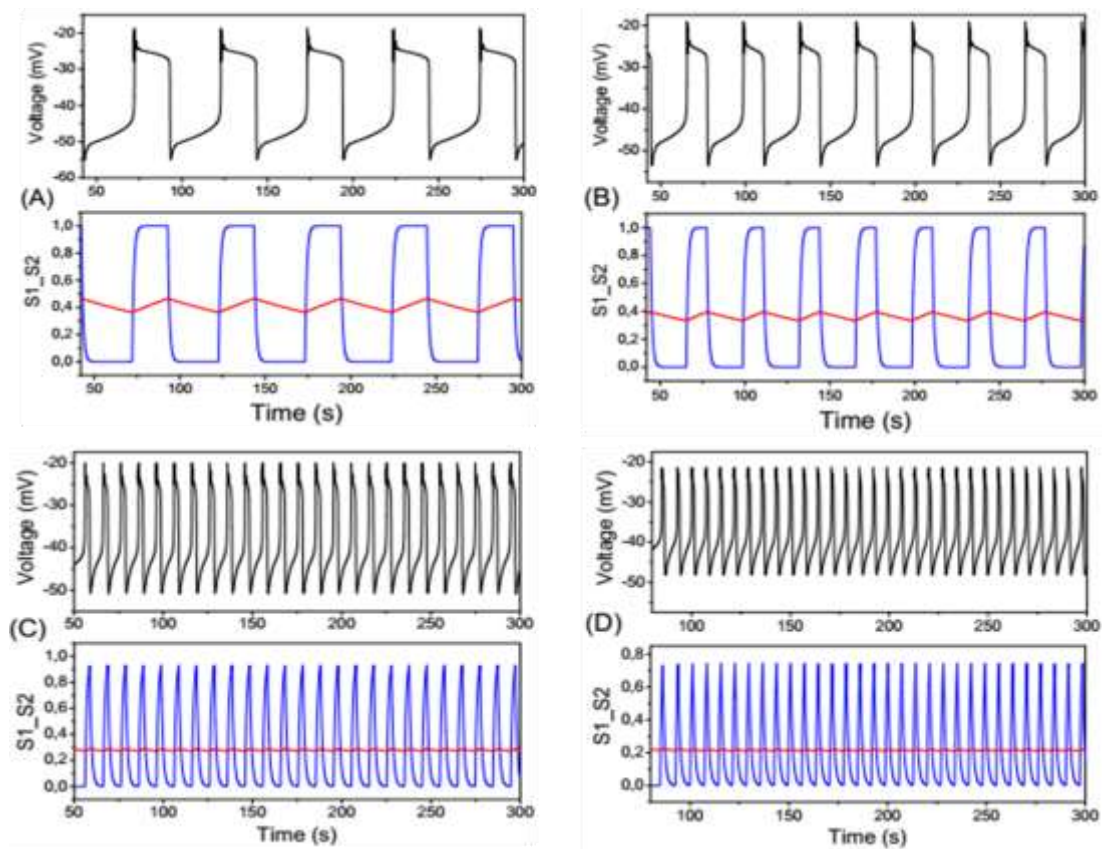
types of oscillations slow, medium and fast, which is directly related to the values of the conductance of the membrane to the different species of ions by which it is bathed. The conductance values for the calcium-activated potassium ions,  $G_{S1}$  is approximately 2 pS, 7 pS and 20 pS for each type of oscillation, respectively (WATTS et al., 2011). The simulations realized in our work were able to reproduce the different types of oscillations found by other authors (BERTRAM; RHOADS; CIMBORA, 2008; WATTS et al., 2011) and can be seen in the figures below showed in our results.



**Fig. 5.** Medium - Slow burst transition. The voltage dynamics and the gating particles for different values of the applied external voltage. (A): control, (B): 1.0 mV (C): 2.0 mV and (D) 2.16 mV.

It is possible to observe in Figure 5 that the kinetics of the gating particles accompany the burst phase as well as the silent phase, both in the control situation and in the presence of an external voltage for a medium oscillation. This type of oscillation is controlled by the gating particles  $S_1$  and  $S_2$ . When the external voltage is increased can be noted a transition to slow oscillation phase, controlled basically by gating particles  $S_2$ . This is equivalent to decreasing the potassium activated by calcium conductance ( $G_{S1}$ ). For external voltage higher than 2.16 mV the system

transits to fast oscillation phase, that is principally controlled by gating particles  $S_1$ , while the particle  $S_2$  remains practically constant. In this phase, it can be observed a high  $G_{S1}$  values around to 20 pS. Then, the transitions among the different oscillation modus can be controlled by gating particles  $S_1$  and  $S_2$ , sensitives to external voltages. In the phase transition that occur to a voltage external value equal to 2.16 mV the  $S_2$  gating particle reaches the highest values for both period and amplitude. Another phase transition can be observed in 3.5 mV, a voltage in which the bursts practically vanish and the process is principally controlled by  $S_1$  (Fig 6).



**Fig. 6.** Slow - fast burst transition. The voltage dynamics and gating particles for the different values of applied external voltage. (A): 3.5 mV (B): 4.0 mV (C): 5.0 mV and (D): 6.0 mV.

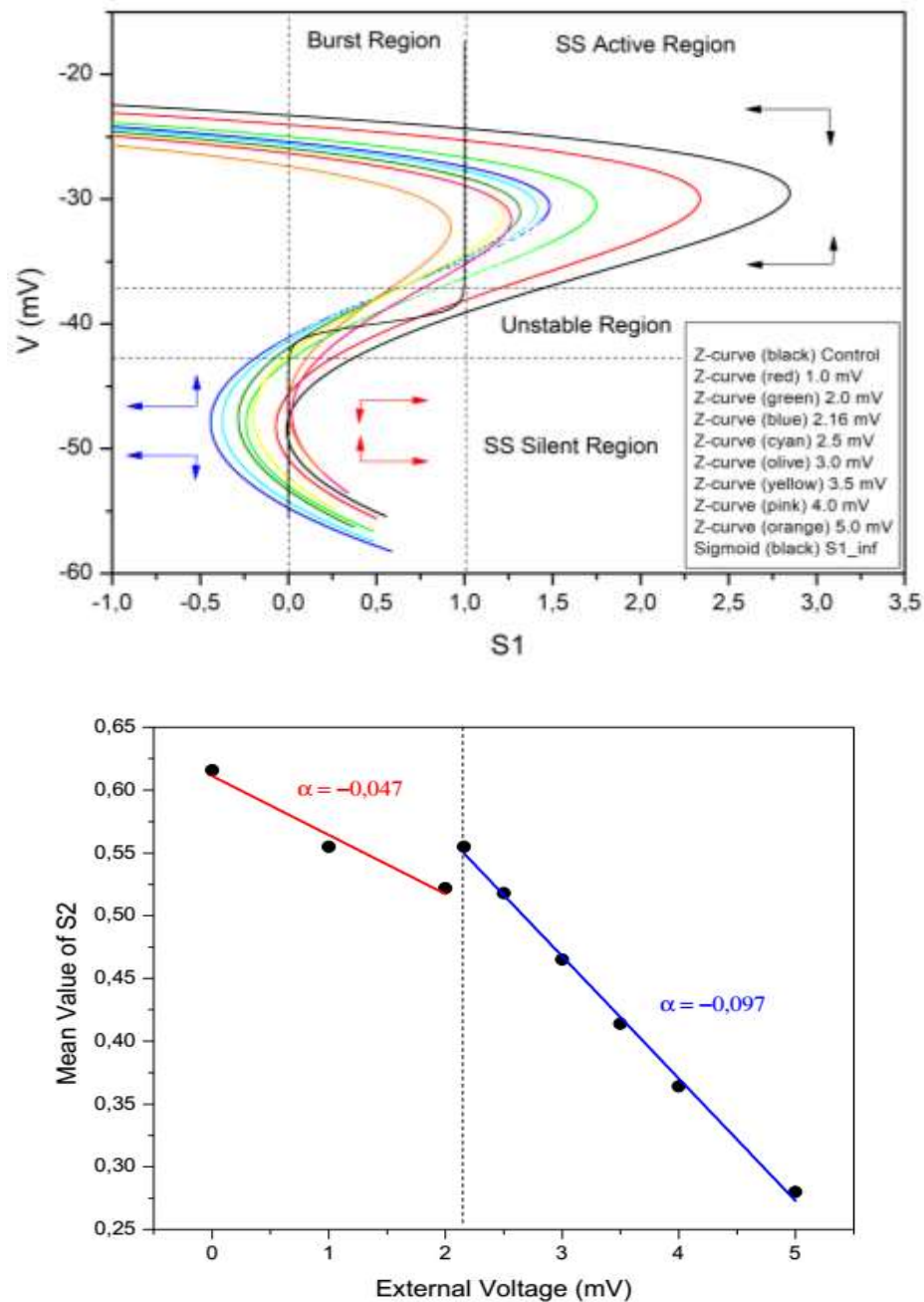
### Phase space analysis.

We analyze the model in a 2D phase space. The trajectories of the time-dependent variables  $S_1$  and  $V$  are showed in the figure 7. In the case of fast bursting, the slow variable  $S_2$  is nearly constant. On the other hand, for medium and slow bursting,  $S_2$  can no longer be considered constant but it varies very slowly and can be describe as a quasi-steady state (BERTRAM et al., 2000). For this case, we use the mean value of  $S_2$  for each external voltage value between 0

and 5.0 mV. With  $S_2$  fixed the phase space analysis permits describe the system only through two variables  $S_1$  and  $V$  setting in the equations of the model,  $dV/dt = 0$ ,  $m = m_\infty(V)$  and  $n = n_\infty(V)$ . Under these conditions Z-curve (graphs of  $V$  versus  $S_1(V)$ ) were plotted. The trajectories in the phase plane can be analyzed by the intercepts of the curves  $S_{1\infty}(V)$  and  $dV/dt = 0$ . In the figure, we can see regions separated by the curves in the balance.

For external voltage values between 0 and 2.16 mV, the Z - curve shows a shift to the left. This displacement is more pronounced in the upper "knee", corresponding to the active region. For external voltage values between 2.5 and 5.0 mV the Z - curve then presents a "flattening" characterized by the continuity of the previous displacement presented by the part of the active region and by an inversion of displacement in the part of the lower "knee" corresponding to the silent region.

Due to the shape and the singular behavior of the Z - curve, in the active region that of the stable solutions we can see an "approximation" of the Z-curve with the increase of the external voltage, reducing the range of values of possible voltages in the system. At the same time, in the silent region exactly the opposite happens, there is an increase in the range of accessible voltage values. In the second range of external voltages, between 2.5 mV and 5.0 mV, the active region of the Z-curve continues its displacement without apparent changes until the stable solutions relative to this region disappears completely to an external voltage of 5.0 mV. Solutions corresponding to the silent region also tend to disappear, in this range of external voltage values, with the displacement to the right of the lower "knee" of the Z - curve. This result can be compared with the graphs of Figures 1, 3, 5 and 6, where we can see a decrease in burst amplitude as the external applied voltage increases.



**Fig. 7.** Top panel: Phase plane analysis. The sigmoid black curves represent  $S_1$  nullclines. The colored curves (Z - curves) are  $V$  nullclines. The arrows indicate the movements of the Z -curves and the stable solutions. Bottom panel: Behavior of the variable  $S_2$  as a function of the applied external voltage. The  $\alpha$  values are the slopes of the straight lines, representing the rates of decrease of the variable  $S_2$  in each regime of the external voltage.

From a simple analysis of the behavior of the variable  $S_2$  as a function of the external voltage shown in the figure 7, we can see that the disturbance to the system caused by the application of external voltage pulses causes a decrease in the mean value of variable  $S_2$  but two regimes appear, one corresponding to voltage values between 0 and 2.16 mV and another, for



higher voltage values, up to 5.00 mV. The rate of decrease of the variable is different in the two regimes, and from 2.16 mV of applied external voltage,  $S_2$  begins to decrease twice as fast.

## Conclusions

Our first conclusion regarding the results obtained in our studies is that with the application of low amplitude external voltages, the computational simulation shows that there are modifications in the burst pattern. This reflects, physiologically, the release of insulin, being equivalent to physiologically modifying membrane conductance to potassium ions, which may be helpful in the treatment of diabetes.

A very important conclusion, from these results, is that, in normal individuals, the application or exposure to external voltages, including low amplitudes, can be a factor causing electric disturbances in the dynamics of pancreatic  $\beta$  cells, provoking a possible decrease in secretion and hormonal exocytosis. On the other hand, in the case of diabetic patients, controlled applications of external low amplitude voltages may be an alternative for the regulation of blood glucose secretion and control. The widening, for some bands of external voltages, of the burst suggest the possible existence of a greater production of insulin. The application of low-amplitude external voltages induces a transition between the different oscillation regimes leading to bursting. For external voltage values of the order of 5.00 mV, reflecting the inhibition of the insulin secretion process. External voltage values  $V_E = 2.16$  mV and  $V_E = 3.5$  mV, can be used as reference for therapy, depending on the characteristics of the patient and their pathology. In relation to the value  $V_E = 3.5$  mV, we can say that this external voltage value induces a change in the behavior of the dynamics of the insulin secretion process, from the variation in the conductivity of the ions of potassium  $G_{K1}$ , which is indirectly modified with the application of applied external voltage pulses.

Finally comparing the results from the analysis of the phase plane and the behavior of the variable  $S_2$  with the external voltage with the previous ones, we can associate the regimes of decrease of  $S_2$  and the change in the direction of the displacement of the Z - curves, with possible transitions between the different regimes of oscillation, complementing the results mentioned above.

## References

- ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 54, n. 2, p. 87–143, 1989.
- ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the  $\beta$  cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160–71, 16 mar. 2012.
- BADAMASI, Y. A. **The working principle of an Arduino**. 2014 11th International Conference on Electronics, Computer and Computation (ICECCO). **Anais...IEEE**, set. 2014Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/6997578/>>
- BARG, S. et al. Fast exocytosis with few  $\text{Ca}^{2+}$  channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 6, p. 3308–3323, 2001.
- BARGER, J. P.; DILLON, P. F. Near-membrane electric field calcium ion dehydration. **Cell Calcium**, v. 60, n. 6, p. 415–422, 2016.
- BENNINGER, R. K. P.; PISTON, D. W. Cellular communication and heterogeneity in pancreatic islet insulin secretion dynamics. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 8, p. 399–406, 2014.
- BERTRAM, R. et al. The phantom burster model for pancreatic beta-cells. **Biophysical journal**, v. 79, n. 6, p. 2880–92, dez. 2000.
- BERTRAM, R. et al. Calcium and glycolysis mediate multiple bursting modes in pancreatic islets. **Biophysical journal**, v. 87, n. 5, p. 3074–87, nov. 2004.
- BERTRAM, R. et al. Interaction of glycolysis and mitochondrial respiration in metabolic oscillations of pancreatic islets. **Biophysical journal**, v. 92, n. 5, p. 1544–55, 1 mar. 2007.
- BERTRAM, R.; RHOADS, J.; CIMBORA, W. P. A phantom bursting mechanism for episodic bursting. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 70, n. 7, p. 1979–1993, 2008.
- BERTRAM, R.; SHERMAN, A.; SATIN, L. S. Electrical bursting, calcium oscillations, and synchronization of pancreatic islets. **Adv Exp Med Biol**, n. 10, p. 261–279, 2010.
- BRINKMAN, A. K. Management of Type 1 Diabetes. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 4, p. 499–511, 2017.
- BUTLER, A. E. et al. Humans With Type 2 Diabetes. v. 52, n. January, 2003.
- CADE, J. E.; HANISON, J. The pancreas. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 18, n. 10, p. 527–531, 2017.
- CASTILHO PIQUEIRA, J. R. A mathematical view of biological complexity. **Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation**, v. 14, n. 6, p. 2581–2586, 2009.
- CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 8, p. a003947–a003947, 1 ago. 2011.
- CHA, C. Y.; POWELL, T.; NOMA, A. Analyzing electrical activities of pancreatic ?? cells using mathematical models. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 107, n. 2, p. 265–273, 2011.
- CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 389, n. 10085, p. 2239–2251, 2017.

- CHEN, Y. BIN et al. The effects of electromagnetic pulses (EMP) on the bioactivity of insulin and a preliminary study of mechanism. **International Journal of Radiation Biology**, v. 86, n. 1, p. 22–26, 13 jan. 2010.
- CHEN, S. H. et al. The Relationships Between Hemoglobin and Diabetes Factors (Insulin Resistance, Glucose Effectiveness, First- and Second-Phase Insulin Secretion) in Old Chinese. **International Journal of Gerontology**, 2018.
- COHEN S.D., HINDMARSH A.C. **CVODE, A STIFF/NONSTIFF ODE SOLVER IN C**. Disponível em: <<https://computation.llnl.gov/casc/nsde/pubs/u121014.pdf>>. Acesso em: 5 dez. 2017.
- COLLI, M. L. et al. MDA5 and PTPN2, two candidate genes for type 1 diabetes, modify pancreatic beta-cell responses to the viral by-product double-stranded RNA. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 1, p. 135–46, 1 jan. 2010.
- COSTABILE, A.; SARNSAMAK, K.; HAUGE-EVANS, A. C. Coffee, type 2 diabetes and pancreatic islet function – A mini-review. **Journal of Functional Foods**, v. 45, n. January, p. 409–416, 2018.
- COTTA, C.; SCHAEFER, R. Bioinspired algorithms and complex systems. **Journal of Computational Science**, v. 23, p. 192–194, 2017.
- CRAWFORD, K. Review of 2017 Diabetes Standards of Care. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 4, p. 621–663, 2017.
- D'ALEO, V. et al. Direct effects of rapid-acting insulin analogues on insulin signaling in human pancreatic islets in vitro. **Diabetes and Metabolism**, v. 37, n. 4, p. 324–329, 2011.
- D'AUSILIO, A. Arduino: a low-cost multipurpose lab equipment. **Behavior research methods**, v. 44, n. 2, p. 305–13, jun. 2012.
- DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847–858, 2006.
- DAVÌ, G.; VAZZANA, N.; SESTILI, S. Variability in the response to antiplatelet treatment in diabetes mellitus. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 98, n. 3–4, p. 48–55, 2012.
- DEAN, B. Y. P. M.; MATTHEWS, E. K. MATTHEWS From. p. 265–275, 1970.
- DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Medical Clinics of North America**, v. 88, n. 4, p. 787–835, 2004.
- DEHGHAN-NIRI, E.; AL-BEER, H. Phase-space topography characterization of nonlinear ultrasound waveforms. **Ultrasonics**, v. 84, p. 446–458, 2018.
- DOLPHIN, A. C. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 19, p. 5369–5390, 2016.
- ERMENTROUT, B. **Simulating, Analyzing, and Animating Dynamical Systems**. [s.l.] Society for Industrial and Applied Mathematics, 2002.
- FARASHI, S.; SASANPOUR, P.; RAFII-TABAR, H. Interaction of Low Frequency External Electric Fields and Pancreatic  $\beta$ -Cell: A Mathematical Modeling Approach to Identify the Influence of Excitation Parameters. **International Journal of Radiation Biology**, v. 0, n. 0, p. 1–33, 2018.
- FÉLIX-MARTÍNEZ, G. J.; 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**, v. 270, p. 66–80, 2015.

FLAGG, T. P. et al. Muscle KATP Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 799–829, 2010.

FRIDLAND, L. E.; JACOBSON, D. A.; PHILIPSON, L. H. Ion channels and regulation of insulin secretion in human  $\beta$ -cells: A computational systems analysis. **Islets**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2013.

FRIDLAND, L. E.; TAMARINA, N.; PHILIPSON, L. H. Bursting and calcium oscillations in pancreatic beta-cells: specific pacemakers for specific mechanisms. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 299, n. 4, p. E517-32, 1 out. 2010.

GAO, J. et al. Inhibition of voltage-gated potassium channels mediates uncarboxylated osteocalcin-regulated insulin secretion in rat pancreatic  $\beta$  cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 777, p. 41–48, 2016.

GASTALDELLI, A. Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 93, n. SUPPL. 1, p. S60–S65, 2011.

GONZÁLEZ, R. E. R.; DA SILVA, J. R. F.; ALBUQUERQUE NOGUEIRA, R. Effects of External Voltage in the Dynamics of Pancreatic  $\beta$ -Cells: Implications for the Treatment of Diabetes. In: **Bioinformatics and Biomedical Engineering**. [s.l.] Springer, Cham, 2018. v. 10813p. 57–70.

GRASSI, C. et al. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. **Cell calcium**, v. 35, n. 4, p. 307–15, abr. 2004.

HABER, E. P. et al. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219–227, 2005.

HELLMAN, B. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Isolated mouse islets respond to glucose with an initial peak of glucagon release followed by pulses of insulin and somatostatin in antisynchrony with glucagon. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, n. 4, p. 1219–1223, 2012.

JIAOJIAO, Y. et al. Applying emerging technologies to improve diabetes treatment. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, n. September, p. 1225–1236, 2018.

JOLLEY, W. B. et al. Magnetic field effects on calcium efflux and insulin secretion in isolated rabbit islets of Langerhans. **Bioelectromagnetics**, v. 4, n. 1, p. 103–106, 1983.

JOUVET, N.; ESTALL, J. L. The pancreas: Bandmaster of glucose homeostasis. **Experimental Cell Research**, v. 360, n. 1, p. 19–23, 2017.

KHAKI, A. A.; HEMMATI, A. A.; NOBAHARI, R. A Study of the Effects of Electromagnetic Field on Islets of Langerhans and Insulin Release in Rats. **Crescent Journal of Medical and Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2015.

KOENKA, I. J.; SÁIZ, J.; HAUSER, P. C. Instrumentino: An open-source modular Python framework for controlling Arduino based experimental instruments. **Computer Physics Communications**, v. 185, n. 10, p. 2724–2729, out. 2014.

- KUNT, T. et al. The physiological impact of proinsulin C-peptide. **Pathophysiology**, v. 5, n. 4, p. 257–262, 1999.
- LAITL-KOBIERSKA, A. et al. Influence of alternating extremely low frequency ELF magnetic field on structure and function of pancreas in rats. **Bioelectromagnetics**, v. 23, n. 1, p. 49–58, jan. 2002.
- LANG, C. H. et al. Alterations in glucose kinetics induced by pentobarbital anesthesia. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 253, n. 6, p. E657-663, 1 dez. 1987.
- LI, D.-S. et al. A protocol for islet isolation from mouse pancreas. **Nature Protocols**, v. 4, n. 11, p. 1649–1652, 2009.
- LI, F.; ZHANG, Z.-M. Comparative identification of Ca<sup>2+</sup> channel expression in INS-1 and rat pancreatic beta cells. **World journal of gastroenterology**, v. 15, n. 24, p. 3046–50, 2009.
- LI, N. et al. Structure of a Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channel. **Cell**, v. 168, n. 1–2, p. 101- 110.e10, 2017.
- LIN, J. D. et al. Comparison of Second-Phase Insulin Secretion Derived from Standard and Modified Low-Dose Graded Glucose Infusion Tests. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 40, n. 6, p. 529–534, 2016.
- LIU, Y. T. et al. Self-organized criticality and learning a new coordination task. **Human Movement Science**, v. 31, n. 1, p. 40–54, 2012.
- MAURO, J. C. et al. Workplace accidents and self-organized criticality. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 506, p. 284–289, 2018.
- NEVES, G. F. **Análise teórica do efeito de campo eletromagnético de 60 Hz na atividade elétrica das células  $\beta$ -pancreáticas**. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2013.
- NEVES, G. F. et al. 60 Hz electric field changes the membrane potential during burst phase in pancreatic  $\beta$ -cells: in silico analysis. **Acta biotheoretica**, v. 62, n. 2, p. 133–43, jun. 2014.
- NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. **The Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169–181, 2011.
- PARAŠ, S. D. et al. Impact of High-Frequency Electromagnetic Fields on Secretion and Structure of Pancreas in Rats. In: [s.l: s.n.]. v. 65p. 711–714.
- PEARCE, J. M. Building Research Equipment with Free, Open-Source Hardware. **Science**, v. 337, n. 6100, p. 1303–1304, 2012.
- PEDERSEN, M. G. Phantom bursting is highly sensitive to noise and unlikely to account for slow bursting in  $\beta$ -cells: Considerations in favor of metabolically driven oscillations. **Journal of Theoretical Biology**, v. 248, n. 2, p. 391–400, 2007.
- PEDERSEN, M. G. et al. Complex patterns of metabolic and Ca<sup>2+</sup> entrainment in pancreatic islets by oscillatory glucose. **Biophysical journal**, v. 105, n. 1, p. 29–39, 2 jul. 2013.
- PENICAUD, L. et al. Effect of anesthesia on glucose production and utilization in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 252, n. 3, p. E365-369, 1 mar. 1987.

- PÉREZ-ARMENDARIZ, E. M. Connexin 36, a key element in pancreatic beta cell function. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 557–566, 2013.
- PROF DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847–858, 2006.
- RIZ, M.; BRAUN, M.; PEDERSEN, M. G. Mathematical Modeling of Heterogeneous Electrophysiological Responses in Human  $\beta$ -Cells. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 1, 2014.
- RORSMAN, P. et al. Electrophysiology of pancreatic  $\beta$ -cells in intact mouse islets of Langerhans. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 107, n. 2, p. 224–35, nov. 2011.
- RORSMAN, P.; ASHCROFT, F. M. Pancreatic  $\beta$ -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 117–214, jan. 2018.
- RORSMAN, P.; BRAUN, M.; ZHANG, Q. Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease. **Cell calcium**, v. 51, n. 3–4, p. 300–8, 2012.
- SAKURAI, T. et al. An extremely low frequency magnetic field attenuates insulin secretion from the insulinoma cell line, RIN-m. **Bioelectromagnetics**, v. 25, n. 3, p. 160–166, abr. 2004.
- SALIPANTE, P. F.; SHAPIRO, M. L.; VLAHOVSKA, P. M. Electric field induced deformations of biomimetic fluid membranes. **Procedia IUTAM**, v. 16, p. 60–69, 2015.
- SANDERS, J. I.; KEPECS, A. A low-cost programmable pulse generator for physiology and behavior. **Frontiers in Neuroengineering**, v. 7, n. December, p. 1–8, 2014.
- SANDOVAL, A. et al. Regulation of L-type CaV1.3 channel activity and insulin secretion by the cGMP-PKG signaling pathway. **Cell Calcium**, v. 66, p. 1–9, 2017.
- SCHOEPF, D. et al. Type-2 diabetes mellitus in schizophrenia: increased prevalence and major risk factor of excess mortality in a naturalistic 7-year follow-up. **European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists**, v. 27, n. 1, p. 33–42, jan. 2012.
- SEINO, S.; MIKI, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 81, n. 2, p. 133–176, 2003.
- SHEIK ABDULAZEEZ, S. Diabetes treatment: A rapid review of the current and future scope of stem cell research. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 4, p. 333–340, 2013.
- SHERMAN, A. Lessons from models of pancreatic beta cells for engineering glucose-sensing cells. **Mathematical Biosciences**, v. 227, n. 1, p. 12–19, 2010.
- TAN, G. D. The pancreas. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 15, n. 10, p. 485–488, 2014.
- WANG, Y. W. et al. Inhibitory effects of imperatorin on voltage-gated K<sup>+</sup> channels and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 1, p. 134–139, 2015.
- WATTS, M. et al. Slow variable dominance and phase resetting in phantom bursting.

**Journal of theoretical biology**, v. 276, n. 1, p. 218–28, 7 maio 2011.

WEIR, C. J. Ion channels, receptors, agonists and antagonists. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 17, n. 12, p. 645–651, 2016.

YANG, S.-N. et al. Ionic mechanisms in pancreatic  $\beta$  cell signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 21, p. 4149–4177, 2014.

ZADOROSNY, R. et al. Fenomenologia da Supercondutividade e Supercondutores Mesoscópicos. p. 1–12, 2015.

ZHAO, Y. et al. Microcystin-LR induces dysfunction of insulin secretion in rat insulinoma (INS-1) cells: Implications for diabetes mellitus. **Journal of Hazardous Materials**, v. 314, p. 11–21, 2016.

ZUCCOTTI, A. et al. Structural and functional differences between L-type calcium channels: Crucial issues for future selective targeting. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 6, p. 366–375, 2011.

**6 CAPÍTULO 2: PROPOSTA DE MODIFICAÇÕES EM UM GERADOR DE PULSOS ELÉTRICOS DE CÓDIGO ABERTO PARA CONTROLE DA SECREÇÃO DE INSULINA EM ILHOTAS DE LANGERHANS.**

Será submetido para publicação no periódico Journal Biomedicine & Pharmacotherapy, portanto se encontra no formato descrito no guia de autores do mesmo.



## **Proposta de modificações em um gerador de pulsos elétricos de código aberto para controle da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans.**

José Radamés Ferreira da Silva<sup>a</sup>, Victor Wanderley Costa de Medeiros<sup>b</sup>, Ramón Enrique Ramayo González<sup>c</sup>, Romildo de Albuquerque Nogueira<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC). Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Estatística e Informática, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Sistemas Complexos e Universalidades. Departamento de Física, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

\*Autor de correspondência: Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

Endereço de email: ran.pe@terra.com.br

### **Resumo**

O controle do nível de glicose no sangue ocorre em decorrência das alterações nas propriedades elétricas das células beta pancreáticas estimuladas pela própria glicose. Esse controle da glicose sanguínea ocorre devido a liberação de insulina através das células  $\beta$ -pancreáticas ou pela absorção da glicose pelas células do organismo, realizada pelo transportador de glicose GLUT 4. Quando um desses dois mecanismos ou ambos não estão funcionando adequadamente no organismo se estabelece o Diabetes Mellitus (DM), uma doença que é uma das dez principais causas de mortes no mundo. Apesar de existir várias substâncias, tais como as sulfonilureias, metiglinidas, biguanidas, glitazonas e outras que podem ser usadas no tratamento do DM, alguns pacientes são resistentes a essas drogas. Portanto, desenvolver um dispositivo elétrico que possa controlar com pulsos de voltagens a secreção de insulina, mostra-se uma alternativa inovadora ao tratamento do DM. Esta proposta foi motivada pelo estudo teórico que realizamos sobre a relação entre pulsos de voltagens e a resposta elétrica das células beta pancreáticas (GONZÁLEZ; DA SILVA; ALBUQUERQUE NOGUEIRA, 2018). Visando aprofundar esta linha de investigação, estamos propondo, nesse trabalho, desenvolver um gerador de pulsos de baixas voltagens para controle da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans de ratos *in vitro*. Para isto será usada uma plataforma

eletrônica de código aberto, denominada "Arduino", para construir o gerador de pulsos de baixas voltagens.

Palavras Chave: gerador de pulsos de baixa voltagem; Diabetes Mellitus; secreção de insulina; Arduino.

## 1. Introdução.

### 1.1 O Diabetes Mellitus

A Federação Internacional de Diabetes (IDF, sigla em inglês) estima, cerca de 425 milhões de pessoas possuíam diabetes em 2017, sendo segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) uma das 10 principais causas de mortes no mundo. Se forem mantidos os padrões de crescimento atuais em 2045 deverão haver 629 milhões de pessoas portadoras dessa desordem metabólica.

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença sistêmica que se caracteriza pela alteração na liberação de insulina através das células  $\beta$ -pancreáticas ou pela redução da absorção da glicose pelas células do organismo por deficiência no transportador de glicose GLUT 4, que são os mecanismos responsáveis pela alteração nos níveis de glicose no sangue. (BRINKMAN, 2017; COSTABILE; SARNSAMAK; HAUGE-EVANS, 2018; CRAWFORD, 2017; D'ALEO et al., 2011; PEDERSEN et al., 2013; PROF DANEMAN, 2006; RORSMAN et al., 2011).

O diabetes que se divide em tipo 1 e 2, para muitos pacientes o tratamento pode ser bastante invasivo com a necessidade de várias aplicações diárias de insulina exógena, que causam dores físicas e psicológica, também podem ser utilizadas drogas para inibir ou estimular a secreção de insulina (JIAOJIAO et al., 2018). Os indivíduos portadores da doença muitas vezes possuem a massa de células  $\beta$ -pancreáticas reduzida nas ilhotas de Langerhans e as restantes continuam a secretar insulina em menor quantidade. (GASTALDELLI, 2011).

## 1.2 A atividade elétrica nas células beta e a secreção de insulina

A regulação dos níveis de glicose sanguínea é realizada pela parte endócrina do pâncreas que controla a secreção de insulina realizada pelas células beta-pancreáticas ao detectar os níveis elevados de glicose no plasma. (BERTRAM; SHERMAN; SATIN, 2010; CADE; HANISON, 2017; JOUVET; ESTALL, 2017; PEDERSEN, 2007). Para controlar o teor de açúcar no sangue, ocorrem alterações características nas propriedades biofísicas das células beta estimuladas por glicose. São geradas nestas células alterações na permeabilidade da membrana das células beta e, em decorrência disso, despolarizações e repolarizações ocorrem na membrana dessas células, produzindo uma atividade elétrica denominada de *burst* que controla o processo da secreção da insulina.

A atividade elétrica das células beta depende de canais iônicos e seus mecanismos de gating, sendo a concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) no citosol um fator preponderante no controle da secreção da insulina. Durante a fase ativa dos potenciais “bursts”, o  $\text{Ca}^{2+}$  entra na célula através de canais de cálcio voltagem dependentes, elevando a concentração desse íon. Durante a fase silenciosa, o  $\text{Ca}^{2+}$  é removido do citosol por bombas de cálcio, diminuindo sua concentração (CHA; POWELL; NOMA, 2011; FARASHI; SASANPOUR; RAFII-TABAR, 2018; FRIDLAND; TAMARINA; PHILIPSON, 2010).

Durante a ativação celular gera-se o “*Bursting*”, que significa sequência de picos na fase ativa do potencial de membrana dependentes das oscilações de cálcio e que está relacionado à secreção de insulina, como foi relatado pela primeira vez em estudos *in vitro* de ilhotas por Dean e Mathews em 1970 (DEAN; MATTHEWS, 1970). Desde então tem sido rotineiramente observado e bem caracterizado em muitos estudos (BERTRAM; SHERMAN; SATIN, 2010). Esses “*Burstings*” de potenciais de ação são repetitivos e intimamente relacionados com a regulação da glicose induzida por secreção de insulina em células beta-pancreáticas (BARG et al., 2001; CHA; POWELL; NOMA, 2011). Dependendo da quantidade de glicose presente no organismo é necessário um tempo maior para a regulação de seus níveis no sangue, portanto níveis elevados de glicose exigem “*Burst*” com maior

duração de fase ativa causando assim o aumento de sua largura que provoca maior secreção de insulina. (RORSMAN; ASHCROFT, 2018)

Alguns indivíduos podem não ter a capacidade de produzir a secreção necessária de insulina nas células beta. Entretanto, estudos relataram que, indivíduos com resistência à insulina (diabetes não dependente de insulina) apresentam diminuição tanto na massa de células beta, quanto nos grânulos de secreção de insulina (GASTALDELLI, 2011). O Diabetes Mellitus representa uma das principais causas de doenças cardiovasculares, morbidade e mortalidade nos países ocidentais (DAVÌ; VAZZANA; SESTILI, 2012), sendo a doença mais devastadora, crônica e não transmissível que se tornou um sério problema global (SHEIK ABDULAZEEZ, 2013).

Os métodos químicos de tratamento para a diabetes não são plenamente eficazes e têm efeitos colaterais. Assim, há uma busca óbvia para um tratamento alternativo com métodos adequados (SHEIK ABDULAZEEZ, 2013). A compreensão dos mecanismos de tais efeitos exige desenvolvimento de novos equipamentos e modelos matemáticos que representem adequadamente a dinâmica nas ilhotas pancreáticas. Um dos modelos matemáticos mais estudados é o do tipo Hodgkin-Huxley que foi utilizado por (NEVES et al., 2014) para demonstrar que pulsos externos de baixas voltagens influenciam na secreção de insulina, pois favorecem a manutenção da fase ativa “Burst” podendo assim promover maior secreção de insulina. Atualmente, processos de percepção e transdução de sinal por organismos vivos atraem a atenção de pesquisadores em vários campos de estudos. Um dos aspectos importantes é a sensibilidade de sistemas vivos a sinais externos fracos (NEVES et al., 2014; ZADOROSNY et al., 2015). Construir um aparelho de baixo custo que possa controlar com pulsos de voltagens o funcionamento das ilhotas de Langerhans no processo da secreção de insulina, mostra-se uma alternativa inovadora ao tratamento do DM2. Esta proposta foi motivada pelo estudo teórico que realizamos sobre a relação entre pulsos de voltagens e a resposta elétrica das células beta pancreáticas (GONZÁLEZ; DA SILVA; ALBUQUERQUE NOGUEIRA, 2018).

Portanto, o objetivo do nosso trabalho é construir um gerador de pulsos de voltagem extremamente baixa, bem como desenvolver um sistema experimental que permita estimular ilhotas de Langerhans de ratos *in vitro*.

## **2. Modificação de um gerador de pulsos elétricos para controle da secreção de insulina em ilhotas de Langerhans.**

A execução dessa proposta será realizada em duas etapas:

1. Adaptação de um gerador de voltagens de baixas amplitudes, com materiais de baixo custo;
2. Desenvolvimento de um sistema experimental que permita a aplicação de pulsos elétricos em ilhotas de Langerhans de ratos *in vitro*.

### **2.1 Etapa 1: Utilização de um gerador de voltagens de baixas amplitudes, com materiais de baixo custo.**

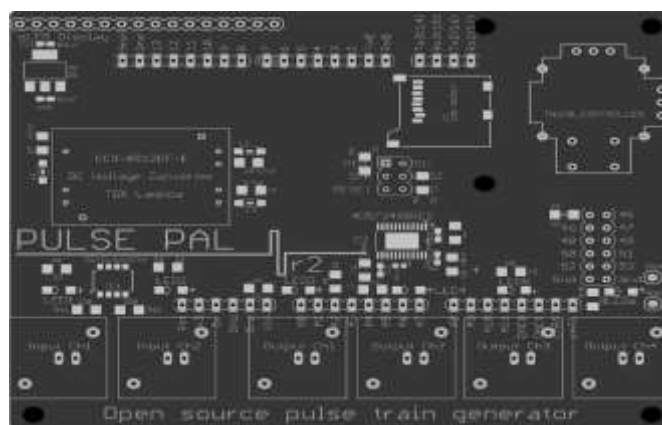
Nos últimos anos, a comunidade científica propôs uma plataforma eletrônica de código aberto, denominada "Arduino", para monitorar e controlar hardware experimental. Um Arduino é composto por um microcontrolador localizado em uma pequena placa de circuito impresso (PCI) com chip programável. Devido a sua interface amigável e simples de programar e reprogramar, bastando apenas utilizar um cabo USB para transmitir o código que é construído com uma versão simplificada da linguagem de programação C++. O "Arduino" possui bastantes aplicações na construção de equipamentos científicos como osciloscópio, sistema de análise de fluxo, colorímetro, análise de amostras por eletroforese capilar e monitoramento de temperatura e umidade (BADAMASI, 2014; D'AUSILIO, 2012; KOENKA; SÁIZ; HAUSER, 2014; PEARCE, 2012).

Para construir o gerador de função foi utilizada como base a placa de circuito impresso do "Pulse Pal" versão 2.0 que pode ser observada na figura 1, que é um gerador de trem de pulsos de código aberto de baixo custo, cujo os componentes para sua montagem são obtidos com facilidade (SANDERS; KEPECS, 2014).



**Figura 1:** Placa de circuito impresso do “PULSE PAL”.

O Pulse Pal transmite os sinais lógicos do acionador de entrada através de um circuito incorporado (IC em inglês) que possui função semelhante a um fusível protegendo os pinos de entrada do microcontrolador. Os sinais de disparo são então lidos pelo microcontrolador ARM Cortex M3 da Pulse Pal. O microcontrolador gera formas de onda analógicas controladas por conversor digital-analógico (DAC em inglês) de 4 canais (AD5724RBREZ-ND, na versão 2.0), configurado com circuitos de saída bipolar. Este circuito de saída consiste em um amplificador operacional (TL084ACN, Texas Instruments) e dois resistores de 10k (R3, R4) que dividem a tensão de referência do DAC, fornecendo coletivamente voltagens de saída na faixa de -10 a +10V de cada (unipolar) canal de saída do DAC. O circuito de disparo e estimulação do “*Pulse Pal*” para um único canal de saída de disparo analógico é mostrado na figura 2, o mesmo circuito se aplica a todos os 4 canais.(SANDERS; KEPECS, 2014)



**Figura 2:** Placa de circuito impresso. Apresenta a localização exata de todos os componentes eletrônicos que compõem o aparelho, facilitando a sua montagem e soldagem. Fonte (SANDERS; KEPECS, 2014)

Para aplicar nossos estímulos trocamos o DAC original do Pulse Pal pelo AD5754RBREZ-ND (os chips são pino compatíveis), o novo chip possui 16 bits disponíveis trazendo com isso maior precisão e controle das voltagens desejadas isso permitiu que o mesmo pudesse emitir pulsos em milivolts (mV), necessários para nosso experimento, também trocamos o Arduino DUE original do projeto por uma Arduino Mega por uma questão de compatibilidade da placa com as bibliotecas utilizadas no código mais simples que foi escrito para aplicação dos pulsos. Tais alterações podem ser visualizadas na figura 3.



**Figura 3:** Alterações no projeto “Pulse Pal”. Apresentamos em (A) o Arduino Due, (B) Arduino Mega, (C) conexão entre arduino e placa de circuito impresso “PULSE PAL” e (D) o novo DAC.

## 2.2. Etapa 2: desenvolvimento de um sistema experimental que permita a aplicação de pulsos elétricos em ilhotas de Langerhans de ratos *in vitro*.

### 2.2.1 A extração do pâncreas

Para retirada do pâncreas, os ratos devem ser eutanasiados por aprofundamento anestésico com associação de cetamina 75 – 100mg/Kg e xilazina 5 – 10mg/Kg em dosagem 2 vezes acima da recomendada para anestesia por via intraperitoneal (LANG et al., 1987; PENICAUD et al., 1987). Em seguida o rato deve ser posicionado em decúbito ventral com as patas em extensão e realizada a tricotomia e antissepsia do campo cirúrgico com etanol a 70%, após esterilização deve ser realizada uma incisão ao redor do abdome superior para expor o fígado e os intestinos visando a perfusão com colagenase tipo XI (1000 U/ml-1) dissolvida em 1 parte de HBSS (LI et al., 2009), para distender o pâncreas e facilitar posteriormente sua remoção para isolamento das ilhotas de Langerhans.

Na perfusão a ampola será pinçada utilizando uma pinça hemostática curvada em seguida uma injeção lenta da primeira metade da solução colagenase V é realizada no ducto biliar comum através da articulação do ducto hepático e do ducto cístico, em seguida, a velocidade de injeção aumenta e ao final o pâncreas distendido é coletado a partir do duodeno, evitando ao máximo o aglomerado de tecido adiposo.

### ***2.2.2 Isolando as ilhotas de Langerhans***

Após ser removido o pâncreas deve ser colocado num tubo Falcon de 50 ml, contendo solução de colagenase e levado ao banho-maria a 37.5 ° C por 15 min para digestão dos tecidos em volta do pâncreas, sendo agitado brevemente por duas a três vezes manualmente durante o tempo de incubação. Após a incubação, o tubo deve ser agitado vigorosamente com a mão para romper o pâncreas até que a suspensão fique homogênea.

Terminada a digestão o tubo deve ser colocado em gelo e adicionada solução de CaCl<sub>2</sub> (1mM) dissolvido em 1 parte de HBSS, e posteriormente, centrifugada a 290g durante 30s a 4 °C e o sobrenadante descartado. Em seguida, deve ser ressuspenso o sedimento com solução de CaCl<sub>2</sub> gelada, e centrifugado novamente a 290g durante 30s a 4 °C, sendo descartado o sobrenadante.

Os sedimentos devem ser ressuspenso com solução de CaCl<sub>2</sub> para filtragem em uma peneira de células de 70 µm.

As ilhotas capturadas na filtragem devem ser transferidas para uma placa de Petri com 30 ml de uma solução de L-glutamina (20mM), penicilina (100Uml<sup>-1</sup>), estreptomicina (100µgml<sup>-1</sup>) e FBS (10%), em meio de cultura RPMI 1640, posteriormente, as ilhotas de Langerhans devem ser incubadas a 37 ° C suplementada com 5% CO<sub>2</sub>.

### ***2.2.3 A aplicação de pulsos elétricos nas ilhotas***

Após 12h de incubação o soro com as ilhotas deverá ser transferido para tubos de Eppendorf com capacidade para 2 ml visando a aplicação dos pulsos elétricos nas



ilhas. Após a aplicação de pulsos com equipamento construído nesse trabalho medem-se os níveis de insulina nos poços estimulados e não estimulados. Este protocolo permitirá avaliar a secreção de insulina em resposta aos pulsos elétricos.

Para obtenção dos níveis de secreção de insulina pelas ilhotas de Langerhans deve ser usado um espectrofotômetro UV/VIS utilizando um comprimento de onda variando entre 260-300nm para quantificar a insulina secretada.

O objetivo desse procedimento *in vitro* foi parametrizar a secreção da insulina frente aos pulsos de voltagens visando à construção de um sistema elétrico que possa controlar a secreção de insulina no pâncreas.

### 3. Resultados e Discussões

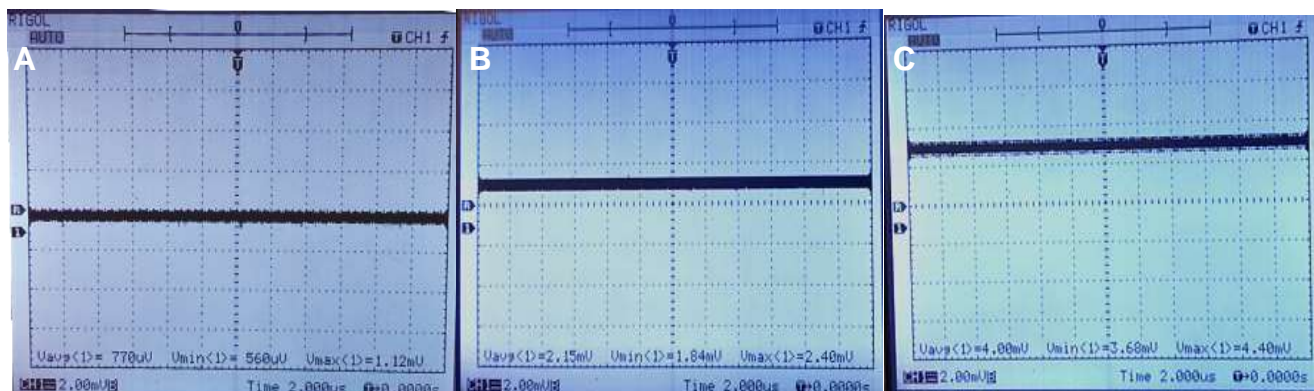
O equipamento gerador de pulsos construído foi testado em osciloscópio (RIGOL 5102M), para verificarmos se os pulsos de baixa voltagem programados no Arduino estavam realmente saindo do equipamento. Inicialmente fizemos o teste das conexões do aparelho com o computador (figura 4) para compilar e transmitir o código para o Arduino e por sua vez gerar os pulsos de baixa voltagem.



**Figura 4:** Setup de testes do gerador de pulsos de baixa voltagem.

Em seguida iniciamos o processo de configuração do equipamento para emitir em cada uma das 4 saídas de diferentes valores de pulsos simultâneos, sendo necessário esse procedimento para ajustar os valores inteiros que serão interpretados pelo DAC para emissão dos pulsos de baixas voltagens.

Podemos observar que o equipamento funcionou plenamente emitindo os pulsos de baixas voltagens. Na Fig 5 pode ser observado três diferentes valores médios de voltagens ao longo do tempo.



**Figura 5:** Pulsos elétricos de baixa voltagem. (A) Pulso de 0,77 mV, (B) pulso de 2,15 mV e (C) pulso de 4 mV.

Na Fig. 5 pode-se observar um pulso de 0,77 mV muito próximo a linha de base (0 mV), um pulso de 2,15 mV e um outro de 4 mV. Esses resultados mostram que o gerador de pulso para baixas voltagens está funcionando adequadamente, e pode ser usado no sistema experimental para aplicação dos pulsos elétricos nas ilhotas de Langerhans de ratos *in vitro*, que será a próxima etapa do projeto

#### . 4. Perspectivas

Como perspectiva futura o nosso grupo pretende testar o equipamento construído realizando o protocolo experimental aqui proposto para comprovar a viabilidade do equipamento para aplicação de pulsos de baixas voltagens nas ilhotas de Langerhans de ratos *in vitro*. Além disso, esses experimentos possibilitarão relacionar as intensidades dos pulsos aplicados com a insulina secretada nas ilhotas pancreáticas. Esses experimentos serão os primeiros passos para o uso da aplicação de pulsos elétricos como forma alternativa para o tratamento do diabetes.

#### Agradecimentos

Agradecemos e à Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo suporte financeiro e ao Centro de Apoio a Pesquisa (CENAPESQ) da UFRPE pelo uso do Laboratório de Análise Computacional e Realidades Complexas (LACREC).

## 5. Referências

- ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 54, n. 2, p. 87–143, 1989.
- ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the  $\beta$  cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160–71, 16 mar. 2012.
- BADAMASI, Y. A. **The working principle of an Arduino**. 2014 11th International Conference on Electronics, Computer and Computation (ICECCO). **Anais...IEEE**, set. 2014Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/6997578/>>
- BARG, S. et al. Fast exocytosis with few  $\text{Ca}^{2+}$  channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 6, p. 3308–3323, 2001.
- BARGER, J. P.; DILLON, P. F. Near-membrane electric field calcium ion dehydration. **Cell Calcium**, v. 60, n. 6, p. 415–422, 2016.
- BENNINGER, R. K. P.; PISTON, D. W. Cellular communication and heterogeneity in pancreatic islet insulin secretion dynamics. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 8, p. 399–406, 2014.
- BERTRAM, R. et al. The phantom burster model for pancreatic beta-cells. **Biophysical journal**, v. 79, n. 6, p. 2880–92, dez. 2000.
- BERTRAM, R. et al. Calcium and glycolysis mediate multiple bursting modes in pancreatic islets. **Biophysical journal**, v. 87, n. 5, p. 3074–87, nov. 2004.
- BERTRAM, R. et al. Interaction of glycolysis and mitochondrial respiration in metabolic oscillations of pancreatic islets. **Biophysical journal**, v. 92, n. 5, p. 1544–55, 1 mar. 2007.
- BERTRAM, R.; RHOADS, J.; CIMBORA, W. P. A phantom bursting mechanism for episodic bursting. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 70, n. 7, p. 1979–1993, 2008.
- BERTRAM, R.; SHERMAN, A.; SATIN, L. S. Electrical bursting, calcium oscillations, and synchronization of pancreatic islets. **Adv Exp Med Biol**, n. 10, p. 261–279, 2010.
- BRINKMAN, A. K. Management of Type 1 Diabetes. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 4, p. 499–511, 2017.
- BUTLER, A. E. et al. Humans With Type 2 Diabetes. v. 52, n. January, 2003.
- CADE, J. E.; HANISON, J. The pancreas. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 18, n. 10, p. 527–531, 2017.
- CASTILHO PIQUEIRA, J. R. A mathematical view of biological complexity. **Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation**, v. 14, n. 6, p. 2581–2586, 2009.
- CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 8, p. a003947–a003947, 1 ago. 2011.
- CHA, C. Y.; POWELL, T.; NOMA, A. Analyzing electrical activities of pancreatic ?? cells using mathematical models. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 107, n. 2, p. 265–273, 2011.
- CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 389,

n. 10085, p. 2239–2251, 2017.

CHEN, Y. BIN et al. The effects of electromagnetic pulses (EMP) on the bioactivity of insulin and a preliminary study of mechanism. **International Journal of Radiation Biology**, v. 86, n. 1, p. 22–26, 13 jan. 2010.

CHEN, S. H. et al. The Relationships Between Hemoglobin and Diabetes Factors (Insulin Resistance, Glucose Effectiveness, First- and Second-Phase Insulin Secretion) in Old Chinese. **International Journal of Gerontology**, 2018.

COHEN S.D., HINDMARSH A.C. **CVODE, A STIFF/NONSTIFF ODE SOLVER IN C**. Disponível em: <<https://computation.llnl.gov/casc/nsde/pubs/u121014.pdf>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

COLLI, M. L. et al. MDA5 and PTPN2, two candidate genes for type 1 diabetes, modify pancreatic beta-cell responses to the viral by-product double-stranded RNA. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 1, p. 135–46, 1 jan. 2010.

COSTABILE, A.; SARNSAMAK, K.; HAUGE-EVANS, A. C. Coffee, type 2 diabetes and pancreatic islet function – A mini-review. **Journal of Functional Foods**, v. 45, n. January, p. 409–416, 2018.

COTTA, C.; SCHAEFER, R. Bioinspired algorithms and complex systems. **Journal of Computational Science**, v. 23, p. 192–194, 2017.

CRAWFORD, K. Review of 2017 Diabetes Standards of Care. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 4, p. 621–663, 2017.

D'ALEO, V. et al. Direct effects of rapid-acting insulin analogues on insulin signaling in human pancreatic islets in vitro. **Diabetes and Metabolism**, v. 37, n. 4, p. 324–329, 2011.

D'AUSILIO, A. Arduino: a low-cost multipurpose lab equipment. **Behavior research methods**, v. 44, n. 2, p. 305–13, jun. 2012.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847–858, 2006.

DAVÌ, G.; VAZZANA, N.; SESTILI, S. Variability in the response to antiplatelet treatment in diabetes mellitus. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 98, n. 3–4, p. 48–55, 2012.

DEAN, B. Y. P. M.; MATTHEWS, E. K. MATTHEWS From. p. 265–275, 1970.

DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Medical Clinics of North America**, v. 88, n. 4, p. 787–835, 2004.

DEGHAN-NIRI, E.; AL-BEER, H. Phase-space topography characterization of nonlinear ultrasound waveforms. **Ultrasonics**, v. 84, p. 446–458, 2018.

DOLPHIN, A. C. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 19, p. 5369–5390, 2016.

ERMENTROUT, B. **Simulating, Analyzing, and Animating Dynamical Systems**. [s.l.] Society for Industrial and Applied Mathematics, 2002.

FARASHI, S.; SASANPOUR, P.; RAFII-TABAR, H. Interaction of Low Frequency External Electric Fields and Pancreatic  $\beta$ -Cell: A Mathematical Modeling Approach to Identify the Influence of Excitation Parameters. **International Journal of Radiation**

**Biology**, v. 0, n. 0, p. 1–33, 2018.

FÉLIX-MARTÍNEZ, G. J.; GODÍNEZ-FERNÁNDEZ, J. R. Modeling Ca<sup>2+</sup> currents and buffered diffusion of Ca<sup>2+</sup> in human  $\beta$ -cells during voltage clamp experiments. **Mathematical Biosciences**, v. 270, p. 66–80, 2015.

FLAGG, T. P. et al. Muscle KATP Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 799–829, 2010.

FRIDLAND, L. E.; JACOBSON, D. A.; PHILIPSON, L. H. Ion channels and regulation of insulin secretion in human  $\beta$ -cells: A computational systems analysis. **Islets**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2013.

FRIDLAND, L. E.; TAMARINA, N.; PHILIPSON, L. H. Bursting and calcium oscillations in pancreatic beta-cells: specific pacemakers for specific mechanisms. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 299, n. 4, p. E517-32, 1 out. 2010.

GAO, J. et al. Inhibition of voltage-gated potassium channels mediates uncarboxylated osteocalcin-regulated insulin secretion in rat pancreatic  $\beta$  cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 777, p. 41–48, 2016.

GASTALDELLI, A. Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 93, n. SUPPL. 1, p. S60–S65, 2011.

GONZÁLEZ, R. E. R.; DA SILVA, J. R. F.; ALBUQUERQUE NOGUEIRA, R. Effects of External Voltage in the Dynamics of Pancreatic  $\beta$ -Cells: Implications for the Treatment of Diabetes. In: **Bioinformatics and Biomedical Engineering**. [s.l.] Springer, Cham, 2018. v. 10813p. 57–70.

GRASSI, C. et al. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. **Cell calcium**, v. 35, n. 4, p. 307–15, abr. 2004.

HABER, E. P. et al. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219–227, 2005.

HELLMAN, B. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Isolated mouse islets respond to glucose with an initial peak of glucagon release followed by pulses of insulin and somatostatin in antisynchrony with glucagon. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, n. 4, p. 1219–1223, 2012.

JIAOJIAO, Y. et al. Applying emerging technologies to improve diabetes treatment. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, n. September, p. 1225–1236, 2018.

JOLLEY, W. B. et al. Magnetic field effects on calcium efflux and insulin secretion in isolated rabbit islets of Langerhans. **Bioelectromagnetics**, v. 4, n. 1, p. 103–106, 1983.

JOUVET, N.; ESTALL, J. L. The pancreas: Bandmaster of glucose homeostasis. **Experimental Cell Research**, v. 360, n. 1, p. 19–23, 2017.

KHAKI, A. A.; HEMMATI, A. A.; NOBAHARI, R. A Study of the Effects of Electromagnetic Field on Islets of Langerhans and Insulin Release in Rats. **Crescent Journal of Medical and Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2015.

- KOENKA, I. J.; SÁIZ, J.; HAUSER, P. C. Instrumentino: An open-source modular Python framework for controlling Arduino based experimental instruments. **Computer Physics Communications**, v. 185, n. 10, p. 2724–2729, out. 2014.
- KUNT, T. et al. The physiological impact of proinsulin C-peptide. **Pathophysiology**, v. 5, n. 4, p. 257–262, 1999.
- LAITL-KOBIERSKA, A. et al. Influence of alternating extremely low frequency ELF magnetic field on structure and function of pancreas in rats. **Bioelectromagnetics**, v. 23, n. 1, p. 49–58, jan. 2002.
- LANG, C. H. et al. Alterations in glucose kinetics induced by pentobarbital anesthesia. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 253, n. 6, p. E657-663, 1 dez. 1987.
- LI, D.-S. et al. A protocol for islet isolation from mouse pancreas. **Nature Protocols**, v. 4, n. 11, p. 1649–1652, 2009.
- LI, F.; ZHANG, Z.-M. Comparative identification of Ca<sup>2+</sup> channel expression in INS-1 and rat pancreatic beta cells. **World journal of gastroenterology**, v. 15, n. 24, p. 3046–50, 2009.
- LI, N. et al. Structure of a Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channel. **Cell**, v. 168, n. 1–2, p. 101–110.e10, 2017.
- LIN, J. D. et al. Comparison of Second-Phase Insulin Secretion Derived from Standard and Modified Low-Dose Graded Glucose Infusion Tests. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 40, n. 6, p. 529–534, 2016.
- LIU, Y. T. et al. Self-organized criticality and learning a new coordination task. **Human Movement Science**, v. 31, n. 1, p. 40–54, 2012.
- MAURO, J. C. et al. Workplace accidents and self-organized criticality. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 506, p. 284–289, 2018.
- NEVES, G. F. **Análise teórica do efeito de campo eletromagnético de 60 Hz na atividade elétrica das células  $\beta$ -pancreáticas**. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2013.
- NEVES, G. F. et al. 60 Hz electric field changes the membrane potential during burst phase in pancreatic  $\beta$ -cells: in silico analysis. **Acta biotheoretica**, v. 62, n. 2, p. 133–43, jun. 2014.
- NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. **The Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169–181, 2011.
- PARAŠ, S. D. et al. Impact of High-Frequency Electromagnetic Fields on Secretion and Structure of Pancreas in Rats. In: [s.l.: s.n.]. v. 65p. 711–714.
- PEARCE, J. M. Building Research Equipment with Free, Open-Source Hardware. **Science**, v. 337, n. 6100, p. 1303–1304, 2012.
- PEDERSEN, M. G. Phantom bursting is highly sensitive to noise and unlikely to account for slow bursting in  $\beta$ -cells: Considerations in favor of metabolically driven oscillations. **Journal of Theoretical Biology**, v. 248, n. 2, p. 391–400, 2007.
- PEDERSEN, M. G. et al. Complex patterns of metabolic and Ca<sup>2+</sup> entrainment in

- pancreatic islets by oscillatory glucose. **Biophysical journal**, v. 105, n. 1, p. 29–39, 2 jul. 2013.
- PENICAUD, L. et al. Effect of anesthesia on glucose production and utilization in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 252, n. 3, p. E365-369, 1 mar. 1987.
- PÉREZ-ARMENDARIZ, E. M. Connexin 36, a key element in pancreatic beta cell function. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 557–566, 2013.
- PROF DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847–858, 2006.
- RIZ, M.; BRAUN, M.; PEDERSEN, M. G. Mathematical Modeling of Heterogeneous Electrophysiological Responses in Human  $\beta$ -Cells. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 1, 2014.
- RORSMAN, P. et al. Electrophysiology of pancreatic  $\beta$ -cells in intact mouse islets of Langerhans. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 107, n. 2, p. 224–35, nov. 2011.
- RORSMAN, P.; ASHCROFT, F. M. Pancreatic  $\beta$ -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 117–214, jan. 2018.
- RORSMAN, P.; BRAUN, M.; ZHANG, Q. Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease. **Cell calcium**, v. 51, n. 3–4, p. 300–8, 2012.
- SAKURAI, T. et al. An extremely low frequency magnetic field attenuates insulin secretion from the insulinoma cell line, RIN-m. **Bioelectromagnetics**, v. 25, n. 3, p. 160–166, abr. 2004.
- SALIPANTE, P. F.; SHAPIRO, M. L.; VLAHOVSKA, P. M. Electric field induced deformations of biomimetic fluid membranes. **Procedia IUTAM**, v. 16, p. 60–69, 2015.
- SANDERS, J. I.; KEPECS, A. A low-cost programmable pulse generator for physiology and behavior. **Frontiers in Neuroengineering**, v. 7, n. December, p. 1–8, 2014.
- SANDOVAL, A. et al. Regulation of L-type CaV1.3 channel activity and insulin secretion by the cGMP-PKG signaling pathway. **Cell Calcium**, v. 66, p. 1–9, 2017.
- SCHOEPPF, D. et al. Type-2 diabetes mellitus in schizophrenia: increased prevalence and major risk factor of excess mortality in a naturalistic 7-year follow-up. **European psychiatry: the journal of the Association of European Psychiatrists**, v. 27, n. 1, p. 33–42, jan. 2012.
- SEINO, S.; MIKI, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 81, n. 2, p. 133–176, 2003.
- SHEIK ABDULAZEEZ, S. Diabetes treatment: A rapid review of the current and future scope of stem cell research. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 4, p. 333–340, 2013.
- SHERMAN, A. Lessons from models of pancreatic beta cells for engineering glucose-sensing cells. **Mathematical Biosciences**, v. 227, n. 1, p. 12–19, 2010.

- TAN, G. D. The pancreas. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 15, n. 10, p. 485–488, 2014.
- WANG, Y. W. et al. Inhibitory effects of imperatorin on voltage-gated K<sup>+</sup>channels and ATP-sensitive K<sup>+</sup>channels. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 1, p. 134–139, 2015.
- WATTS, M. et al. Slow variable dominance and phase resetting in phantom bursting. **Journal of theoretical biology**, v. 276, n. 1, p. 218–28, 7 maio 2011.
- WEIR, C. J. Ion channels, receptors, agonists and antagonists. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 17, n. 12, p. 645–651, 2016.
- YANG, S.-N. et al. Ionic mechanisms in pancreatic  $\beta$  cell signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 21, p. 4149–4177, 2014.
- ZADOROSNY, R. et al. Fenomenologia da Supercondutividade e Supercondutores Mesoscópicos. p. 1–12, 2015.
- ZHAO, Y. et al. Microcystin-LR induces dysfunction of insulin secretion in rat insulinoma (INS-1) cells: Implications for diabetes mellitus. **Journal of Hazardous Materials**, v. 314, p. 11–21, 2016.
- ZUCCOTTI, A. et al. Structural and functional differences between L-type calcium channels: Crucial issues for future selective targeting. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 6, p. 366–375, 2011.