



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD MONTERREY

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA VARIABILIDAD EN EL
ACOPLAMIENTO ELÉCTRICO-IÓNICO DEL CALCIO EN CÉLULAS
DEL NODO SINOAURICULAR

Tesis que presenta

Carlos Alberto Diaz Galindo

para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

con especialidad en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de la tesis:

Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González

Monterrey, Nuevo León

Agosto, 2016

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por patrocinar este proyecto, Al Cinvestav unidad Monterrey, por el apoyo brindado para mi formación profesional y el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Jesús Rodríguez por darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección y por sus valiosos consejos.

Al Dr. Daniel Sánchez y su grupo de laboratorio de biofísica de membranas, con quienes estoy profundamente agradecido por su tiempo y paciencia.

Al Dr. Moisés Santillán por sus valiosas observaciones a este proyecto.

A mi familia por todo el apoyo y la confianza que han depositado en mí.

A mi novia Yazmin Velasquez que, a pesar de la distancia estuvo siempre a mí lado.

A mis compañeros de maestría a quienes agradezco por estos dos años de historias que jamás olvidare.

A mis compañeros del área Alberto Peña y Mauricio Castaño, por su paciencia, constante apoyo y valiosos consejos durante esta etapa de mi formación.

Resumen

El corazón está formado por muchos tipos de células, de los cuales se destacan las células excitables (Células ventriculares), y aquellas que pueden despolarizar rítmicamente su membrana también conocidas como células autoexcitables. Las células autoexcitables son el enlace fisiológico entre la generación del estímulo eléctrico y el posterior evento mecánico conocido como acoplamiento excitación-contracción (EC). Está bien establecido que la contracción es activada por un incremento en la concentración de calcio intracelular, y la interacción entre el potencial de membrana y el ciclo del Ca^{2+} constituyen la base de este acoplamiento. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que factores estocásticos influyen en la activación de canales de las células autoexcitables, ya que en ellas existen canales de Ca^{2+} activados por voltaje (Principalmente los tipo T y L) distribuidos en la membrana plasmática. Lo anterior conduce a fluctuaciones aleatorias en la dinámica intracelular de este ion. Para llevar a cabo un estudio de las fluctuaciones o variabilidad en la dinámica del Ca^{2+} intracelular, es necesario hacer uso de un modelo de células autoexcitables. Para este trabajo se aislaron células de corazón de embrión de pollo con 9 días de desarrollo, ya que han mostrado ser un buen modelo para biología humana [16]. Éstas, en combinación de técnicas de fluorescencia con microscopia confocal, fueron estimuladas eléctricamente mediante campos eléctricos y la dinámica de Ca^{2+} fue registrada con el marcador fluorescente Fluo-4AM. A partir de estos registros se obtuvieron parámetros como frecuencia de respuesta al estímulo, amplitud, tiempos de subida y tiempos de decaimiento en la señal. La estimulación consistió en trenes de pulsos rectangulares de 10 *ms* de duración a varias frecuencias (0.5 Hz, 1.0 Hz, 1.5 Hz). Con esto se determinó la frecuencia de estímulo al que la célula dio una respuesta similar a la impuesta. Los experimentos siguientes se enfocaron en inducir variabilidad en la amplitud del estímulo. Los resultados mostraron que a 1 Hz, fue la mejor frecuencia de respuesta, ya que se presentó un evento uno a uno, posteriormente al inducir un porcentaje de variabilidad del 10 % y 20 %, no se presentaron cambios significativos en ninguno de los parámetros obtenidos de la señal. No obstante, para un porcentaje de variabilidad del 30 % (Respecto al estímulo sin ruido), se observó una diferencia significativa en la etapa final del decaimiento en la concentración de Ca^{2+} intracelular.

Abstract

The heart consists of many cell types, of which stand excitable cells (ventricular cells), and those that can depolarize the membrane rhythmically also known as autoexcitables cells. The autoexcitables cells are the physiological link between the generation of electrical stimulation and subsequent mechanical event known as excitation-contraction coupling (EC). It is well established that the contraction is triggered by an increase in intracellular calcium concentration, and the interaction between membrane potential and the cycle of Ca^{2+} are the basis for this link. However, take note that stochastic factors influence channel activation of autoexcitables cells, because in them there are channels Ca^{2+} voltage-gated (mainly the T type and L) distributed in the plasma membrane. This leads to random fluctuations in intracellular dynamics of this ion. To carry out a study of fluctuations or variability in the dynamics of Ca^{2+} intracellular, it is necessary to use a model of autoexcitables cells. For this work cells chicken embryo heart with 9 days of development were isolated, as they have proven to be a good model for human biology [16]. These, in combination with confocal fluorescence techniques microscopy, were stimulated electrically by electric fields and the dynamics of Ca^{2+} was recorded with Fluo-4 a.m. fluorescent marker. From these records parameters such as frequency response to the stimulus, amplitude, rise and decay times they were obtained in the signal. The stimulation consisted of rectangular pulse trains 10 ms duration at various frequencies (0.5 Hz, 1.0 Hz, 1.5 Hz). With this frequency stimulus to the cell he gave a response similar to that imposed determined. The following experiments were focused on inducing variability in stimulus amplitude. The results showed that at 1 Hz was the best frequency response because an event was presented one by one, then by inducing a percentage of variability of 10 % and 20 %, no significant changes occurred in any of the parameters obtained from the signal. However, a percentage of variability for 30 % (Regarding the stimulus noiseless), a significant difference was observed in the final stage of decay in the concentration of Ca^{2+} intracellular.

Abreviaturas

EC:Excitación-Contracción

lpm:latidos por minuto.

Na⁺:Sodio.

K⁺:Potasio.

Ca²⁺:Calcio.

I_f:Corriente marcapaso.

Índice general

Resumen	4
Abstract	5
Abreviaturas	6
Índice general	7
Índice de figuras	9
1. Introducción	11
1.1. Marco Teórico	11
1.1.1. El Corazón	11
1.1.2. Actividad eléctrica del corazón	12
1.1.3. Actividad mecánica del corazón	15
1.2. Antecedentes	18
1.2.1. Caracterización de la dinámica del Ca^{2+} citosólico en células aisladas de corazón	19
1.2.2. Caracterización del Ca^{2+} citosólico ante estimulación con campos eléctricos	20
2. Planteamiento del problema	22
3. Hipótesis y Objetivos	24
3.1. Hipótesis	24
3.2. Objetivos	24

<i>Índice general</i>	8
3.2.1. Objetivo General	24
3.2.2. Objetivos Específicos	24
4. Metodología y desarrollo experimental	25
4.1. Selección del modelo animal	25
4.2. Medios de cultivo y disociación celular	26
4.3. Procedimiento de disociación celular	26
4.3.1. Carga de FLUO-4 AM	27
4.4. Estimulación eléctrica	28
4.4.1. Estimulación eléctrica sin variabilidad	28
4.4.2. Estimulación eléctrica con variabilidad	29
4.5. Obtención de imágenes	30
4.6. Procesamiento de las imágenes	31
4.7. Parámetros de interés de la señal	31
4.8. Estadística	33
5. Resultados	34
5.1. Estímulo eléctrico sin variabilidad a diferentes frecuencias	35
5.2. Variabilidad en el estímulo eléctrico	40
5.2.1. Frecuencia de respuesta ante estímulos con variabilidad	41
5.2.2. Amplitud en la señal con variabilidad en el estímulo	42
5.2.3. Efecto de la variabilidad en los tiempos de subida	42
5.2.4. Efecto de la variabilidad en los tiempos de decaimiento	43
6. Discusión	47
7. Conclusiones y Perspectivas	49
7.1. Conclusiones	49
7.2. Perspectivas	50
Bibliografía	51

Índice de figuras

1.1. Sistema de conducción del corazón Modificada de [1].	12
1.2. Representación del potencial de acción característico de una célula marcapasos modificado de [2].	14
1.3. Modulación de la corriente I_f modificado de [2].	15
1.4. Potencial de acción característico de las células ventriculares modificado de [1].	16
1.5. Esquema del mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio modificado de [1].	17
1.6. Polarización de la célula ante un campo eléctrico. E campo eléctrico.	18
1.7. a) Oscilación de calcio en condiciones de control b) Oscilación de calcio en presencia de Angiotensina II [3].	20
1.8. A. transitorio de Ca^{2+} suscitado por estimulación a 0.2 Hz B. transitorio de Ca^{2+} suscitado a 1 Hz [4].	21
4.1. Células incubadas con la molécula Fluo-4 AM vista con un objetivo 40X. El recuadro a) Muestra una célula de corazón típica luego del proceso de disociación. Los recuadros b) y c), muestran a la misma célula luego del proceso de incubación. en b) se aprecia una baja intensidad respecto a c), asociado a una baja presencia de calcio intracelular. c) por otra parte muestra una intensidad de fluorescencia mayor respecto a b), asociada a alta presencia de calcio intracelular.	27
4.2. Camara de perfusión	28

<i>Índice de figuras</i>	10
4.3. Ejemplo de la señal periódica aplicada al primer grupo experimental con varias frecuencias de estímulo	29
4.4. Ejemplo de la señal periódica aplicada para el segundo grupo experimental .	29
4.5. Pulsos rectangulares de electro-estimulación con diferentes porcentajes de variabilidad	30
4.6. Ejemplo de un cuadro obtenido mediante el modo line scan, correspondiente a 4 segundos de registro	31
4.7. a) Ejemplo de una Imagen en escala de grises b) Señal promediada	32
4.8. Célula aislada vista en microscopio confocal a) Campo claro b) Fluorescencia bajo nivel de Ca^{2+} c) Fluorescencia Alto nivel de Ca^{2+}	33
5.1. Registro Temporal de las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico con ventanas de estímulo sin variabilidad a diferentes frecuencias	35
5.2. Ventana temporal inicial de las oscilaciones de Ca^{2+} citoplasmático en condiciones basales (Control)	36
5.3. Registro de oscilaciones de Ca^{2+} citosólico con estimulación a 0.5 Hz	37
5.4. Registro de oscilaciones de Ca^{2+} citosólico con estimulación a 1.0 Hz	37
5.5. Registro de oscilaciones de Ca^{2+} citosólico con estimulación a 1.5 Hz	38
5.6. Relación entre la frecuencia respuesta vs la frecuencia del estímulo aplicado	39
5.7. Repuesta en la amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico ante diferentes frecuencias de estímulo	39
5.8. Porcentajes de decaimiento Ca^{2+} intracelular para cada ventana de estímulo	40
5.9. Cuadro comparativo entre la frecuencia de respuesta ante estímulos con variabilidad vs estímulos sin variabilidad para cada grupo experimental	41
5.10. Barras comparativas en la amplitud estímulo con ruido vs estímulo cuadrado	42
5.11. Efecto de la variabilidad en el tiempo de llegada al máximo del Ca^{2+} en el citosol	43
5.12. Decaimientos ante estímulos con variabilidad de 10 %	44
5.13. Decaimientos ante estímulos con variabilidad de 20 %	44
5.14. Decaimientos ante estímulos con variabilidad de 30 %	45
5.15. Decaimientos para cada nivel de variabilidad	46

Capítulo 1

Introducción

1.1. Marco Teórico

1.1.1. El Corazón

El corazón es un órgano cuya función se ha comparado al funcionamiento de una bomba. Éste está formado por cuatro compartimentos, dos que aportan la principal fuerza de bombeo llamadas ventrículos, y otros dos que alimentan a estos últimos, llamados aurículas. Una aurícula y un ventrículo forman una cámara que, en el caso de la parte derecha del corazón, impulsa la sangre hacia la circulación pulmonar. Por su parte la cámara izquierda la impulsa hacia la circulación periférica. Estas cámaras están formadas por musculo cardíaco muy similar al musculo esquelético, con la peculiaridad de que la duración de la contracción que es mucho mayor [5].

El corazón cuenta con un sistema de válvulas que las conecta y un sistema que genera impulsos eléctricos conduciéndolos por toda la musculatura cardíaca. Como se puede ver, en el corazón hay dos principales actividades: la actividad eléctrica la cual controla a la actividad mecánica. La correcta comunicación entre estos dos sistemas es crucial para el buen funcionamiento del sistema circulatorio [6].

1.1.2. Actividad eléctrica del corazón

El corazón cuenta con un sistema especializado de excitación y de conducción que controla las contracciones cardíacas. La excitación se genera a partir de un grupo de células especializado en despolarizar rítmicamente su membrana generando potenciales de acción. Éste grupo de células se conoce como Nodo Sinoaricular. El impulso generado allí excita tanto a la aurícula izquierda, a través del haz de Bachman [5], como a la aurícula derecha, donde se propaga atravesando las vías internodulares hasta llegar al nodo auriculoventricular. En este último los impulsos originados en la aurícula se retrasan antes de penetrar en los ventrículos. Desde el nodo auriculoventricular el impulso viaja a través del tabique auriculoventricular y se distribuye entre las dos ramas del sistema de conducción terminando en las fibras especializadas de conducción rápida, llamadas fibras de Purkinje Figura 1.1.

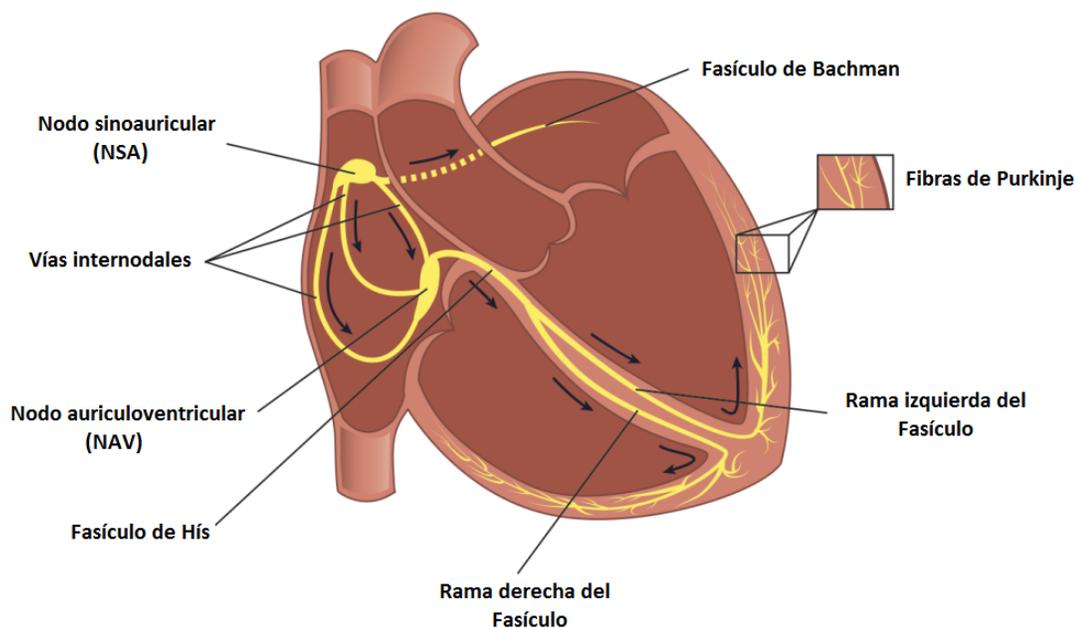


Figura 1.1: Sistema de conducción del corazón Modificada de [1].

Las células marcapasos muestran diferencias en sus potenciales de acción respecto a los miocitos ventriculares, ya que expresan diferentes tipos de canales iónicos y en diferente cantidad

[7]. Esto les confiere propiedades como automaticidad, una lenta fase de despolarización y un potencial de reposo inestable. La automaticidad es la capacidad que tiene estas células para despolarizarse de forma rítmica y espontánea cuando alcanzan un umbral de voltaje que permite generar potenciales de acción.

En el corazón existen tres tipos de células que muestran comportamiento marcapasos y cada una tiene una tasa inherente de descarga de potenciales de acción. En promedio en condiciones normales, el nodo sinoauricular lo hace de 60 a 100 latidos por minuto (lpm) mientras que el nodo auriculoventricular y las fibras de Purkinje (con algunas células ventriculares) lo hacen en los rangos de 40 a 60 lpm y 40 a 20 lpm respectivamente [1, 6].

Actividad iónica de las células marcapaso

Una representación del potencial de acción de una célula marcapasos se muestra en la Figura 1.2. Primero hay que notar que el potencial no baja más allá de los -60 mv [7], por lo que generalmente este es llamado potencial de reposo de las células marcapasos. Seguido al potencial de reposo se presenta una depolarización diastólica lenta, la cual es causada por una permeabilidad temporal de la membrana al sodio que solo es activada durante la hiperpolarización; mucho más que durante la despolarización. Durante muchos años esta corriente fue denominada como funny current o (I_f) y es la clave del automatismo del nodo sinoauricular[1]. La actividad conjunta de estas corrientes induce lentamente un flujo neto de sodio, y por lo tanto un aumento en el potencial de membrana que, cuando se encuentra alrededor de los -55 mv, activa un conjunto de canales de calcio dependientes de voltaje (Tipo T- Ca^{2+} transitorios y tipo L Ca^{2+} larga duración). Inicialmente canales tipo T se activan por poco tiempo y despolarizan aún más la membrana hasta los -40 mv. Esto permite la activación de los canales tipo L- Ca^{2+} . En conjunto estos transportadores iónicos son los predominantes durante la fase de ascenso del potencial de acción de las células marcapasos.

Una vez se presenta un ascenso hasta los +10 mV, se activa la corriente rectificadora de potasio y se inactivan las corrientes de calcio. Es decir, esta activación de canales de potasio activados por voltaje aumenta el flujo de salida del potasio, repolarizando a la membrana a potenciales más negativos, lo que produce una nueva hiperpolarización y el inicio de un

nuevo ciclo [2].

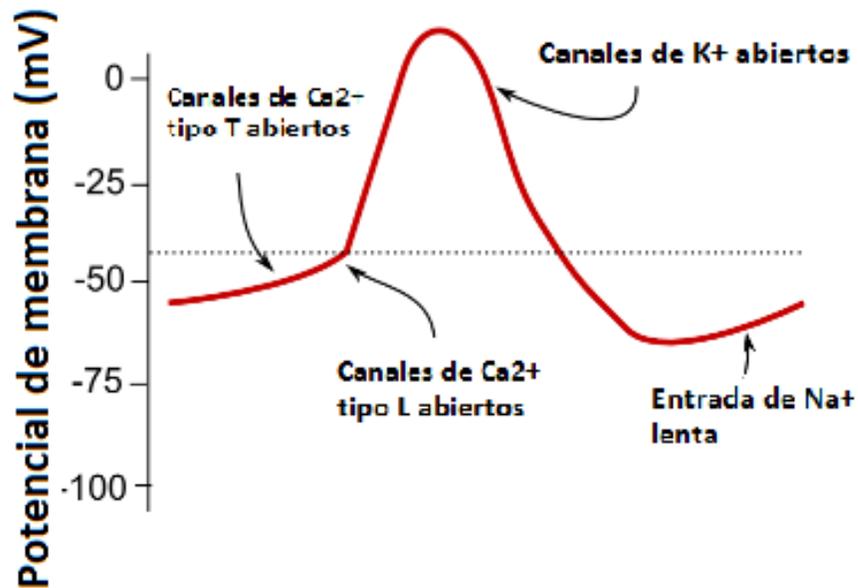


Figura 1.2: Representación del potencial de acción característico de una célula marcapasos modificado de [2].

No es de extrañar que el potasio presente este efecto rectificador ya que la membrana es permeable al potasio la mayor parte del tiempo, aunque es mucho más permeable cuando canales de potasio dependientes de voltaje se abren en respuesta a la depolarización. Así, el potencial de membrana está principalmente determinado por el potasio. Si una depolarización ocurre se incrementa la corriente de potasio impulsando de vuelta al potencial de reposo,

Control autonómico del nodo sinoauricular

La tasa de producción de potenciales de acción del NSA está limitada a qué tan rápido entra Na^+ a través de los canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN). Si más canales HCN están abiertos, el Na^+ entra rápidamente, alcanzando mucho más rápido el umbral de activación de canales de calcio voltaje dependientes y acortando la distancia entre potenciales de acción [2].

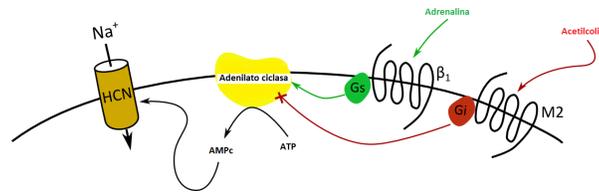


Figura 1.3: Modulación de la corriente I_f modificado de [2].

La apertura y cierre de los canales HCN puede ser modulada por los efectos opuestos que el sistema simpático y parasimpático ejercen sobre ellos por la liberación de neuroreceptores de las fibras nerviosas. La noradrenalina liberada por el sistema simpático y la adrenalina circulante en la sangre, se unen a los receptores β_1 . Los adrenoreceptores que se acoplan vía proteínas G, estimulan a la enzima adenilato ciclasa aumentando la producción de segundos mensajeros como Adenosín monofosfato cíclico o AMPc (Figura 1.3). Los HCN son sensibles al AMPc y se abren cuando los niveles de éste se elevan en el citosol. Así, la I_f es aumentada y los tiempos entre potenciales de acción disminuye [8]. Por el contrario, la acetilcolina, la cual es liberada por el sistema parasimpático, se une a receptores muscarínicos M_2 teniendo un efecto opuesto en la producción de AMPc, ya que inhibe a la enzima adenilato ciclasa, propiciando el cierre de los canales HCN [2, 5].

1.1.3. Actividad mecánica del corazón

El potencial de reposo de las células ventriculares se encuentra alrededor de los -90 mV, Debido a la corriente rectificadora de K^+ , en este valor del potencial de membrana, los canales de Na^+ y Ca^{2+} se encuentran cerrados. Estas células no poseen automatismo, por lo que necesitan de un estímulo de suficiente intensidad despolarice a la célula y se genere un potencial de acción. Quienes dan este estímulo son generalmente células vecinas que, a través de las uniones Gap, permiten la entrada de iones Ca^{2+} y Na^+ . De esta forma, se van abriendo canales rápidos de Na^+ , hasta alcanzar el umbral de disparo, que se encuentra alrededor de los -70 mV, y se genera una corriente sostenida Na^+ . Esta es la fase 0 del potencial de acción ventricular, los eventos que siguen a esta fase se exponen a continuación [6].

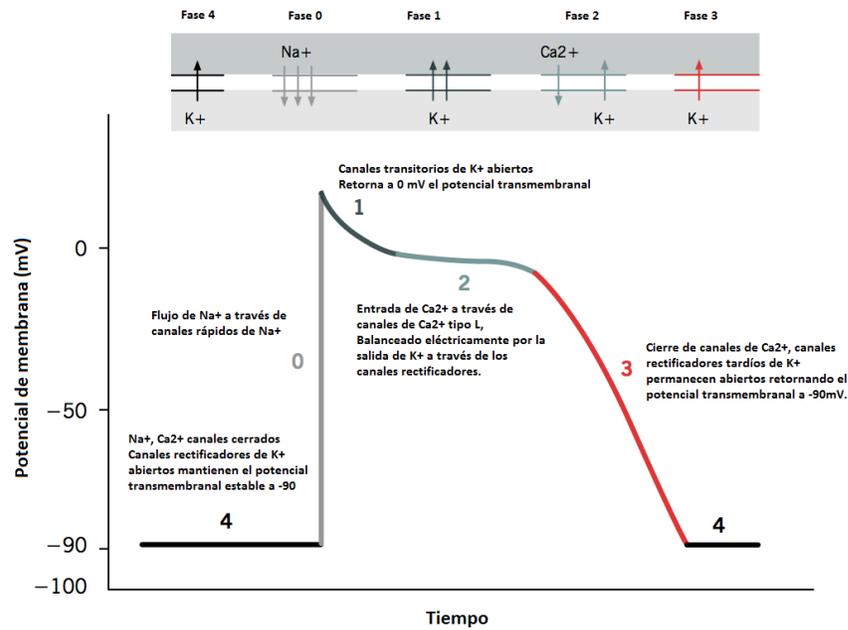


Figura 1.4: Potencial de acción característico de las células ventriculares modificado de [1].

- Fase 1: Se inactivan los canales rápidos de Na. En esta fase algunos canales de K^+ se abren brevemente permitiendo un flujo de salida e iniciando la repolarización de la membrana aproximadamente a los 0 mV.
- Fase 2: Esta es denominada fase de meseta. Canales de calcio tipo L todavía están abiertos, lo que permite una corriente de ingreso de calcio significativa para el acoplamiento excitación-contracción (se explicará más adelante). La corriente de calcio y la activación de canales de K^+ tardíos están eléctricamente balanceados y el potencial transmembranal es mantenido alrededor de los 0 mV hasta finalizar la fase 2.
- Fase 3: Los canales de Ca^{2+} tipo L se van inactivando gradualmente, lo que permite a los canales rectificadores tardíos de K^+ iniciar la fase de repolarización, que lleva al potencial de membrana nuevamente hasta los -90 mV. Con ello, se prepara a la célula para una nueva despolarización.
- Fase 4: Finalmente, los canales de salida de K^+ completan la fase de repolarización final manteniendo el potencial de reposo, estos eventos se resumen en la Figura 1.4

Acoplamiento Excitación-Contracción (EC)

El acoplamiento excitación-contracción representa el proceso por el cual, un potencial de acción eléctrico conduce a la contracción de las células del músculo cardíaco. Esto se hace mediante la conversión de una señal química en energía mecánica a través de la acción de proteínas contráctiles y se presenta durante la fase 2 del potencial de acción en las células ventriculares [5, 6].

La entrada inicial de Ca^{2+} , a través de los canales tipo L - Ca^{2+} durante la fase dos del potencial de acción, es insuficiente para disparar la contracción. Esta señal es amplificada por un mecanismo denominado liberación de calcio inducida por calcio (CICR por sus siglas en inglés), este mecanismo es el responsable de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico [1].

Cuando el Ca^{2+} entra a la célula a través de los canales tipo L- Ca^{2+} . Los receptores de rianodina (receptores especializados en la liberación Ca^{2+}) desde el retículo sarcoplásmico) cambian su conformación y inducen una mayor liberación de Ca^{2+} de las posas del retículo sarcoplásmico ver la Figura 1.5. Eventualmente se incrementan los niveles de Ca^{2+} intracelular, el cual actúa con los complejos de tropomiocina para inducir la contracción de la célula cardíaca [1, 5].

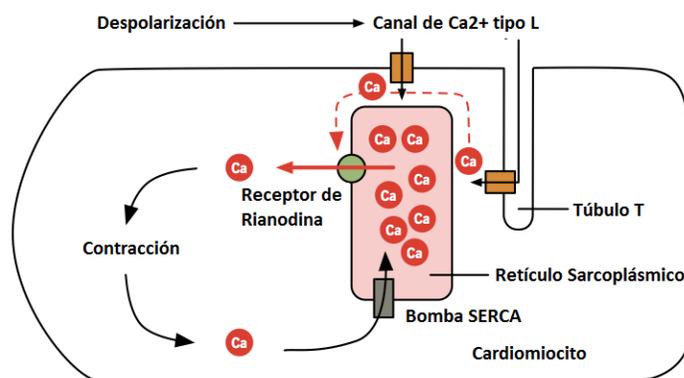


Figura 1.5: Esquema del mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio modificado de [1].

Todo este proceso está sincronizado con la actividad eléctrica de la célula. Los canales tipo L- Ca^{2+} se inactivan hacia el final de la fase 2 lo que detiene al proceso CICR. Al mismo tiempo el Ca^{2+} es retornado a través de la bomba de calcio de retículo sarcoplásmico (SERCA por sus siglas en inglés) y expulsado al medio extracelular por el intercambiador $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$. Una vez que los iones Ca^{2+} se disocian del complejo tropomiocina, la interacción de la actina y la miosina finaliza [1].

1.2. Antecedentes

Se sabe que cuando una célula se somete a un campo eléctrico, ésta se polariza. Esto es, el potencial transmembranal de una mitad de la célula se hiperpolariza y la otra mitad se despolariza (Figura 1.6). Al inducir cambios en la actividad iónica de la célula afecta su fisiología. Es decir se activan eléctricamente secciones de la célula. Cada sección de la membrana a lo largo de la célula experimenta una diferente estimulación del campo, a lo que la célula responde con la activación de corrientes de diferentes magnitudes [9, 10, 11].

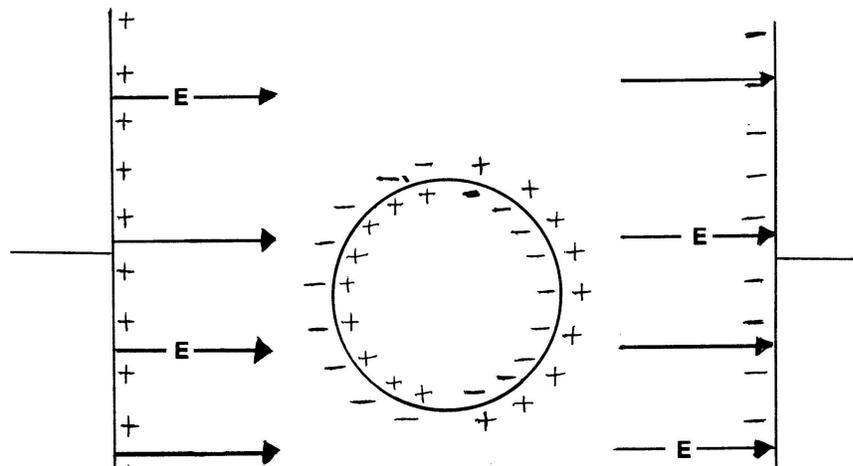


Figura 1.6: Polarización de la célula ante un campo eléctrico. E campo eléctrico.

Diversos estudios que investigan los efectos de la electro-estimulación en parámetros fisiológicos celulares. Parámetros mecánicos, como la contracción en células ventriculares, o eléctricos

como el potencial de acción en células de diversos modelos animales [12], han mostrado los rangos en los cuales se presentan daños celulares por micro lesiones en la membrana (>60 V/cm) y por la modificación de los potenciales de acción cuando alcanzan valores críticos de voltaje [12], o volviendo a la membrana altamente permeable. Asimismo los campos inferiores a los 40 V/cm, estimulan a la célula sin comprometer a la membrana y permiten retornar al potencial de acción a condiciones basales después de algunos segundos.

1.2.1. Caracterización de la dinámica del Ca^{2+} citosólico en células aisladas de corazón

Como se mencionó en la sección 1.1.2, las células marcapasos tienen una alta permeabilidad al ion Ca^{2+} . Esto hace que la mayor parte del tiempo el Ca^{2+} se encuentre presente en el citosol generando oscilaciones periódicas en la concentración.

La frecuencia de las oscilaciones, ha sido caracterizada para células aisladas de corazón del embrión de pollo en [3]. En dicho trabajo la estimulación se realiza bioquímicamente mediante angiotensina II y las oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular se registraron mediante imágenes de fluorescencia. El estudio reveló un aumento en la frecuencia del Ca^{2+} citosólico que, en condiciones basales presenta una frecuencia de 27.8 ± 2.5 oscilaciones por minuto, como se muestra en la Figura 1.7.

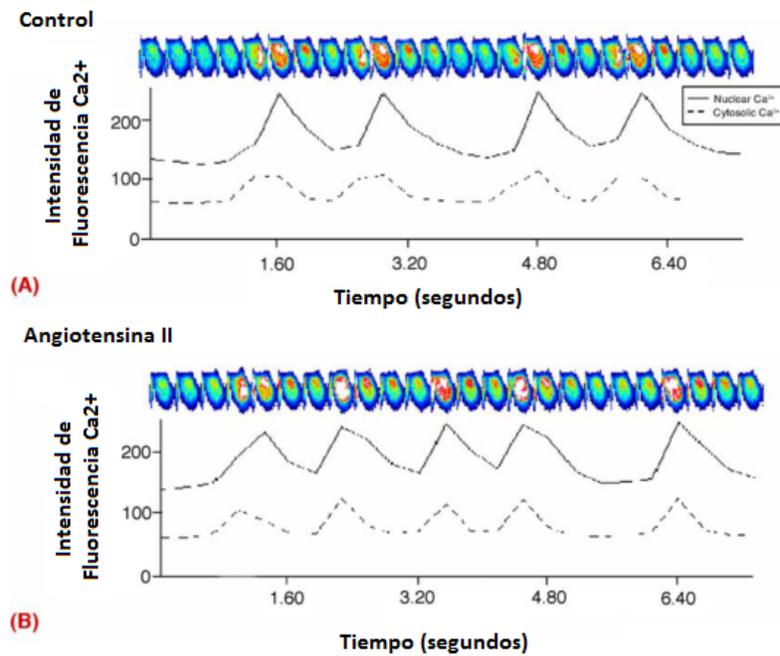


Figura 1.7: a) Oscilación de calcio en condiciones de control b) Oscilación de calcio en presencia de Angiotensina II [3].

En 2004, Creazzo y colaboradores [13] caracterizaron el tiempo promedio de decaimiento al 50 % (499 ± 63 ms) y el tiempo medio en alcanzar la concentración máxima de Ca^{2+} en el citosol, para células de embrión de pollo en diversos días de desarrollo, con la diferencia de que estos transitorios fueron generados por estímulos eléctricos de 0.2 Hz . Esto se realizó en células que tuvieran comportamiento marcapasos nulo o una frecuencia muy baja.

1.2.2. Caracterización del Ca^{2+} citosólico ante estimulación con campos eléctricos

Un estudio realizado por De Paula (1996) sobre las contribuciones de los canales de Ca^{2+} y el retículo sarcoplásmico al incremento Ca^{2+} calcio intracelular en células ventriculares aisladas, mostró los efectos de la estimulación eléctrica a varias frecuencias y los cambios presentados en la dinámica Ca^{2+} . Los resultados revelaron una prolongación de los transitorios

a una frecuencia de estímulo de 0.2 Hz y, un acortamiento a frecuencias alrededor de 1 Hz, acompañado de un fenómeno de escalera, ver la Figura 1.8.

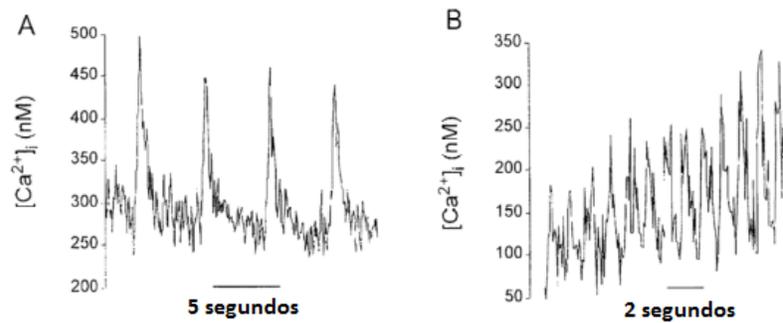


Figura 1.8: A. transitorio de Ca^{2+} suscitado por estimulación a 0.2 Hz B. transitorio de Ca^{2+} suscitado a 1 Hz [4].

Los efectos de la estimulación farmacológica y eléctrica tienen un marcado efecto en las oscilaciones de Ca^{2+} de las células del corazón. Este efecto, es dependiente de la intensidad y frecuencia con la que se realizó el estímulo.

Capítulo 2

Planteamiento del problema

El latido cardiaco está asociado a cambios cíclicos en el potencial de membrana de las células marcapaso. Estos cambios cíclicos pueden ser modulados a través de estímulos por neurotransmisores, hormonas y iones presentes en el medio extracelular [14]. La participación de estos estímulos en las células marcapasos, depende de la demanda del corazón (ej. actividad física), lo cual repercute en la concentración de los iones Na^+ , Ca^{2+} y K^+ en el medio intracelular. Entre estos iones, el Ca^{2+} es el principal catión de la señalización intracelular. Este ion, regula la actividad de enzimas y de mecanismos en el corazón como el de excitación-contracción [15].

En el evento de excitación del corazón, las células del nodo sinoauricular, muestran cambios en la permeabilidad al Ca^{2+} durante el potencial de acción, lo que se traduce en oscilaciones de la concentración de este ion a nivel intracelular. Es de notar que, a pesar de la alta regulación de este ion en el sarcoplasma, la concentración intracelular de Ca^{2+} ante estímulos de cualquier naturaleza es variable [8].

La actividad los de canales iónicos es un proceso estocástico. En la cual, la probabilidad de apertura y cierre, está dada por el potencial transmembranal en el caso de canales voltaje dependientes [16]. Este comportamiento de los canales iónicos, introduce ruido o fluctuaciones en los flujos de los diferentes iones a través de la membrana celular, y por lo tanto influenciando la morfología del potencial de acción de la célula. Esto, ha sido mostrado en trabajos teóricos y experimentales en células ventriculares, donde los cambios en la morfología del potencial de acción, se asocian a la génesis de arritmias [16, 17, 18].

Hay un creciente interés en tomar en cuenta factores estocásticos en la dinámica cardiaca, ya que la génesis de arritmias se ha asociado a inestabilidades a nivel celular [17, 19]. Estudios recientes en órgano completo muestran que, inducir un porcentaje de ruido blanco en el estímulo eléctrico relacionado a los potenciales de acción externos, repercute en la respuesta cardiaca alterando la frecuencia y fuerza de contracción en el corazón. Este trabajo reveló que, a bajos porcentajes de variabilidad, se aumenta el rango de acoplamiento entre la excitación y la contracción [20].

Estudios previos mostrados en la sección 1.2, muestran la respuesta de las oscilaciones de Ca^{2+} en células marcapaso ante estímulos eléctricos y farmacológicos. No obstante, no se ha llevado a cabo un estudio de los cambios en el calcio intracelular en respuesta a estímulos con variabilidad inducida. Por lo que nosotros nos propusimos realizar este tipo de estudio ya que puede tener importantes implicaciones para el entendimiento de algunas cardiopatías, como las arritmias [21].

Como se vio en la sección 1.2. Es posible estimular a células autoexcitables, induciendo su despolarización de forma eléctrica o farmacológica. Sin embargo, para realizar un estudio del efecto de la variabilidad, es necesario tener control de la variabilidad inducida en dicho estímulo. A nivel farmacológico este control es casi nulo [20], por lo que es más conveniente estimular a las células con un tren de pulsos eléctricos rectangulares de corta duración, que pueden ser aplicados a diferentes frecuencias y/o con la adición de diferentes niveles de variabilidad, los cuales representarían las variaciones estocásticas a las que esta sujeta la función del nodo sinoauricular a nivel fisiológico.

Capítulo 3

Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

Una cantidad modulada de variabilidad, adicionada en el estímulo externo a las células marcapasos, influirá en la dinámica del calcio intracelular.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo General

Caracterizar el efecto de la electro estimulación con variabilidad en la dinámica del calcio en células del nodo sinoauricular.

3.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la estimulación eléctrica con diferente frecuencia en la dinámica del calcio intracelular de células del marcapasos del corazón.
- Determinar el efecto de la adición de diferentes niveles de variabilidad a la estimulación eléctrica en la dinámica del calcio intracelular de células del marcapasos del corazón.

Capítulo 4

Metodología y desarrollo experimental

4.1. Selección del modelo animal

El embrión de pollo se ha convertido en un modelo de vertebrado para la biología humana [22]. Este ha sido ampliamente usado (por su tamaño y fácil acceso) en el estudio del desarrollo cardiovascular, vasculogenesis coronaria y cáncer. Desde el primer cultivo de células cardíacas realizado por Borrows en 1912, se han realizado investigaciones en agregados y células aisladas, ya que han mostrado tener la capacidad de mantener o retornar a su estado embrionario. Es decir, el proceso de disociación no afecta la fisiología de la membrana celular.

Estas características de las células aisladas de corazón de embrión, han sido útiles para investigaciones realizadas en cambio de canales iónicos, permeabilidad del potasio, receptores farmacológicos y electro génesis de potenciales marcapaso. En estas células se encuentran canales lentos de Na^+ que son responsables de la corriente I_f que, a diferencia de las células ventriculares no son sensibles a la tetrodotoxina (TTX por sus siglas en inglés). La TTX es una neurotoxina conocida principalmente por bloquear canales rápidos de sodio que están presentes en mayor cantidad en células ventriculares [23]. En resumen, células aisladas de corazón de embrión de pollo son un modelo del nodo sinoaricular.

4.2. Medios de cultivo y disociación celular

- Medio de aislamiento celular: Medio DMEM-F12 (Life Technologies) suplementado con 20 % de Suero fetal bovino (FBS) y 1 % de penicilina / estreptomina.
- Medio estandar de cultivo: Medio DMEM-F12 (Life technologies) suplementado con 3 % de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de penicilina/estreptomina.
- Medio de disociación celular: Tripsina-EDTA (1x) 0.25 % fue disuelta en PBS (Phosphate Buffered Saline) para una concentración final de 0.05 %

4.3. Procedimiento de disociación celular

Los huevos de la cepa ross 308 (Gallina blanca de engorda), provienen de un avícola local (Pollitos San Pedro de Monterrey). Estos llegan a la unidad con 7 días de desarrollo embrionario y se incuban durante los siguientes dos días a 37° C. La humedad en el ambiente cerrado de la incubadora es mantenida con recipientes de agua.

Los cultivos celulares de miocitos ventriculares fueron preparados a partir de embriones de 9 días de desarrollo. Los métodos usados para la obtención de las células fueron establecidos por R.L. DeHaan [24] hace más de 20 años y a los que posteriormente se le realizaron ligeras modificaciones [3, 13, 25]. Las modificaciones consistieron principalmente en el uso de otro tipo de enzima para el aislamiento (ej. Colagenasa, tripsina o una combinación de ambas) y el volumen de medio usado para el cultivo celular: Para este aislamiento se usaron los medios descritos en la sección 4.2.

Los embriones fueron removidos y posteriormente decapitados (según the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)) [26]; sus corazones fueron extraídos, lavados y cortados en fragmentos de 0.5 mm en un buffer libre de calcio y magnesio (PBS). Posterior a esto, fueron transferidos a un tubo ependorff de 2 ml el cual contenía medio DMEM con 1 % de penicilina-estreptomina, con el fin de eliminar del tejido primario bacterias que puedan afectar su posterior cultivo.

Luego de una leve agitación en el vortex, se descartó el medio y se reemplazó por 2 ml de tripsina al 0.05 %. Los fragmentos se mantuvieron en un agitador magnético a 37° por 10 minutos para eliminar otros tipos de células (eritrocitos y fibroblastos) [25]. Pasado este tiempo se desecha el sobrenadante y se adiciona 1 ml de enzima fresca, repitiendo nuevamente

el proceso anterior por periodos de 8 minutos y colectando los dos siguientes sobrenadantes, que se pasaran por una malla de nylon $40\ \mu\text{m}$ (Bd Falcon). A continuación se tomó un nuevo tubo de 12 ml en el cual, las células quedaron suspendidas en medio de aislamiento DMEM como medio inhibidor de la tripsina. Seguido a esto, se centrifugo la suspensión celular a 1100 rpm (revoluciones por minuto) por 10 minutos, esto dejo un pellet que se colecto en medio estándar de cultivo y se sembró en portaobjetos de 25 mm dentro de cajas petri de 35 mm tratados con laminina a $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ [27]. Finalmente, se dejaron toda la noche en incubación a una atmósfera de 5% CO_2 y 95% aire a una temperatura de 37° . Durante todo el periodo de extracción de cardiomiocitos se mantuvo las condiciones de esterilidad.

4.3.1. Carga de FLUO-4 AM

Las células se cargaron con el indicador de Ca^{2+} intracelular denominado Fluo 4/AM (Molecular Probes, Eugene, OR), acorde a métodos descritos en [3, 28, 29] para Fluo 3/AM. Antes de cargar las células adheridas a los cubreobjetos, se lavaron varias veces en solución fisiológica Tyrode, la cual contuvo 10 mM NaHCO_3 , 5 mM HEPES , 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 2.7 mM KCl , 137 mM NaCl , 3.6 mM NaH_2PO_4 y 5.5 mM Dextrosa, todo ajustado pH 7.4 con NaOH. Los cardiomiocitos fueron cargados con el Fluo 4/AM a una concentración final de $13\ \mu\text{M}$ final en medio DMEM, e incubados por 45 minutos a $28^\circ\ \text{C}$. Luego de ese periodo de incubación se lavaron por cinco minutos más para asegurar la completa hidrólisis de los grupos ester y exceso de molécula que quedo presente en el medio (Figura 4.1).

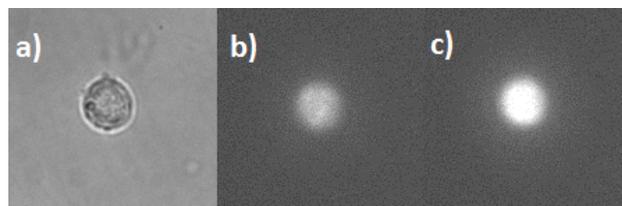


Figura 4.1: Células incubadas con la molécula Fluo-4 AM vista con un objetivo 40X. El recuadro a) Muestra una célula de corazón típica luego del proceso de disociación. Los recuadros b) y c), muestran a la misma célula luego del proceso de incubación. en b) se aprecia una baja intensidad respecto a c), asociado a una baja presencia de calcio intracelular. c) por otra parte muestra una intensidad de fluorescencia mayor respecto a b), asociada a alta presencia de calcio intracelular.

4.4. Estimulación eléctrica

4.4.1. Estimulación eléctrica sin variabilidad

Para realizar la estimulación a las células se contó con un generador de funciones programado en la LabView, cuya interfaz gráfica permite modular la señal de salida. Esta tarjeta no entrega un voltaje superior a los 5V por lo que fue necesario hacer un amplificador personalizado para este proyecto en vista de que los voltajes necesarios para estimulación están arriba de los 10 V. Las salidas del circuito van a una cámara de perfusión con campo de estimulación modelo RC-21BRFS. Un esquema de la misma se muestra en la Figura 4.2.

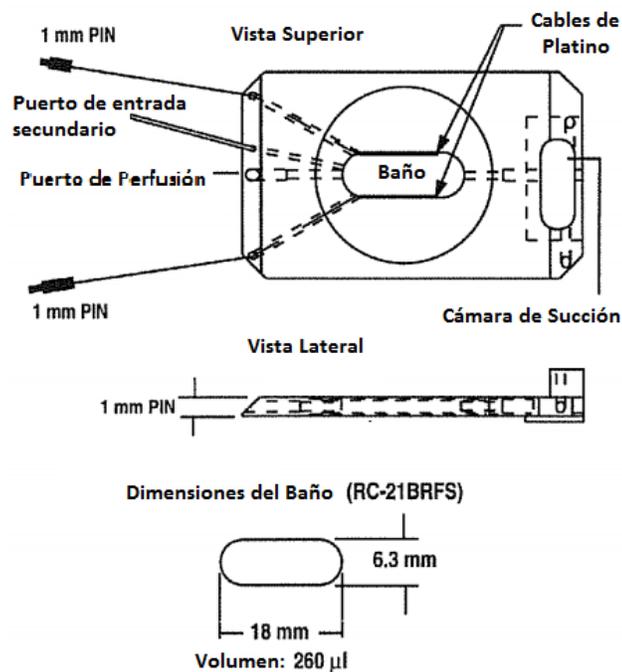


Figura 4.2: Camara de perfusión

Una vez que la cámara experimental y el cultivo estuvieron preparados, se seleccionaron células viables que mostraron signos visibles como frecuencia sostenida y un tamaño no superior a 50 μM . Para medir este diámetro se hizo uso del software del microscopio el cual tiene una graduación por pixel para objetivos de 63x en aceite de inmersión, que fue el usado para hacer los registros. Las especificaciones de la configuración del microscopio se expondrán más adelante.

Para la primera serie de experimentos, el protocolo de electro-estimulación es el siguiente: los shocks eléctricos fueron liberados con frecuencias de 0.5 Hz , 1 Hz y 1.5 Hz y una amplitud de 15 V, como se observa en la Figura 4.3. Esto genero un campo eléctrico uniforme de 30 V/cm con una duración de 10 ms como se realizó en estudios previos [10, 12, 4]. Las ventanas de estimulación tuvieron una duración de 30 segundos. En la ventana inicial se registró el comportamiento basal de la célula y en las siguientes se monitoreo las frecuencias de estímulo anteriormente mencionadas. Posterior a cada ventana de estímulo se permitió 30 segundos de relajación, para un registro total de tres minutos.

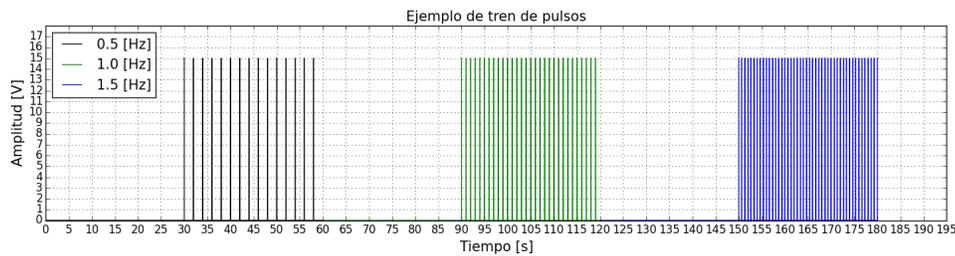


Figura 4.3: Ejemplo de la señal periódica aplicada al primer grupo experimental con varias frecuencias de estímulo

Para el segundo grupo experimental, la señal con la que se estimulo es como la mostrada en la Figura 4.4, donde difiere del primer grupo experimental en los siguientes aspectos: la frecuencia de estímulo fue constante (1 Hz) con adición de ruido en la amplitud en la primera ventana de estimulación, y la duración de los registros se restringieron a dos minutos.



Figura 4.4: Ejemplo de la señal periódica aplicada para el segundo grupo experimental

4.4.2. Estimulación eléctrica con variabilidad

Para la segunda parte de los experimentos, se realizó el mismo protocolo mencionado anteriormente, pero se centró la atención en la frecuencia de 1 Hz, a la cual se le indujo ruido blanco

aditivo con variaciones en la amplitud del 10 %, 20 % y 30 %. Un ejemplo de la morfología de la señal de estímulo se puede observar en la Figura 4.5.

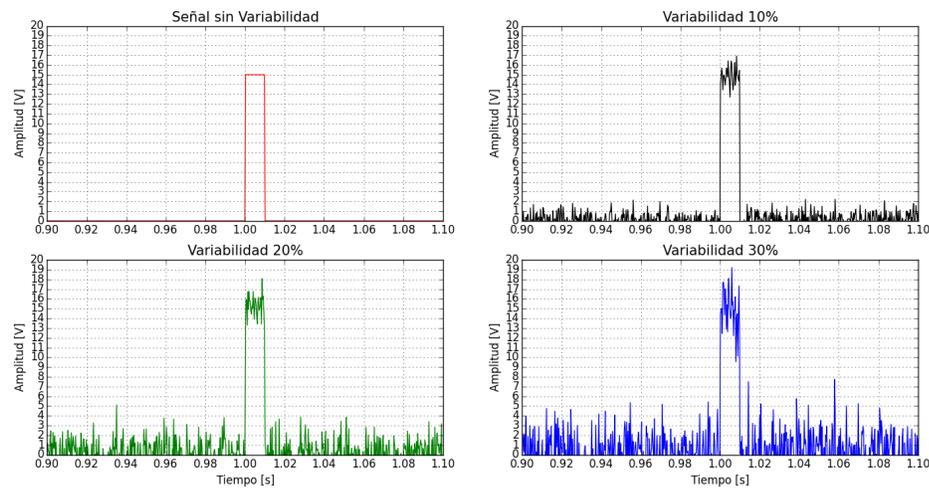


Figura 4.5: Pulsos rectangulares de eléctrico-estimulación con diferentes porcentajes de variabilidad

Aquí el pulso fue liberado de la siguiente forma: una ventana de 30 segundos de control, la siguiente se estimuló con ruido, otra ventana de reposo y finalizando con estimulación sin ruido. Esto se realizó con el fin de comparar entre las ventanas de estímulo.

4.5. Obtención de imágenes

La dinámica del calcio intracelular fue obtenida en imágenes mediante microscopia confocal en el modo line scan, el cual provee una alta resolución de muestreo manteniendo la información temporal en una dimensión [30] (Leica TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope). Brevemente, la configuración del microscopio fue la siguiente: se usó el láser de Helio -Neón (488 nm) dirigido directamente a la muestra. En la célula se seleccionó una línea de 10 μm , la cual fue registrada continuamente a una frecuencia de 500 Hz. Con esta configuración se obtuvieron imágenes en una dimensión de la concentración de Ca^{2+} en el interior de la célula. Cada imagen consistió de 2000 líneas que temporalmente corresponden a 4 segundos de registro. La Figura 4.6 muestra un ejemplo del tipo de imagen obtenida bajo esta configuración. Finalmente se obtuvo, un registro por cada célula de 30 cuadros correspondiente a dos minutos.

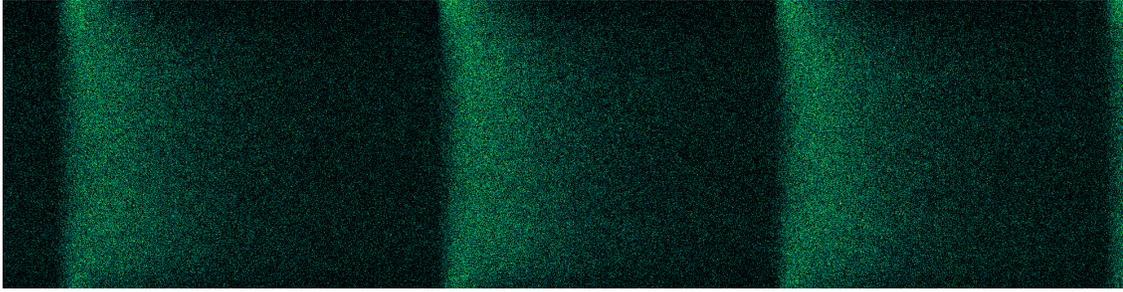


Figura 4.6: Ejemplo de un cuadro obtenido mediante el modo line scan, correspondiente a 4 segundos de registro

Adicionalmente se registró un cuadro, para obtener el ruido de fondo del plano registrado. Esto se hizo por cada experimento.

4.6. Procesamiento de las imágenes

Para procesar las imágenes se utilizaron las librerías disponibles de procesamiento y análisis de datos del lenguaje de programación PYTHON. Luego de que se obtuvieron las imágenes, se procedió a convertir cada cuadro a escala de grises calculando la media ponderada de cada uno de los colores que componen la imagen (Figura 4.7). Adicionalmente a esto, se promedió las intensidades de cada una de las líneas obteniendo una señal como la que se muestra en la Figura 4.7 b. Como se observa, la señal fue muy irregular, pero se ven las tendencias de subida y bajada. Aun así fue necesario restar el ruido de fondo y suavizar la señal registrada como se mencionó sección 4.5.

4.7. Parámetros de interés de la señal

Las señales obtenidas son periódicas (Figura 4.7), por lo que de cada ventana dentro de la señal (estimulada con o sin ruido) se obtuvieron parámetros como la frecuencia característica (Obtenido partir del espectro de potencias). Otros, como la amplitud, se calcularon a partir de la diferencia entre el promedio de los máximos y el promedio de los mínimos. El tiempo de subida, hace referencia al intervalo de tiempo desde un mínimo hasta el siguiente máximo. Y por último, los tiempos de decaimiento, para los cuales se tomó como referencia el pico o el máximo de cada oscilación y el tiempo que le toma a partir de ahí en decaer el 10 %, 50 %

y 90% de la amplitud, lo que habla del tiempo que permanece el Ca^{2+} en el interior de la célula.

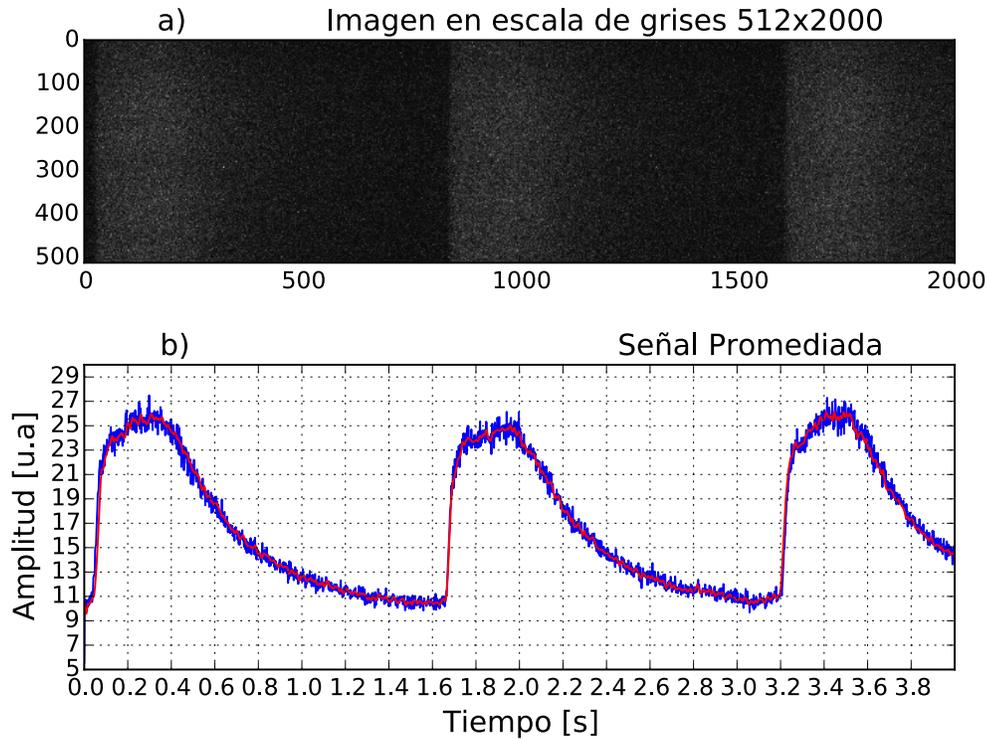


Figura 4.7: a) Ejemplo de una Imagen en escala de grises b) Señal promediada

Una vez se obtuvo la señal, se procedió a normalizar respecto al promedio de los mínimos en esa ventana. Para esto se aplicó la fórmula de fluorescencia integrada, la cual es:

$$F_n = \frac{F - F_0}{F_0}$$

- F : Es la fluorescencia promediada desde la imagen sin el ruido de fondo
- F_0 : Es el promedio de los mínimos por cada ventana en la señal.
- F_n : Fluorescencia normalizada respecto al promedio de los mínimos.

4.8. Estadística

Todos los valores numéricos son expresados como el promedio \pm error estándar de la media (S.E.M por sus siglas en inglés), y n representa los diferentes cultivos celulares, los cuales fueron 8 para el primer grupo experimental y 8 para cada nivel de variabilidad contando un total de 24 cultivos.

Los resultados fueron analizados mediante la prueba t-Student pareada a dos colas, un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de múltiple comparación entre grupos (Tukey-Krammer), tomando como significantes todos aquellos p - *valor* < 0.05 .

Aislamiento Celular

Luego del proceso de disociación celular, se obtuvieron células con un rango de tamaños entre $10 \mu\text{m}$ y $60 \mu\text{m}$. De las cuales, se seleccionaron las que no mostraron ningún signo de daño en la membrana (blebbing), las que quedaron en el centro del portaobjetos en la caja de cultivo y las que mantuvieron una oscilación de Ca^{2+} constante. En el microscopio confocal se verificaron las anteriores condiciones, la Figura 4.8a muestra la morfología de una célula marcapasos vista con un objetivo de 63x en campo claro. Los recuadros b y c de la Figura 4.8 muestra un plano de la misma célula representando baja y alta intensidad de fluorescencia, asociado a baja y alta concentración de Ca^{2+} intracelular.

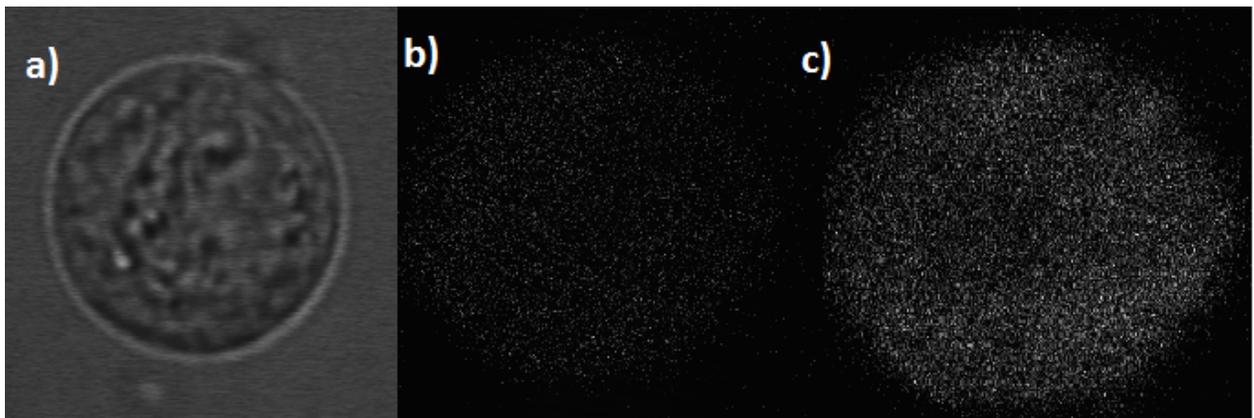


Figura 4.8: Célula aislada vista en microscopio confocal a) Campo claro b) Fluorescencia bajo nivel de Ca^{2+} c) Fluorescencia Alto nivel de Ca^{2+}

Capítulo 5

Resultados

Los parámetros cuantificados en cada gráfica se compararon con el comportamiento basal de la célula, aquí llamado control.

La Figura 5.1 representa un registro típico de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en células ventriculares de embrión de pollo de 9 días de desarrollo, estimuladas a diferentes frecuencias. De aquí cabe destacar varios efectos de la electro-estimulación. Uno de ellos es que a medida que hay un aumento en la frecuencia, se establece una nueva línea basal repercutiendo en la amplitud y en un aumento en el número de eventos presentados por ventana.

5.1. Estímulo eléctrico sin variabilidad a diferentes frecuencias

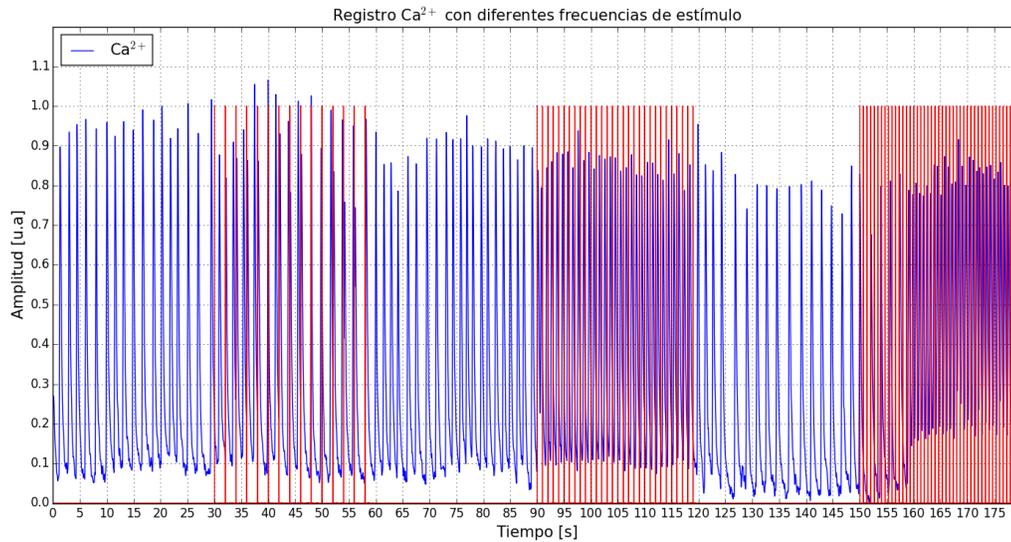


Figura 5.1: Registro Temporal de las oscilaciones de Ca²⁺ citosólico con ventanas de estímulo sin variabilidad a diferentes frecuencias

La ventana inicial de los registros, corresponde a los primeros 30 segundos tomados como el control de todos los demás parámetros a medir como frecuencia, amplitud de la señal y tiempos de decaimiento (Figura 5.2). Para esta ventana, en promedio la frecuencia de las oscilaciones de Ca²⁺ fue de 0.71 ± 0.053 Hz. Este valor se obtuvo a través del cálculo del espectro de potencias. Recordemos que este fue uno de los criterios de selección de células viables (frecuencia sostenida alrededor de ese valor).

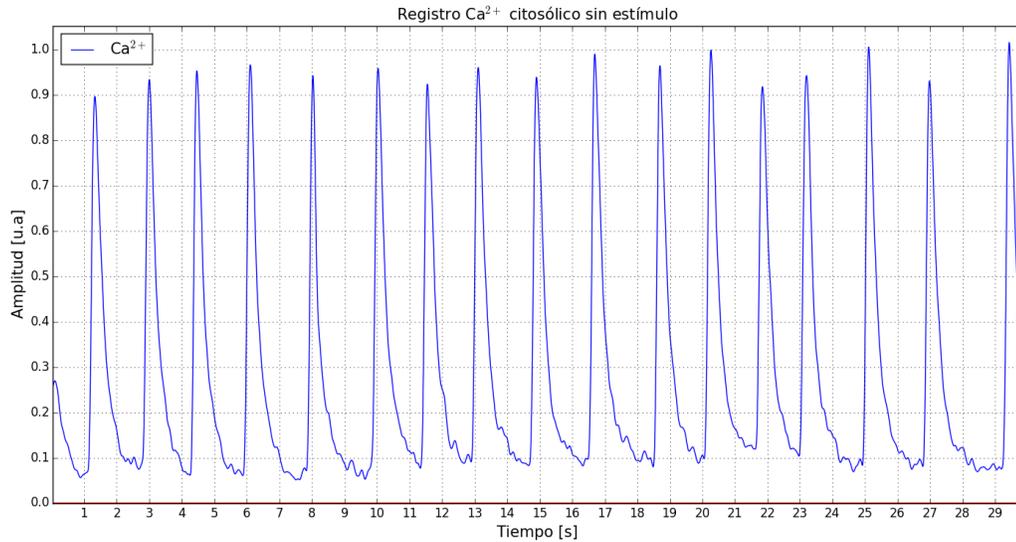


Figura 5.2: Ventana temporal inicial de las oscilaciones de Ca^{2+} citoplasmático en condiciones basales (Control)

La amplitud de la señal fue calculada como la diferencia entre el promedio de los máximos y el promedio de los mínimos. Esto se hizo para cada ventana y se reporta en unidades arbitrarias (u.a.). Para los tiempos de decaimiento se tomaron tres porcentajes (10%, 50%, 90%) correspondientes a la disminución de Ca^{2+} intracelular expresados en milisegundos (ms).

Las Figuras ?? corresponden a cada una de las ventanas de estimulación de 30 segundos. En ellas se observa que hay una respuesta al estímulo aplicado (rojo), el cual afectó los parámetros de la señal como: la frecuencia, la amplitud, los tiempos de subida y decaimiento. Estos cambios se cuantificaron y agruparon en las Figuras 5.6, 5.7, 5.8.

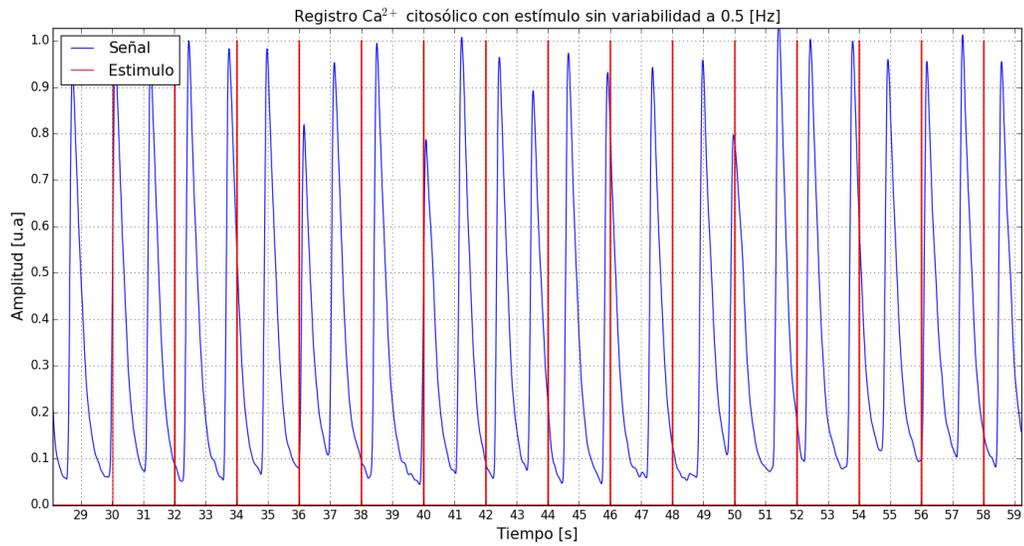


Figura 5.3: Registro de oscilaciones de Ca²⁺ citosólico con estimulación a 0.5 Hz

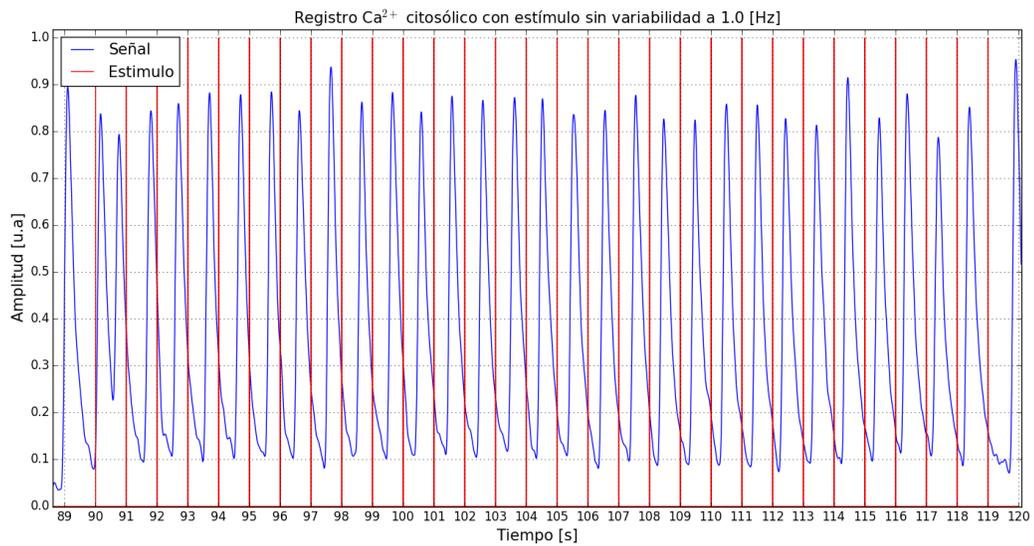


Figura 5.4: Registro de oscilaciones de Ca²⁺ citosólico con estimulación a 1.0 Hz

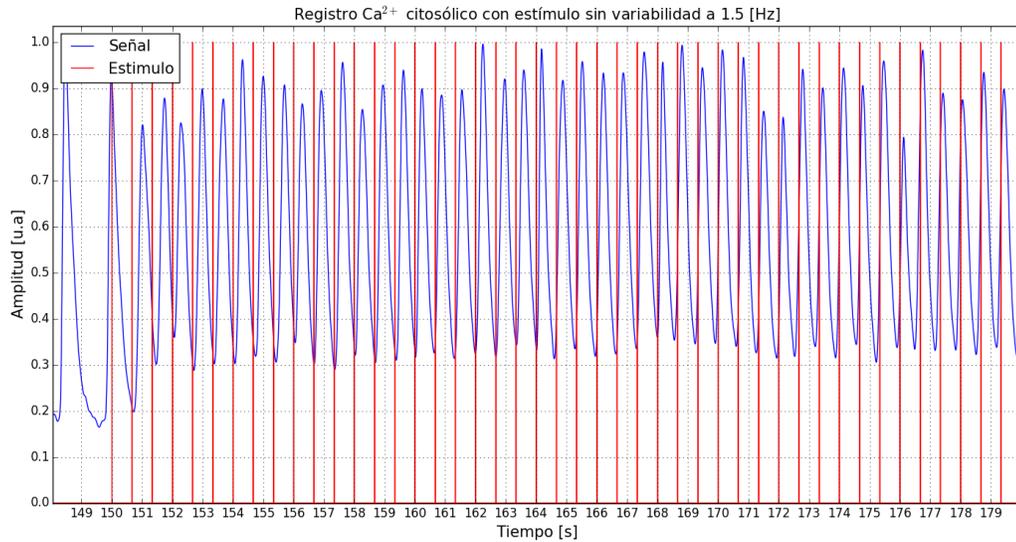


Figura 5.5: Registro de oscilaciones de Ca²⁺ citosólico con estimulación a 1.5 Hz

En la Figura 5.6, se observan las diferencias cualitativas entre la frecuencia basal de las oscilaciones de calcio y la respuesta de estas ante diferentes frecuencias de estímulo. Comparando la frecuencia basal de las oscilaciones con la frecuencia de respuesta ante un estímulo de 0.5 Hz, no se observan diferencias notables. Esto puede deberse a la frecuencia de estímulo, ya que es menor al promedio de la frecuencia basal de las oscilaciones. No obstante, entre la frecuencia basal y la frecuencia de estimulación a un 1 Hz, si se presentó diferencias. Nótese como a una frecuencia de estímulo a 1 Hz, la oscilación de calcio responde alrededor de la misma frecuencia.

Aunque fue posible estimular con una frecuencia de 1.5 Hz. La respuesta de la oscilación fue variable dado que, no se aproximó a la frecuencia de estímulo y las barras de error estándar fueron más amplias que las observadas a la frecuencia de estímulo a 1 Hz.

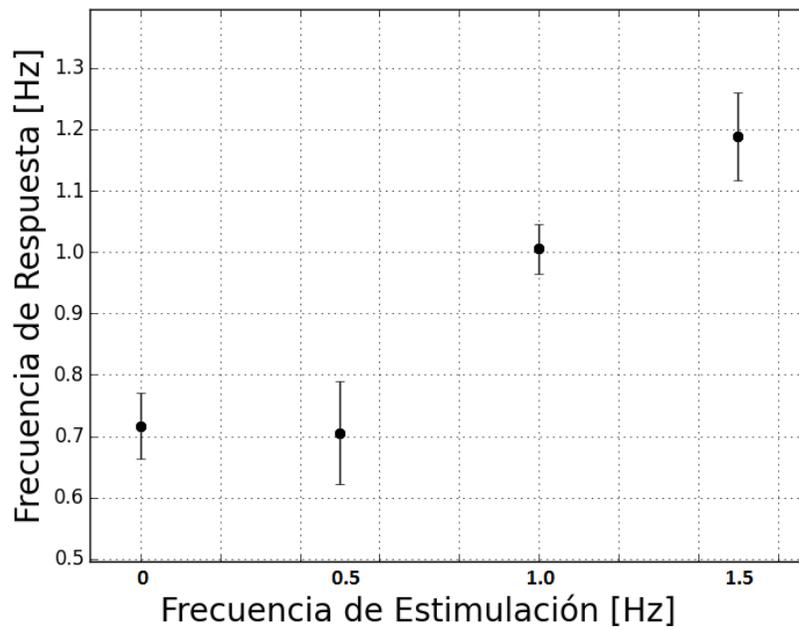


Figura 5.6: Relación entre la frecuencia respuesta vs la frecuencia del estímulo aplicado

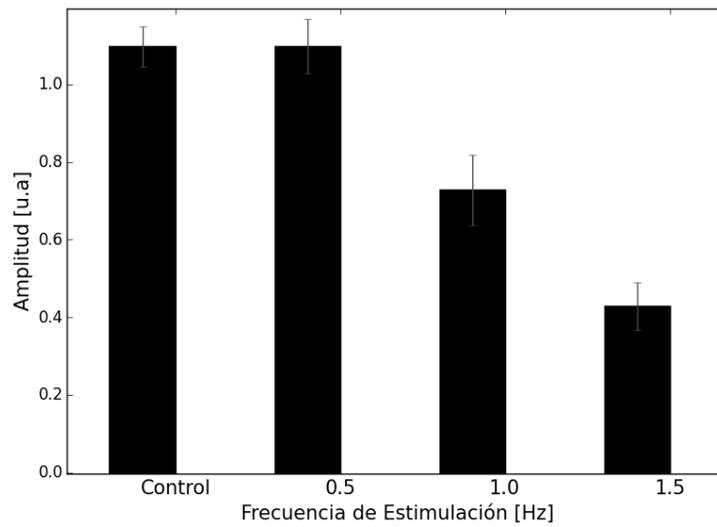


Figura 5.7: Respuesta en la amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico ante diferentes frecuencias de estímulo

La Figura 5.7, muestra la respuesta de la amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} a las diferentes frecuencias de estímulo. Se observa, como la respuesta en la amplitud a la frecuencia de

estímulo de 0.5 Hz, se mantiene respecto a la amplitud de la oscilación basal. Las diferencias en las amplitudes son notorias a medida que se aumenta la frecuencia del estímulo, como dejan ver las frecuencias de 1 Hz y 1.5 Hz.

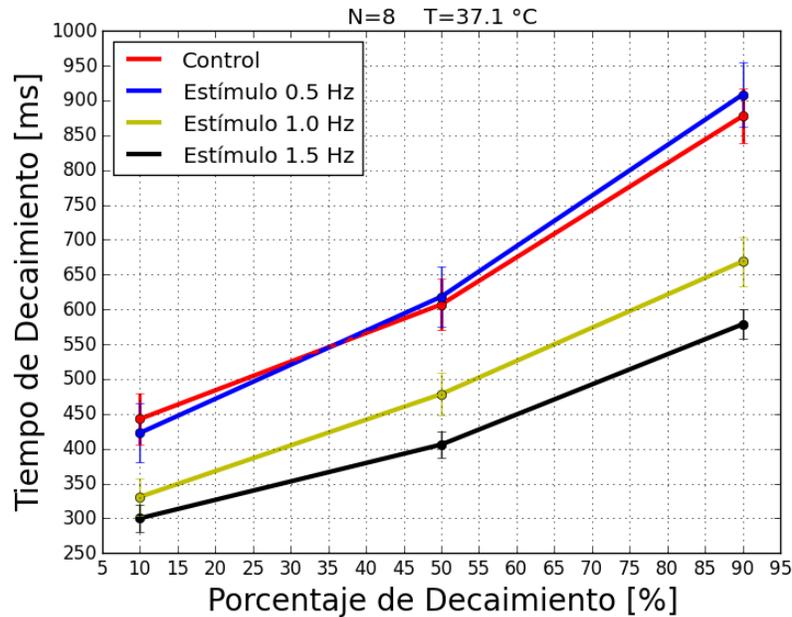


Figura 5.8: Porcentajes de decaimiento Ca^{2+} intracelular para cada ventana de estímulo

Los tiempos de decaimiento, tampoco muestran diferencias significativas entre el control y la frecuencia de estímulo a 0.5 Hz, pero se aprecian cambios entre las demás frecuencias y el control. En cuanto a los tiempos de decaimiento, se nota una disminución en el 10%, 50% y 90% entre la ventana de 1 Hz y 1.5 Hz (Figura 5.8). Nótese como estos decaimientos concuerdan con los de la amplitud. A medida que se establece una nueva línea basal (reduciendo la amplitud), los tiempos de decaimiento de la concentración de Ca^{2+} disminuyen.

5.2. Variabilidad en el estímulo eléctrico

Como se observó en los resultados de la sección 5.1, la frecuencia a la que mejor respondió el primer grupo experimental fue a la frecuencia de 1 Hz. Estos resultados mostraron que a la frecuencia de estímulo de 1.5 Hz, la línea basal subió 30% respecto a la frecuencia de estímulo a 1 Hz (Figura 5.1). Este aumento, en conjunto con el tiempo que duró la ventana de estímulo puede ocasionar daños en la célula [31]. A continuación, se presentan los efectos

de los porcentajes de ruido en los parámetros mencionados anteriormente. A partir de aquí, el nivel de variabilidad del 10% será señalado con negro, el 20% será señalado con verde y el 30% será señalado con azul.

5.2.1. Frecuencia de respuesta ante estímulos con variabilidad

Como se presentó en los antecedentes se quiso saber si la variabilidad induciría algún cambio en la frecuencia a la que mejor respondieron las células. Por esta razón, a cada ventana (con ruido y sin ruido) se le encontró la frecuencia característica. La Figura 5.9 muestra la frecuencia de respuesta de las oscilaciones de Ca^{2+} ante estímulos con variabilidad, comparado con la frecuencia de respuesta ante estímulos sin variabilidad. De la comparación entre los grupos no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.85$).

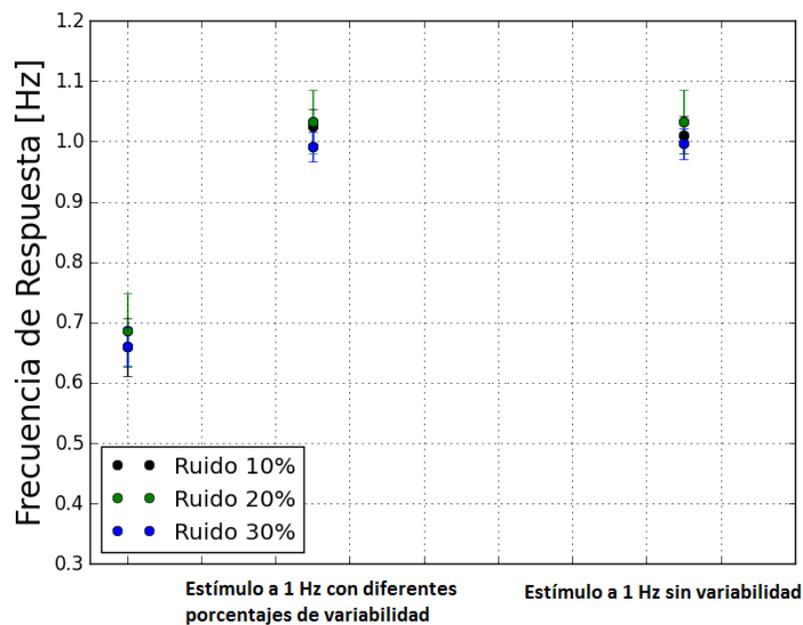


Figura 5.9: Cuadro comparativo entre la frecuencia de respuesta ante estímulos con variabilidad vs estímulos sin variabilidad para cada grupo experimental

5.2.2. Amplitud en la señal con variabilidad en el estímulo

La Figura 5.10 muestra la amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} para cada porcentaje de variabilidad. Nótese, la similitud en la amplitud basal con la de la Figura 5.7 de la sección 5.1. Las barras negras en la posición 10%, 20% y 30%, indican la amplitud de las oscilaciones en la ventana estimulada con variabilidad. Mientras que las barras blancas indican, la amplitud de las oscilaciones en la ventana del estímulo sin variabilidad. De aquí, cabe destacar el grupo estimulado con 10% de variabilidad que, aunque presenta una diferencia significativa con su control y con el grupo de 20%, no tiene diferencias significativas con el grupo de 30% como la mostró la prueba estadística.

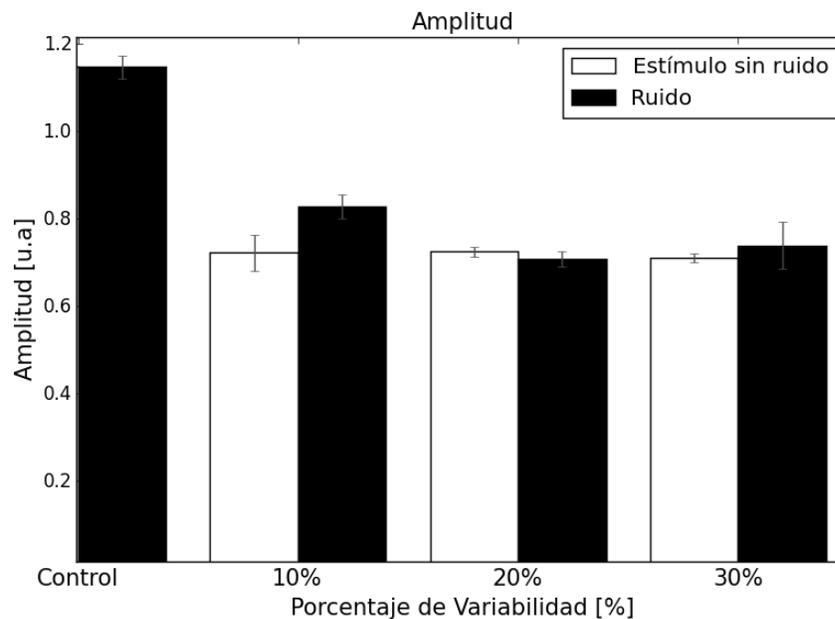


Figura 5.10: Barras comparativas en la amplitud estímulo con ruido vs estímulo cuadrado

5.2.3. Efecto de la variabilidad en los tiempos de subida

Los diferentes porcentajes de variabilidad en el estímulo, no parecen haber afectado el tiempo de subida de la dinámica de Ca^{2+} . La Figura 5.11 agrupa los tiempos de subida promedio por cada grupo estimulado con y sin variabilidad, sin mostrar diferencias significativas entre los grupos.

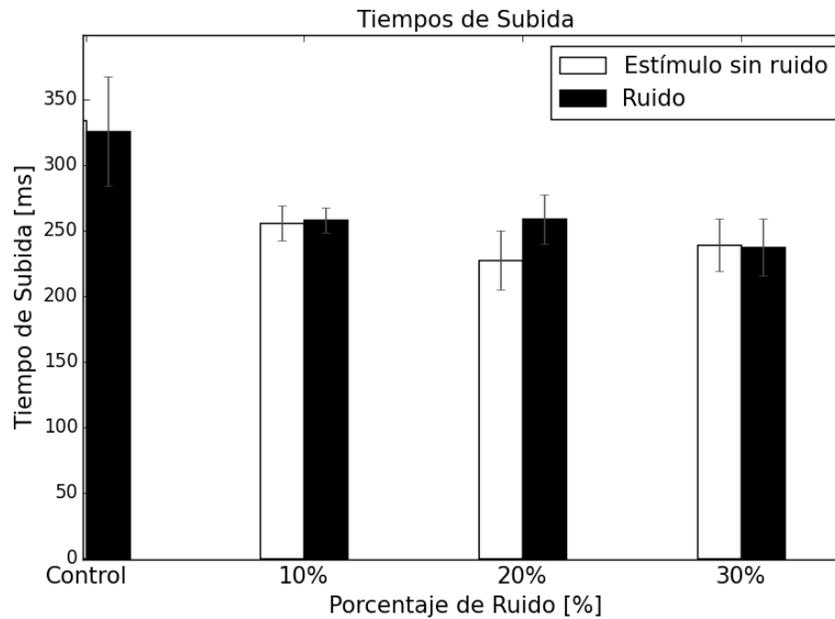


Figura 5.11: Efecto de la variabilidad en el tiempo de llegada al máximo del Ca^{2+} en el citosol

5.2.4. Efecto de la variabilidad en los tiempos de decaimiento

Una vez que las cantidades anteriores no arrojan diferencias significativas, queda contrastar la dinámica de salida del Ca^{2+} por medio de sus decaimientos. Esta es la dinámica de salida o remoción del medio intracelular. La Figura 5.12 muestra un cambio notable respecto al control sin estímulo. Sin embargo, al cuantificar las diferencias entre estímulos no hay cambio notable. Resultados similares se obtienen para el grupo de decaimientos con 20 % de variabilidad como se observa en la Figura 5.13.

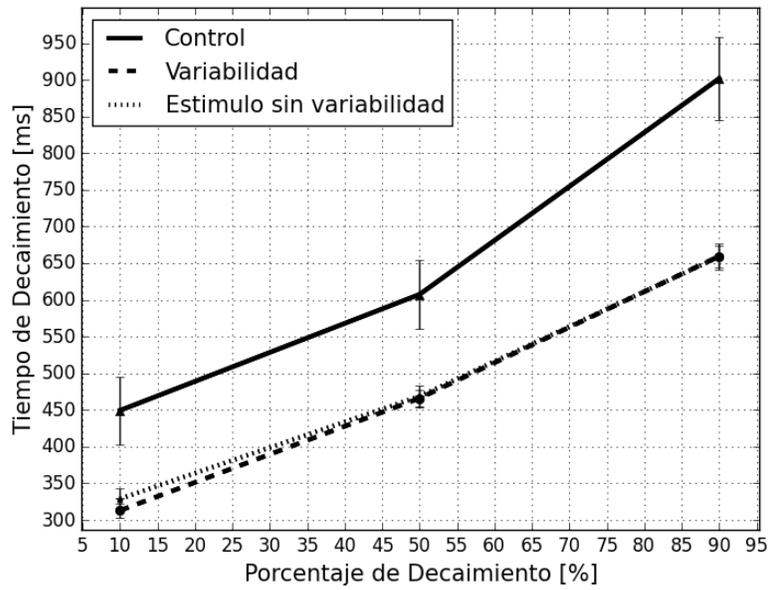


Figura 5.12: Decaimientos ante estímulos con variabilidad de 10 %

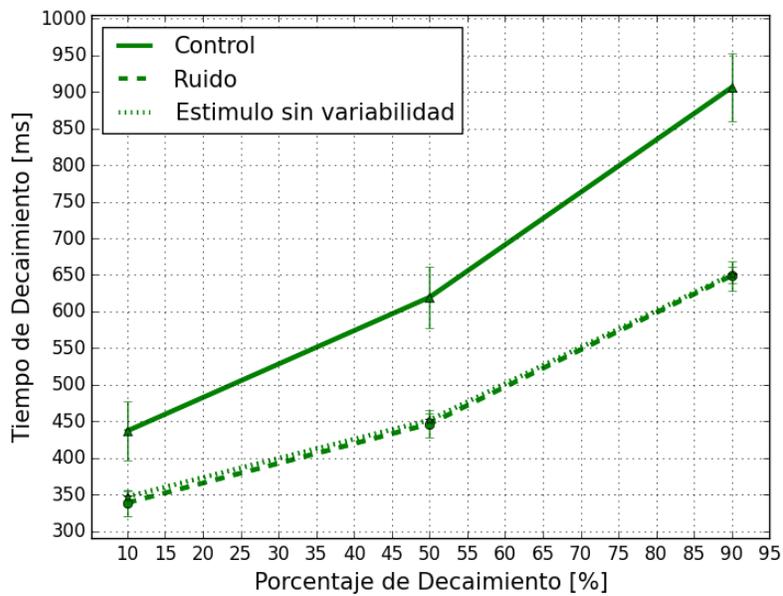


Figura 5.13: Decaimientos ante estímulos con variabilidad de 20 %

Al realizar la comparación para el grupo 30 % de variabilidad contra los grupos anteriores (10 %,20 %), se encontró que para 10 % de su decaimiento, las diferencias no son marcadas.

Sin embargo, para el tiempo de decaimiento al 50 % se observa una ligera tendencia de separación entre las medias. Con variabilidad en el estímulo al 50 %, la media fue de 512 ± 24 ms, mientras para el estímulo sin variabilidad la media estuvo alrededor de los 470 ± 21 ms. Aunque la comparación entre grupos no fuera significativa para los dos decaimientos anteriores (10 %,50 %), si lo fue para el decaimiento al 90 % ($p < 0.027$) ver la Figura 5.14.

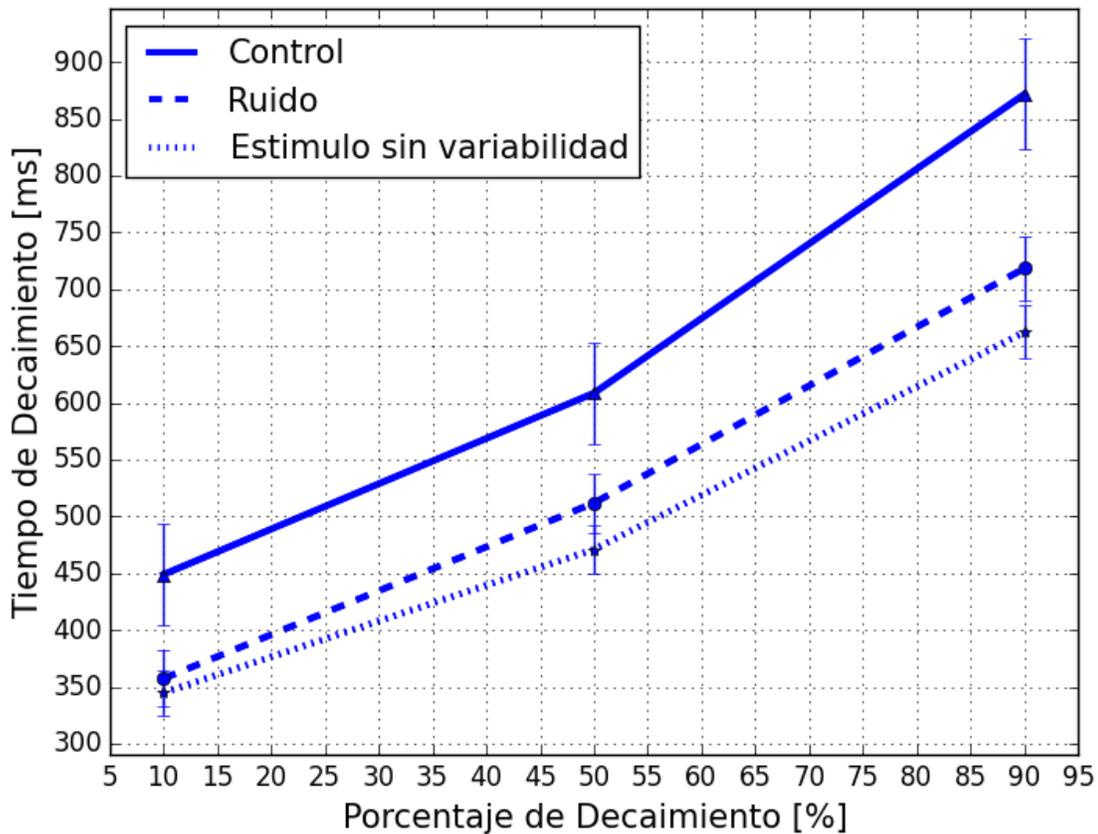


Figura 5.14: Decaimientos ante estímulos con variabilidad de 30 %

Para observar mejor las tendencias de las medias de forma cualitativa, se presentan los decaimientos de los tres grupos en la Figura 5.15. Note que al 50 % del decaimiento, las barras de error estándar del grupo estimulado con 30 % de variabilidad no se cruzan con el de 10 % y 20 %. No obstante, esta diferencia no resulto ser estadísticamente significativa.

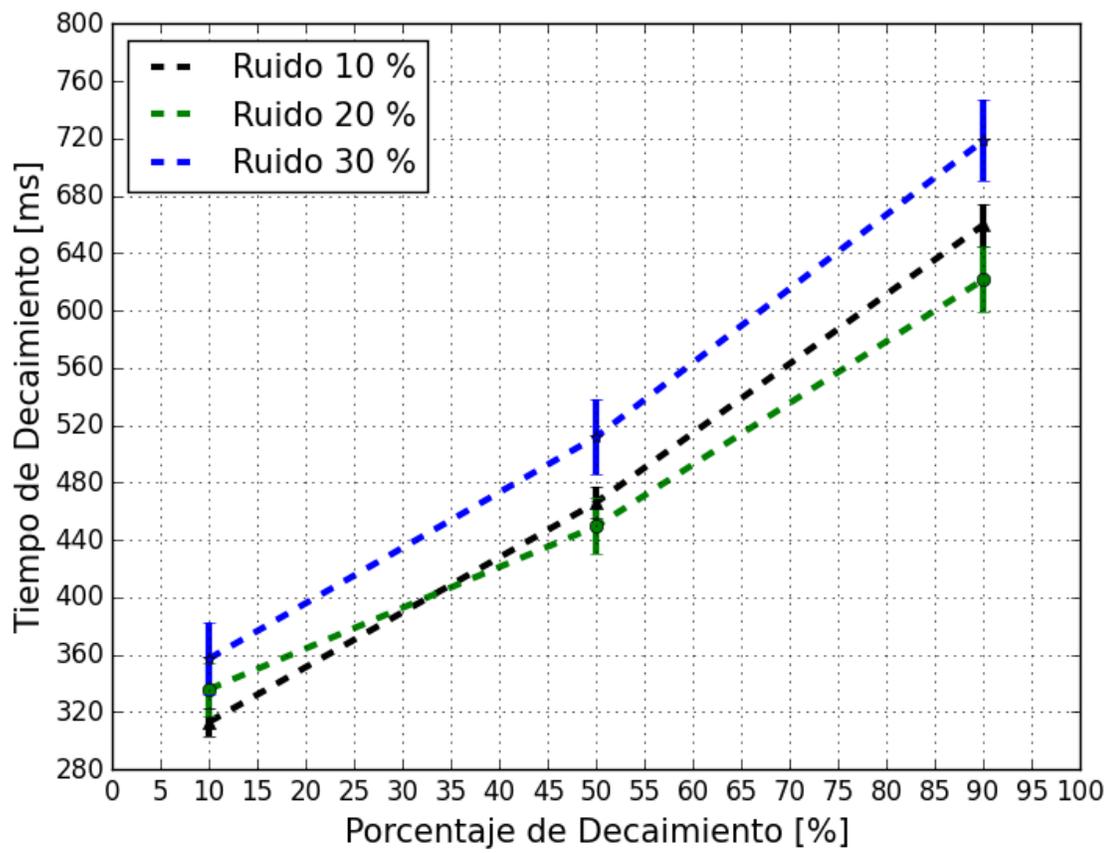


Figura 5.15: Decaimientos para cada nivel de variabilidad

Capítulo 6

Discusión

Para este estudio, se realizaron registros de las oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular de corazón embrionario de pollo, mediante Fluo-4 AM y microscopia confocal. Estos registros fueron usados para localizar la distribución de calcio citosólico. Sin embargo, a diferencia de reportes anteriores [3], se utilizó el modo “line escan”, el cual permite una resolución temporal alta permitiendo estudios de la dinámica del Ca^{2+} en el orden de milisegundos, sin perder resolución espacial [32]. Esto es posible dado que el tamaño de las células no excede las $100\mu\text{m}$, a diferencia de las células ventriculares ya diferenciadas de otros mamíferos. Tener una buena resolución temporal fue crucial para este trabajo debido al alto control del calcio intracelular que tienen las células, que ocasiona que estos cambios pueden estar en el orden de milisegundos. Las diferencias en la morfología de los incrementos temporales de calcio mediante el modo de escaneo de líneas (Figura 5.1), permitió obtener mayor detalle para cuantificar los parámetros que se mostraron en la sección anterior.

En este trabajo se muestra la fuerte influencia que tiene la estimulación por campos eléctricos sobre el calcio intracelular en células que presentan actividad espontánea sostenida. Esto ya había sido reportado [4] en células ventriculares con estimulaciones a bajas y altas frecuencias. Aquí se mostró que, a la frecuencia de estímulo a 1 Hz se presenta un cambio en la amplitud acompañado de un aumento en la concentración basal, la cual no está bien entendida. Sin embargo, en la participación de los mecanismos reguladores en la remoción Ca^{2+} intracelular, estudios previos proponen una activa participación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en mantener baja la concentración Ca^{2+} intracelular [4].

Los resultados para el primer grupo experimental sin ruido mostraron que, para las dos frecuencias de estimulación a 1.0 Hz y 1.5 Hz, se presentó un efecto en el aumento de la

concentración basal (Figura 5.4, Figura 5.5, Figura 5.10). Esto puede deberse, a que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no es lo suficientemente rápido entre estímulo y estímulo, para remover todo el Ca^{2+} proveniente de la entrada de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y el liberado de las fosas del retículo sarcoplasmico [4, 12].

Los resultados también mostraron que, la frecuencia de estimulación a 0.5 Hz no afectó significativamente ningún parámetro de la oscilación de Ca^{2+} . Con base en estos resultados podría suponerse que, al ser la frecuencia de estímulo menor al promedio de la frecuencia basal de las oscilaciones, la actividad del intercambiador no se ve afectada. Aunque la frecuencia de 1 Hz de estimulación es relativamente alta (en comparación con la basal), en promedio las diferentes células la siguen en su respuesta en frecuencia y el tiempo de decaimiento de la concentración de Ca^{2+} al 50 %, con acuerdo con resultados experimentales reportados anteriormente [4].

Al realizar las comparaciones entre los grupos experimentales que fueron estimulados con variabilidad, se observó que no hubo cambios en los parámetros medidos (respuesta en frecuencia, amplitud de la oscilación, tiempo de subida y decaimientos de los grupos de 10 % y 20 %). Esto puede deberse a que la variabilidad en la amplitud del estímulo eléctrico, resulta ser insuficiente para provocar otro tipo de respuesta en la concentración intracelular de Ca^{2+} . No obstante, para el nivel de variabilidad del grupo de 30 % en su etapa final (decaimiento al 90 %), se observa una respuesta más lenta. Es probable que los umbrales de activación de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, sean los responsables de esta respuesta [12]. La amplitud variable del estímulo (30 %) puede o no despolarizar completamente la membrana, dejando tiempo suficiente para que la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no sea interrumpida.

Capítulo 7

Conclusiones y Perspectivas

7.1. Conclusiones

Con los resultados obtenidos tanto del control como del estímulo con variabilidad se puede concluir que:

- Existe un efecto de la variabilidad inducida en el estímulo eléctrico en la despolarización de la célula, que resulta en un cambio de la dinámica del decaimiento del Ca^{2+} intracelular en su etapa final.
- Los porcentajes bajos de variabilidad inducida en el estímulo eléctrico, no alteran significativamente la dinámica del calcio intracelular inducida por estímulos eléctricos sin ruido.

7.2. Perspectivas

Este trabajo se limitó a estudiar la dinámica del calcio ante despolarizaciones inducidas con variabilidad en célula aislada. Sin embargo, no se conocen los efectos que puedan tener en la dinámica de los demás iones, como el sodio y el potasio. Lo que deja preguntas abiertas de interés biomédico.

Por otra parte, en la realidad biológica, estas células se encuentran unidas a otras células de su misma naturaleza (autoexcitables), lo que comprende una dinámica iónica más compleja y poco conocida ante variabilidad en sus despolarizaciones. Por lo anterior, sería interesante realizar estudios de esos efectos en agregados celulares.

Bibliografía

- [1] Greg Ikonnikov and Yelle Dominique. PHYSIOLOGY OF CARDIAC CONDUCTION AND CONTRACTILITY, 2016.
- [2] Mr Clarkson. Cardiac Action Potentials, 2010.
- [3] Ghassan Bkaily, Nesrine El-Bizri, Moni Nader, Khaled M. Hazzouri, Julie Riopel, Danielle Jacques, Domenico Regoli, Pedro D’Orleans-Juste, Fernand Gobeil, and Levon Avedanian. Angiotensin II induced increase in frequency of cytosolic and nuclear calcium waves of heart cells via activation of AT1 and AT2 receptors. *Peptides*, 26(8):1418–1426, 2005.
- [4] M A De Paula Brotto and T I Creazzo. Ca²⁺ transients in embryonic chick heart: contributions from Ca²⁺ channels and the sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, 270:H518–H525, 1996.
- [5] Guyton and Hall. *Tratado de Fisiología Médica*, volume 1. Elsevier, 2011.
- [6] F Conti. *FISIOLOGIA MEDICA*. McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2010.
- [7] Larraitz Gaztañaga, Francis E. Marchlinski, and Brian P. Betensky. Mecanismos de las arritmias cardiacas. *Revista Espanola de Cardiologia*, 65(2):174–185, 2012.
- [8] Augustus O. Grant. Cardiac ion channels. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 2(2):185–194, 2009.
- [9] Jason M Meunier, Natalia A Trayanova, and Richard A Gray. Effects on Single Cells M \ I. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, pages 1619–1630, 1999.
- [10] B a Stone, M Lieberman, and W Krassowska. Field stimulation of isolated chick heart cells: comparison of experimental and theoretical activation thresholds. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 10(1):92–107, 1999.

- [11] J L Jones, R E Jones, and Glenn Balasky. Microlesion formation in myocardial cells by high-intensity electric field stimulation. *The American journal of physiology*, 253(2 Pt 2):H480–6, 1987.
- [12] Victor Krauthamer and Janice L. Jones. Calcium dynamics in cultured heart cells exposed to defibrillator-type electric shocks. *Life Sciences*, 60(22):1977–1985, 1997.
- [13] Tony L Creazzo, Jarrett Burch, and Robert E Godt. Calcium buffering and excitation-contraction coupling in developing avian myocardium. *Biophysical journal*, 86(2):966–977, 2004.
- [14] Claudia Lerma, Trine Krogh-Madsen, Michael Guevara, and Leon Glass. Stochastic aspects of cardiac arrhythmias. *Journal of Statistical Physics*, 128(1-2):347–374, 2007.
- [15] Donald M Bers. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(January):198–205, 2002.
- [16] D Colquhoun and A G Hawkes. On the stochastic properties of single ion channels. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 211(1183):205–235, 1981.
- [17] M Zaniboni, a E Pollard, L Yang, and K W Spitzer. Beat-to-beat repolarization variability in ventricular myocytes and its suppression by electrical coupling. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 278(3):H677–H687, 2000.
- [18] Antti J. Tanskanen and L. H R Alvarez. Voltage noise influences action potential duration in cardiac myocytes. *Mathematical Biosciences*, 208(1):125–146, 2007.
- [19] Jiying Ma and Dongmei Xiao. Effects of Calcium-Channel Noise on Dynamics of Excitation-Contraction Coupling in Paced Cardiac Cells. 2013, 2013.
- [20] Alberto Peña-Romo, Ana María Gámez-Méndez, Amelia Ríos, Bruno A. Escalante, and Jesús Rodríguez-González. Noise enhanced the electrical stimulation-contractile response coupling in isolated mouse heart. *International Journal of Cardiology*, 221:155–160, 2016.
- [21] Vinod Sharma and Leslie Tung. Effects of uniform electric fields on intracellular calcium transients in single cardiac cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 282(1):H72–9, 2002.
- [22] Kristin H Kain, James W I Miller, Celestial R Jones-paris, Rebecca T Thomason, John D Lewis, David M Bader, Joey V Barnett, and Andries Zijlstra. The chick embryo as

- an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. *NIH Public Access*, 243(2):216–228, 2014.
- [23] Nick Sperelakis. for Studying Cardiac Reaggregate Model Toxicology by Nick Sperelakis *. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 26 (Oct., 1978), pp. 243-267, 26:243–267, 1978.
- [24] R. L. DeHaan. Regulation Embryonic of Spontaneous Growth Culture of in Tissue. *Dev. Biology*, 249:216–249, 1967.
- [25] Gary R Skuse and Maureen C Ferran Editors. *Cardio- myocytes*.
- [26] Cwru Iacuc. Avian Embryo Use Summary. *Building*, (216):77–78, 2008.
- [27] Philipp Sasse, Jianbao Zhang, Lars Cleemann, Martin Morad, Juergen Hescheler, and Bernd K Fleischmann. Intracellular Ca²⁺ oscillations, a potential pacemaking mechanism in early embryonic heart cells. *The Journal of general physiology*, 130(2):133–144, 2007.
- [28] G Bkaily, P Pothier, P D’Orléans-Juste, M Simaan, D Jacques, D Jaalouk, F Belzile, G Hassan, C Boutin, G Haddad, and W Neugebauer. The use of confocal microscopy in the investigation of cell structure and function in the heart, vascular endothelium and smooth muscle cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 172(1-2):171–194, 1997.
- [29] N El-Bizri, G Bkaily, S Wang, D Jacques, D Regoli, P D’Orleans-Juste, and R Sukarieh. Bradykinin induced a positive chronotropic effect via stimulation of T- and L-type calcium currents in heart cells. *Can J Physiol Pharmacol*, 81(3):247–258, 2003.
- [30] Jörg Hüser, Peter Lipp, and Ernst Niggli. Confocal microscopic detection of potential-sensitive dyes used to reveal loss of voltage control during patch-clamp experiments. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 433(1-2):194–199, 1996.
- [31] J. L. Farber. The role of calcium ions in toxic cell injury. *Environmental Health Perspectives*, 84(d):107–111, 1990.
- [32] Ghassan Bkaily, Nadine Gros-Louis, Radha Naik, Doris Jaalouk, and Pierre Pothier. Implication of the nucleus in excitation contraction coupling of heart cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 154(2):113–121, 1996.

EL JURADO DESIGNADO POR LA **UNIDAD MONTERREY**, DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, APRUEBA LA TESIS:

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA VARIABILIDAD EN EL ACOPLAMIENTO ELÉCTRICO-IÓNICO DEL CALCIO EN CÉLULAS DEL NODO SINOAURICULAR

QUE PRESENTA EL LIC. **CARLOS ALBERTO DIAZ GALINDO** PARA SU EXAMEN FINAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERIA Y FÍSICA BIOMÉDICAS, EL DÍA 15 DE SEPTIEMBRE DEL AÑO 2016.

DR. JESÚS GUADALUPE RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

DR. DANIEL PAULO SÁNCHEZ HERRERA

DR. MOISÉS SANTILLÁN ZERÓN