



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

Efecto del campo eléctrico variable en la dinámica del calcio  
intracelular en células excitables

Tesis que presenta  
**Alberto Luis Ramírez Hurtado**

para obtener el Grado de  
**Maestro en Ciencias**

con especialidad en  
**Ingeniería y Física Biomédicas**

Dirección de la tesis: **Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González**  
**Dr. Daniel Paulo Sánchez Herrera**

## **AGRADECIMIENTOS**

A través de estas líneas quiero expresar mi agradecimiento a todos quienes sin su apoyo y acompañamiento la realización de este proyecto no hubiera podido ser posible.

A Lindelia Hurtado, mi madre, porque gracias a su esfuerzo y sacrificio estoy ahora culminando una etapa más de mi vida profesional. Y a mi familia en general, por su constante apoyo.

A Ángela Jaramillo, pues gracias a su ejemplo, apoyo y compañía, este camino fue mucho más enriquecedor.

A mis asesores, el Dr. Daniel Sánchez y el Dr. Jesús Rodríguez, por permitirme trabajar bajo su tutela, pues mediante su guía este proyecto pudo culminar satisfactoriamente.

A mis compañeros, pues la retroalimentación que me dieron fue vital.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por patrocinar este proyecto y al Cinvestav Unidad Monterrey por abrirme sus puertas y apoyarme en la elaboración de este proyecto de investigación.

## CONTENIDO

ABREVIATURAS .....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.1. Marco teórico .....	8
1.1.1. Músculo cardíaco .....	9
1.1.2. Potencial de acción .....	9
1.1.3. Sistema de conducción .....	12
1.1.4. Dinámica de calcio intracelular.....	13
1.2. Antecedentes.....	15
1.2.1. Estimulación con campos eléctricos.....	15
1.2.2. Variabilidad en sistemas fisiológicos .....	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	17
3. HIPÓTESIS .....	19
4. OBJETIVOS .....	20
4.1. Objetivo general.....	20
4.2. Objetivos específicos .....	20
5. METODOLOGÍA.....	21
5.1. Cultivo celular .....	22
5.2. Soluciones .....	22
5.3. Fluorescencia .....	22
5.4. Microscopía .....	23
5.5. Estimulación con campo eléctrico.....	23
5.6. Selección de los parámetros de estimulación.....	24
5.7. Protocolo de estimulación.....	25
6. RESULTADOS .....	27
6.1. Cuantificación de resultados.....	27
6.2. Estadística .....	29
6.3. Diferencias en amplitudes.....	30

6.4. Diferencias en velocidades de subida.....	31
6.5. Diferencias en velocidades de decaimiento.....	32
7. DISCUSIÓN .....	34
8. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	40
8.1. Conclusión .....	40
8.2. Perspectivas .....	41
9. REFERENCIAS.....	42

## ABREVIATURAS

Ca <sup>2+</sup> :	Catión de calcio.
Na <sup>+</sup> :	Catión de sodio.
K <sup>+</sup> :	Catión de potasio.
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa:	Intercambiador de sodio por potasio.
Cl <sup>-</sup> :	Anión de cloro.
NSA:	Nodo sinoauricular.
NAV:	Nodo aurículo-ventricular.
HCN:	Canales activados por hiperpolarización y por nucleótidos cíclicos.
NCX:	Intercambiador sodio por calcio.
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> :	Concentración de calcio intracelular.
RyR:	Canal de receptor de rianodina.
SERCA:	Bomba de calcio de los retículos sarcoplasmático y endoplasmático.
I <sub>Ca,L</sub> :	Corriente de calcio tipo L.
I <sub>Ca,T</sub> :	Corriente de calcio tipo T.
CaCl <sub>2</sub> :	Cloruro de calcio.
MgCl <sub>2</sub> :	Cloruro de magnesio.
KCl:	Cloruro de potasio.
NaCl:	Cloruro de sodio.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	Fosfato de sodio monobásico.
NaOH:	Hidróxido de sodio.

## RESUMEN

Recientemente se ha visto que el ruido amplía el ancho de banda de sincronización en la respuesta del acoplamiento entre la estimulación eléctrica y la contracción de corazones aislados de ratón. También, se ha estudiado el efecto de los campos eléctricos variables en el acoplamiento eléctrico-iónico del calcio en células auto-excitables, encontrando un efecto de la variabilidad en la dinámica del decaimiento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en su etapa final. A partir de estos hallazgos se cree que un campo eléctrico variable puede afectar el comportamiento de la dinámica de calcio intracelular en células excitables. Se estimularon las células con un protocolo de 2 pulsos de campo eléctrico donde el primer pulso siempre fue aplicado sin variabilidad mientras que al segundo pulso se le añadieron diferentes niveles de variabilidad, se midió el calcio intracelular mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados mostraron que la estimulación con variabilidad tuvo un efecto tanto en la concentración máxima de calcio, como en la velocidad de ingreso del calcio a la célula, mientras que no mostró un efecto significativo en la velocidad de decaimiento de la dinámica de calcio intracelular.

## **ABSTRACT**

It has recently been seen that noise amplifies the synchronization bandwidth in the electrical stimulation-contractile response coupling of isolated mouse heart. Also, the effect of variable electric fields on the electric-ionic calcium coupling in self excitable cells has been studied, the last found an effect in the final stage of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics by the added variability. From these findings it is believed that a variable electric field can affect the behavior of intracellular calcium dynamics in excitable cells. The cells were stimulated with 2 pulses of electric field protocol where the first pulse was always applied without variability while different levels of variability were added in the second pulse, the intracellular calcium was measured by fluorescence microscopy. The results showed that stimulation with variability influenced both the maximum calcium concentration and the rate of calcium entry into the cell, while it did not show a significant effect on the decline rate of the intracellular calcium dynamics.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Marco teórico

El corazón es el órgano encargado de bombear la sangre a todos los tejidos del cuerpo a través del sistema vascular. Está constituido principalmente por tejido muscular (miocardio). Su actividad mecánica depende de la propagación de un potencial de acción a lo largo del tejido muscular el cual constituye un sincitio funcional con la continuidad eléctrica a través de los discos intercalares que forman uniones con forma de hendidura entre una célula y otra, o a través de unas células musculares especializadas (sistema de conducción), las cuales poseen una gran similitud a los cardiomiocitos, pero que exhiben una mínima contracción (figura 1.1). [1]

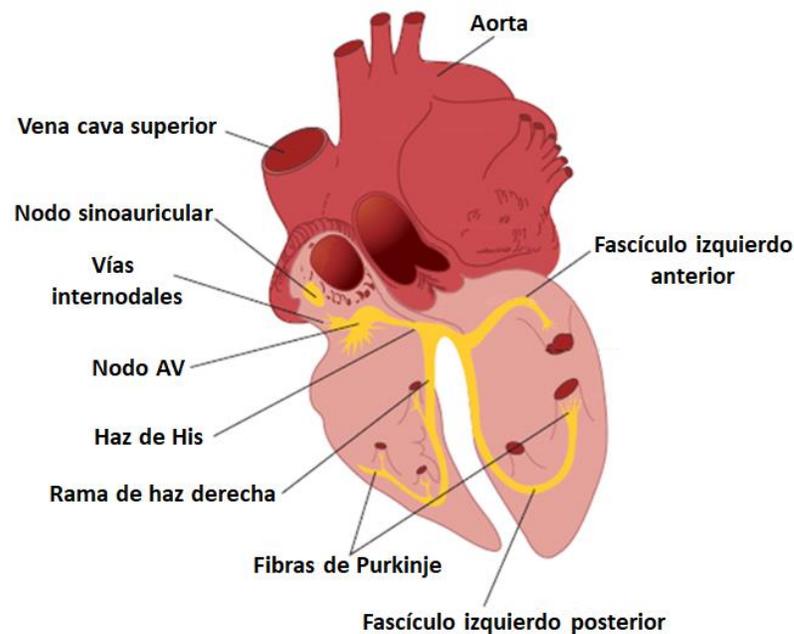


Figura 1.1 Propagación del impulso en el corazón modificado de [1].

### 1.1.1. Músculo cardíaco

Se puede considerar que el corazón en general se compone de 2 grupos celulares principales: células excitables (músculo auricular y ventricular) y las células auto-excitables (células especializadas en la ritmicidad y transmisión del impulso cardíaco). La contracción de las células auriculares y ventriculares es muy similar a la de las células de músculo esquelético solo que la duración de su contracción es mayor, mientras que las células encargadas de la ritmicidad y la conducción del estímulo exhiben poca o ninguna contracción en absoluto; en el caso de las células del nodo sinoauricular que controlan la ritmicidad, la característica principal es su capacidad de auto excitarse [2].

El corazón está compuesto por dos sincitios, el sincitio auricular que conforma las paredes de las aurículas izquierda y derecha, y el sincitio ventricular que conforma las paredes de los ventrículos izquierdo y derecho; los estímulos normalmente no se transmiten de aurículas a ventrículos, dado que se encuentran separados por un tejido fibroso que rodea las válvulas auriculo-ventriculares.

### 1.1.2. Potencial de acción

El potencial de acción de las células de músculo ventricular (figura 1.2) tiene una amplitud promedio de 105 mV, es decir, el potencial intracelular aumenta desde el valor en el reposo, de alrededor de -80 mV hasta alcanzar aproximadamente los 25 mV durante cada latido cardíaco. Luego del aumento repentino del potencial de membrana, la misma permanece despolarizada en una fase llamada "meseta" seguida por una repolarización abrupta.

El potencial de acción en células del miocardio tiene 5 fases (figura 1.2):

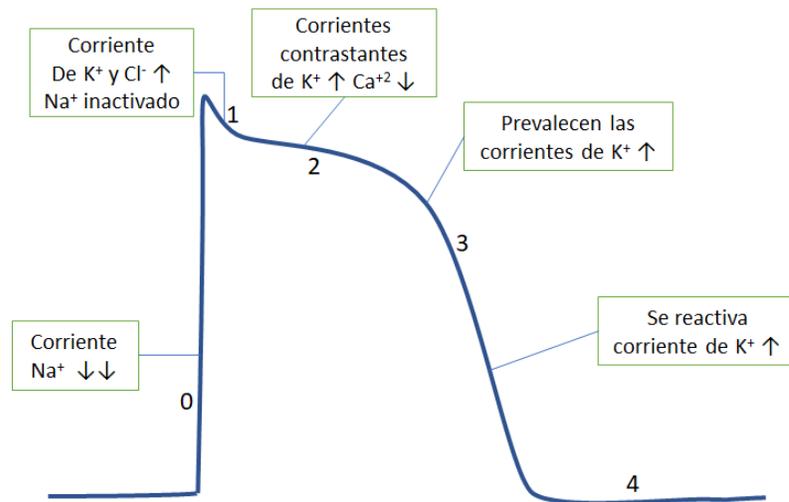


Figura 1.2 Potencial de acción en células de miocardio modificado de [1]

Fase 0: es la fase de despolarización rápida, corresponde a la pendiente más pronunciada en el potencial de acción; se debe a la apertura de los canales rápidos de sodio, esto genera una rápida activación de la conductancia de la membrana para el  $\text{Na}^+$  dando lugar a la entrada de tal ion hacia el interior de la célula; de esta manera el potencial de membrana se despolariza, alejándose del potencial de equilibrio del  $\text{K}^+$  (-98 mV) y acercándose al potencial de equilibrio del  $\text{Na}^+$  (+67 mV) [3].

La apertura de los canales rápidos de sodio durante esta fase está estrechamente relacionada con el potencial de membrana en el momento de la excitación; si el potencial de membrana se encuentra en su valor basal (aproximadamente -85 mV), todos los canales rápidos de sodio estarán en el estado cerrado y de esta manera todos estarán disponibles para abrirse a la hora de ser estimulados. Pero si el potencial de membrana es menos negativo (como es el caso de una hipoxia), algunos canales rápidos de sodio estarán en estado inactivo, por lo cual habrá menos cantidad de canales disponibles para ingresar  $\text{Na}^+$  a la célula debido a un estímulo externo.

Fase 1: tiene lugar cuando en el momento que los canales rápidos de sodio se inactivan, hay una activación transitoria de canales de  $K^+$ . Es conocida también como corriente de salida transitoria.

Fase 2: esta fase lleva como nombre "plateau" o meseta y sucede cuando hay un equilibrio entre el movimiento hacia el interior del  $Ca^{2+}$  a través los canales de calcio dependientes de voltaje (que se activan cuando el potencial de membrana alcanza  $-40$  mV aproximadamente) y el flujo hacia el exterior del  $K^+$  a través de los canales lentos de potasio.

Fase 3: los canales voltaje-dependientes de calcio se cierran, mientras que los canales lentos de potasio permanecen abiertos. Esto genera un flujo de corriente hacia el exterior de la célula correspondiente al cambio negativo en el potencial de membrana, promoviendo que otros tipos de canales para el  $K^+$  se abran (principalmente los canales rápidos para de  $K^+$ ). Esta corriente neta positiva hacia el exterior (igual a la pérdida de cargas positivas por la célula) causa la repolarización celular. Los canales de  $K^+$  se cierran cuando el potencial de membrana recupera un valor de  $-80$  a  $-85$  mV.

Fase 4: esta fase corresponde al potencial de membrana de reposo por actividad de la bomba Na/K ATPasa, la cual envía 3 iones de sodio al exterior al mismo tiempo que introduce 2 iones de potasio del exterior al interior de la célula.

Durante el potencial de acción la célula presenta el periodo refractario absoluto que tiene lugar en las fases 0, 1, 2 y parte de la 3, donde la célula es refractaria a la iniciación de un nuevo potencial de acción, es decir, es incapaz de despolarizarse debido a que los canales están inactivos. Esto es un mecanismo de protección, que limita la frecuencia de los potenciales de acción que puede generar el corazón, permitiéndole así tener el tiempo necesario para llenarse y expulsar la sangre. También evita que el corazón realice

contracciones sostenidas, de tipo tetánico, como ocurre en el músculo esquelético. Al final del periodo refractario absoluto, hay un periodo refractario relativo, en el cual es necesaria una despolarización por encima del umbral para desencadenar un potencial de acción. En este caso, como no todos los canales de sodio están en reposo, los cambios en el potencial generados durante el periodo refractario relativo tienen una pendiente menor y una amplitud menor y no son suficientes para la generación del potencial de acción. Cuando todos los canales de sodio regresan a su estado cerrado en el reposo, la célula es de nuevo completamente activable, y puede generar un potencial de acción normal.

### 1.1.3. Sistema de conducción

El grupo de células responsable de la ritmicidad se encuentran en el nodo sinoauricular (NSA) el cual tiene una marcada actividad marcapasos, el potencial de acción generado por estas células es entonces propagado por el tejido de conducción auricular, quien ayuda a su rápida propagación por los cardiomiocitos auriculares inicialmente y lo conduce al nodo auriculoventricular (NAV). Este último se caracteriza por la propagación más lenta del impulso que alcanza el ventrículo después de un retraso considerable, propagándose después por el fascículo auriculoventricular, conocido como el haz de His, el cual atraviesa el tabique auriculoventricular y se desdobra en dos ramas (izquierda y derecha) finalizando en los fascículos de las células de Purkinje [1] [2].

Durante el recorrido del impulso eléctrico, se logra su difusión eficaz por todos los cardiomiocitos ventriculares, haciendo que estos se contraigan en respuesta a esta estimulación eléctrica, generando así el ciclo de bombeo de la sangre, y con cada potencial de acción rítmico generado por el marcapasos, se da lugar al inicio de cada ciclo de bombeo, repitiéndose la misma historia.

Cada uno de los grupos celulares que componen el corazón, exhiben ligeras diferencias en su comportamiento (figura 1.1) las cuales son generadas por su dinámica de intercambio iónico; el comportamiento iónico de las células del NSA ha sido ampliamente estudiado [4], [5]; este tipo de células involucran canales y transportadores entre los que se destacan: canales de calcio dependientes de voltaje ( $\text{Ca}^{2+}$ ) tipo L y tipo T, canales de potasio ( $\text{K}^+$ ), canales activados por hiperpolarización y por nucleótidos cíclicos (HCN), intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) e intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que en conjunto son los responsables de la generación rítmica de potenciales de acción, que como se ha dicho, finaliza con la contracción de los miocitos ventriculares.

#### 1.1.4. Dinámica de calcio intracelular

El calcio iónico ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es uno de los cationes más importantes del cuerpo humano pues tiene un papel esencial en diversas actividades celulares, entre ellas la contracción muscular, división celular, secreción, fecundación, transmisión sináptica, metabolismo, transcripción, movimiento celular y apoptosis [6]. Para cada uno de estos casos, un mensaje extracelular es recibido en la superficie de la célula, produciendo una elevación considerable de los iones de calcio en el citoplasma. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de una célula en reposo se mantiene en niveles muy bajos, aproximadamente a 100 nM. Caso contrario sucede con la concentración de iones en el espacio extracelular o la luz del retículo sarcoplasmático donde es 10.000 veces más elevada que el citosol (~ 1.8 mM).

Para el caso de la contracción muscular, en la figura 1.3 se observa una representación de la dinámica de la contracción de calcio intracelular [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> en una célula, donde el  $\text{Ca}^{2+}$  ingresa a la misma a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo T y tipo L, el cual eleva los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático paulatinamente, hasta que su concentración alcanza un nivel donde genera la apertura de los canales receptores de rianodina (RyR),

quienes expulsan una gran cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplasmático, luego de esta liberación, inicia el proceso de remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma, donde principalmente la bomba de calcio (SERCA) lo ingresa de nuevo al retículo y el NCX lo expulsa al medio extracelular. Es importante resaltar que algunos estudios apuntan a que el NCX es también afectado por variaciones en el potencial de membrana [7], donde se encontró que las afinidades de la proteína tanto al  $\text{Na}^+$  como al  $\text{Ca}^{2+}$  variaban a diferentes valores de potencial de membrana.

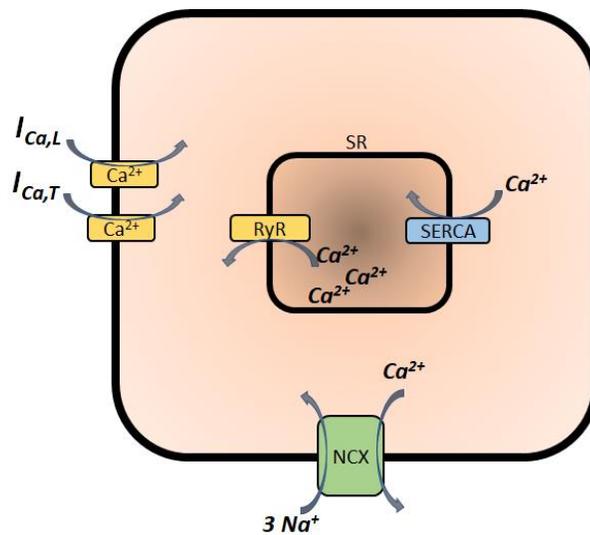


Figura 1.3. Representación de la dinámica del calcio intracelular en un miocito cardíaco.

## 1.2. Antecedentes

### 1.2.1. Estimulación con campos eléctricos

La aplicación de un campo eléctrico externo puede generar diversos cambios fisiológicos en células, tejidos y órganos. A nivel celular, la teoría electrostática sugiere que el interior de la célula experimenta un potencial uniforme, pero, es en la membrana plasmática donde se presenta la caída de potencial. Cualquier consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico se podría deber entonces al cambio inducido en el potencial de membrana [8]; el potencial transmembranal de una mitad de la célula estará hiperpolarizado, mientras que la otra mitad se encontrará despolarizado [9], [10]. Al presentarse variaciones en el potencial de membrana, los diversos canales dependientes de voltaje pueden verse afectados y desencadenar diferentes cambios en la concentración de los iones presentes dentro y fuera de la célula.

### 1.2.2. Variabilidad en sistemas fisiológicos

La variabilidad es un fenómeno que se encuentra presente en biología a muchos niveles y frente al cual los procesos celulares han tenido que evolucionar inmersos en el mismo. Esta variabilidad o más específicamente ruido es de dos tipos: el ruido extrínseco, el cual es global a una sola célula pero varía de una célula a otra; y el ruido intrínseco, el cual es debido a la estocasticidad inherente de cada célula a nivel de expresión génica, dada la naturaleza discreta de los procesos bioquímicos involucrados [11].

Dado el ambiente ruidoso al que las células están expuestas, se ha estudiado ampliamente el comportamiento de las células ante tales fluctuaciones y se ha visto que independiente de tal ambiente sus funciones se ven mínimamente afectadas. Algunos sistemas simplemente debido a la ley de los grandes números son poco sensibles al ruido, ciertos estudios sugieren que

dependiendo del tamaño del axón de algunas neuronas, el ruido les afecta en diferente proporción [12]–[14]; mientras que otros sistemas toman ese ruido y lo usan para mejorar su respuesta o la forma en la que se comunican, como es el caso de la resonancia estocástica donde por ejemplo, la habilidad de detección y transmisión de señales débiles por sistemas tipo umbral, puede ser mejorada por la presencia de un cierto nivel de ruido [15], [16].

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Algunos grupos de investigación han estudiado el efecto que tienen los campos eléctricos en la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células cardíacas, donde Brotto et al. encontraron que la frecuencia de estimulación generaba un efecto escalera al estimular con frecuencias altas y Ristagno et al. encontraron una relación entre la amplitud del campo eléctrico y la amplitud del calcio [17][18].

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se encontró que el ruido ampliaba el ancho de banda de sincronización en la respuesta del acoplamiento entre la estimulación eléctrica y la contracción mecánica del corazón [19], en otras palabras, que al estimular el corazón aislado de ratón con estímulos eléctricos con ruido añadido y comparar la frecuencia cardíaca contra la frecuencia a la cual se estimulaba, observaron que a bajas proporciones de ruido inducido, se favorecía la respuesta de frecuencia cardíaca dado que se ampliaba el rango de sincronización entre el estímulo y la respuesta mecánica del corazón, debido a la disminución del error a 6 Hz y el corrimiento del umbral de desincronización estímulo-respuesta de 12 a 13 Hz.

Posteriormente tratando de elucidar si este comportamiento era debido a un fenómeno emergente del sistema o si el ruido estaba afectando a un grupo celular en particular, se estudió el efecto de la variabilidad en el acoplamiento eléctrico-iónico del calcio en células auto-excitables de corazón de embrión de pollo, donde encontraron que existe un efecto de la variabilidad inducida en el estímulo eléctrico en la dinámica del decaimiento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en su etapa final, sin embargo, no encontraron diferencias significativas entre la frecuencia de estímulo y la frecuencia de respuesta [20].

Dado que, se puede considerar que el corazón está compuesto por dos grupos principales de células – las auto-excitables, quienes controlan el ritmo cardíaco

(NSA) o conducen el estímulo generado por el NSA, y las células excitables, quienes responden a un estímulo y se contraen, pero carecen por completo de auto-ritmicidad (células auriculares y ventriculares) – y las células auto-excitables fueron mínimamente afectadas por el ruido, el siguiente grupo a analizar son las células excitables. Respecto a esto último la línea celular H9c2(2-1) es una línea celular excitable derivada de ventrículo de embrión de rata, la cual expresa canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L, canales de  $\text{K}^{+}$  dependientes de voltaje y canales de  $\text{Na}^{+}$  dependientes de voltaje [21], y ha sido usada como modelo de cardiomiocito [22]–[24].

Con lo encontrado por nuestro grupo de investigación donde el ruido añadido a un estímulo con campo eléctrico tanto en órgano aislado, como a nivel celular en células auto-excitables ha modificado el comportamiento del sistema, se plantea la pregunta de investigación ¿puede un campo eléctrico variable afectar el comportamiento de la dinámica de calcio intracelular en células excitables?

### **3. HIPÓTESIS**

El añadir variabilidad al campo eléctrico con el que se estimulan células excitables cardiacas influye en algunos parámetros de la dinámica de calcio intracelular, tales como la velocidad de ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, la concentración máxima del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular o la velocidad de remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Estudiar el efecto en la dinámica de calcio intracelular ante estímulos de campo eléctrico con diferentes niveles de variabilidad añadida.

### 4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la respuesta de la dinámica de calcio intracelular debido a estímulos con campo eléctrico.
- Determinar y analizar la respuesta de la dinámica de calcio intracelular ante estímulos de campo eléctrico con variabilidad añadida.

## 5. METODOLOGÍA

Con el fin de cumplir con los objetivos planteados se usó como modelo de cardiomiocito la línea celular H9c2(2-1), en la figura 5.1 es presentada la metodología general mediante la cual se cumplen ambos objetivos específicos.

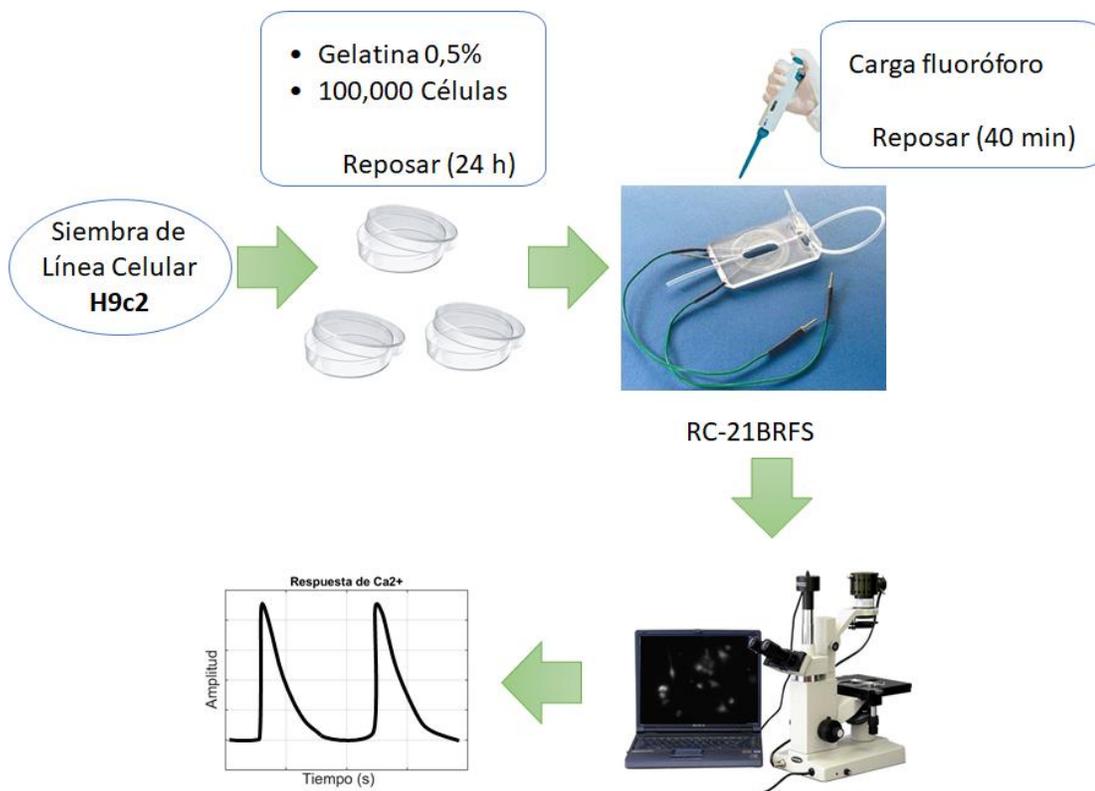


Figura 5.1. Metodología general.

Se siembran 100,000 células excitables en vidrios previamente tratados con gelatina al 0.5%, se dejan reposar por 24 horas. Posteriormente los vidrios se ubican en la cámara de estimulación con campo eléctrico, llenando el pozo donde se encuentran las células con solución fisiológica, luego se cargan con el fluoróforo reportero de Ca<sup>2+</sup> y se deja incubando por 40 minutos en la incubadora a una temperatura de 37°C, y un ambiente 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez se incubó el fluoróforo, se ubica la cámara de estimulación en

el microscopio invertido, se realiza un lavado de las células con solución fisiológica y se inician los registros.

Los detalles específicos del experimento se muestran a continuación.

### **5.1. Cultivo celular**

Las células H9c2(2-1) fueron cultivadas con medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino a una concentración final de 10% y penicilina, estreptomycin y neomicina a una concentración final de 1%. Las células son crecidas a 37°C en un ambiente 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, además son resemebradas cada 3 o 4 días dependiendo de su confluencia.

Para la realización de los experimentos se siembran 100,000 células en vidrios tratados previamente con gelatina a una concentración de 0.5% y se dejan incubando por 24 horas.

### **5.2. Soluciones**

Para la realización de los registros ante estímulos de campo eléctrico, se utilizó la solución fisiológica Tyrode con las siguientes concentraciones en (mM): 5 Hepes, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 2.7 KCl, 137 NaCl, 3.6 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 5.5 Dextrosa, todo ajustado a un pH de 7.4 con NaOH.

Con el fin de evitar que la solución se precipite se prepara el Tyrode ajustando su pH antes de adicionarle el CaCl<sub>2</sub>, el cual se adiciona al último gota a gota.

### **5.3. Fluorescencia**

Para monitorear la dinámica de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, se usa el compuesto *Fluo-4 AM*, un fluoróforo sensible a Ca<sup>2+</sup> en su variante esterificada que le permite atravesar

fácilmente la membrana plasmática y que luego de ser degradado hasta su forma activa por las esterasas propias de la célula, impide su difusión pasiva fuera de la célula. El *Fluo-4 AM* se prepara a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$  y se mezcla con Plurónico a una concentración final de 0.06%. El tiempo de incubación de las células con el fluoróforo fue de 40 minutos a una temperatura de 37°C.

#### **5.4. Microscopía**

Para registrar la fluorescencia emitida por el Fluo-4 en respuesta a la estimulación con campo eléctrico se realizó la adquisición de videos con microscopia de fluorescencia, donde se utilizó una cámara Nikon DS QiMc acoplada a un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U con un objetivo de 10x, iluminado con una lámpara de Hg de 120 W, seleccionando las longitudes de onda de excitación de  $\lambda_{\text{exc}} = 480 \pm 40 \text{ nm}$  y de emisión de  $\lambda_{\text{em}} = 535 \pm 25 \text{ nm}$  correspondientes al Fluo-4, con un espejo dicróico para altos con un corte a  $\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$ .

#### **5.5. Estimulación con campo eléctrico**

Para producir el campo eléctrico para estimular las células, se usó un generador de funciones programado en LabView, el cual se comunica con un circuito de amplificación a través de una tarjeta de adquisición de datos (DAQ). La salida del circuito va conectada a los electrodos de estimulación localizados en la cámara de perfusión con campo de estimulación modelo RC-21BRFS. Ver figura 5.2.

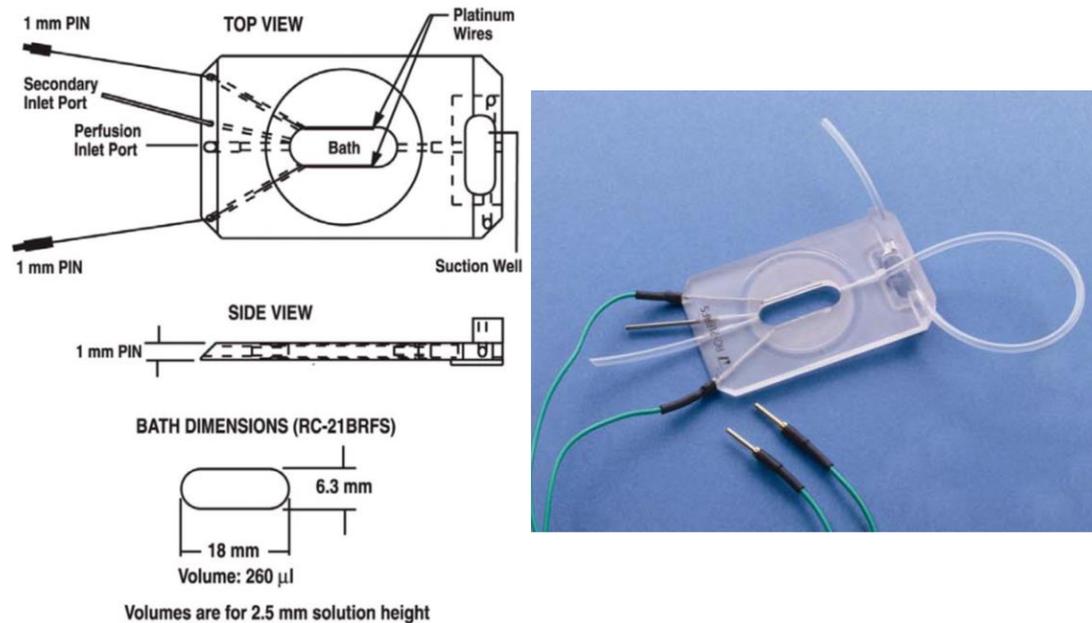


Figura 5.2. Cámara de perfusión con campo de estimulación

### 5.6. Selección de los parámetros de estimulación

Con el fin de plantear un protocolo de estimulación adecuado para cumplir con los objetivos propuestos en este trabajo de investigación, se realizaron registros de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ante estímulos de campo eléctrico con diferentes amplitudes y diferente duración.

Cheng et al. y Knisley et al. han estimulado células ventriculares de conejillo de indias y de conejo respectivamente, con dos pulsos de campo eléctrico [10], [25]; este protocolo resulta ser adecuado para este proyecto de investigación toda vez que nos permite realizar el estudio de la dinámica de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ante dos estímulos de campo eléctrico, donde al segundo estímulo pueda añadirse variabilidad y comparar el efecto que pueda generar en una misma célula respecto al primer estímulo.

Para la selección de una amplitud adecuada, se realizaron barridos de campo eléctrico desde 5 a 40 V/cm, donde se encontró que para niveles mayores a

26 V/cm siempre se observaba una respuesta ante cada estímulo, concluyendo que para esta amplitud se estaba cerca al umbral de estimulación de las células, por lo que se escogió una amplitud de campo eléctrico de 26 V/cm.

Respecto a la duración de los pulsos se hicieron experimentos con duraciones desde 1 ms hasta 1 s, usando la amplitud de 26 V/cm seleccionada previamente, observando respuestas ante cada estímulo para tiempos de duración mayores o iguales a 500 ms, por esta razón se seleccionó 500 ms como duración del pulso.

A partir de los parámetros encontrados en esta sección se logró generar una curva de la dinámica de la  $[Ca^{2+}]_i$ , donde se observó que retornaba a niveles basales alrededor de los 60 segundos posteriores a la aplicación del primer estímulo; de esta manera se decidió dejar un tiempo de espera entre estímulos de 100 s para asegurar que las células estuvieran en condiciones de responder nuevamente.

### **5.7. Protocolo de estimulación**

Se realizaron experimentos con una duración de 3 minutos, donde durante los primeros 10 segundos se registró el comportamiento basal de las células.

En el grupo de control, las células fueron estimuladas con 2 pulsos de campo eléctrico con una amplitud de 26.4 V/cm, una duración de 500 ms y separados un pulso del otro con un tiempo de 100 s (ver figura 5.3) mediante este protocolo se puede cumplir con el primer objetivo específico.

Para determinar el efecto de la variabilidad en la dinámica del calcio (objetivo específico 2), las células fueron estimuladas con el mismo tipo de pulsos de campo eléctrico con diferentes niveles de variabilidad añadida (10%, 20% y

30%), se conservó el mismo protocolo de estimulación (misma cantidad y duración de los pulsos), pero 10 segundos antes de la aplicación del segundo pulso se añadió el ruido blanco, el cual se mantuvo presente hasta el final del registro.

El ruido usado fue ruido blanco generado por el programa LabView, sin embargo, a la hora de la conversión digital análoga, este ruido se generó con un ancho de banda de 100 Hz aproximadamente.

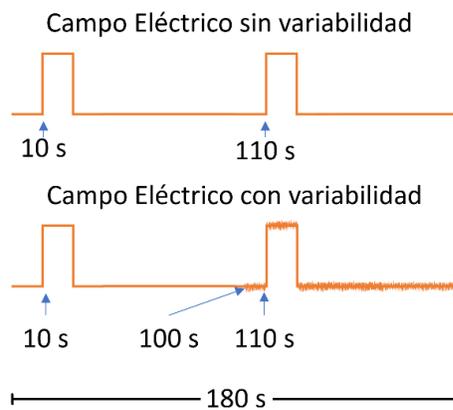


Figura 5.3. Protocolos de estimulación.

## 6. RESULTADOS

Para determinar la respuesta de la dinámica de calcio intracelular en las células H9c2(2-1) ante la presencia de un campo eléctrico con y sin variabilidad añadida, se analizan los cambios en la amplitud, velocidad de subida y velocidad de bajada del segundo estímulo, respecto al primer estímulo aplicado. Es de notar que las amplitudes están relacionadas con la  $[Ca^{2+}]_i$ , la velocidad de subida corresponde al tiempo que le tarda a la  $[Ca^{2+}]_i$  en pasar del valor basal a su valor máximo y la velocidad de bajada corresponde al tiempo que le tarda a la  $[Ca^{2+}]_i$  en pasar del valor máximo alcanzado a un 30% de este valor máximo o, en otras palabras, en decaer un 70%.

Una vez sembradas las células y ubicadas en la cámara de estimulación con el respectivo reportero de  $Ca^{2+}$ , se llevó a cabo un experimento donde se realizaba el protocolo de estimulación mencionado en la sección 5.7, primero sin adicionarle ruido, con el fin de validar el montaje experimental, en la figura 6.1 se observa un registro obtenido con este protocolo.

### 6.1. Cuantificación de resultados

En la figura 6.2 se observa un registro representativo de la dinámica de calcio ante los estímulos de campo aplicados, donde se detallan los parámetros a analizar, como el tiempo de subida ( $t_{sub} = t_2 - t_1$ ), el tiempo de decaimiento hasta el 30% de la amplitud de cada pico ( $t_{0.3} = t_3 - t_2$ ) y la amplitud máxima de cada pico ( $\Delta amp$ ).

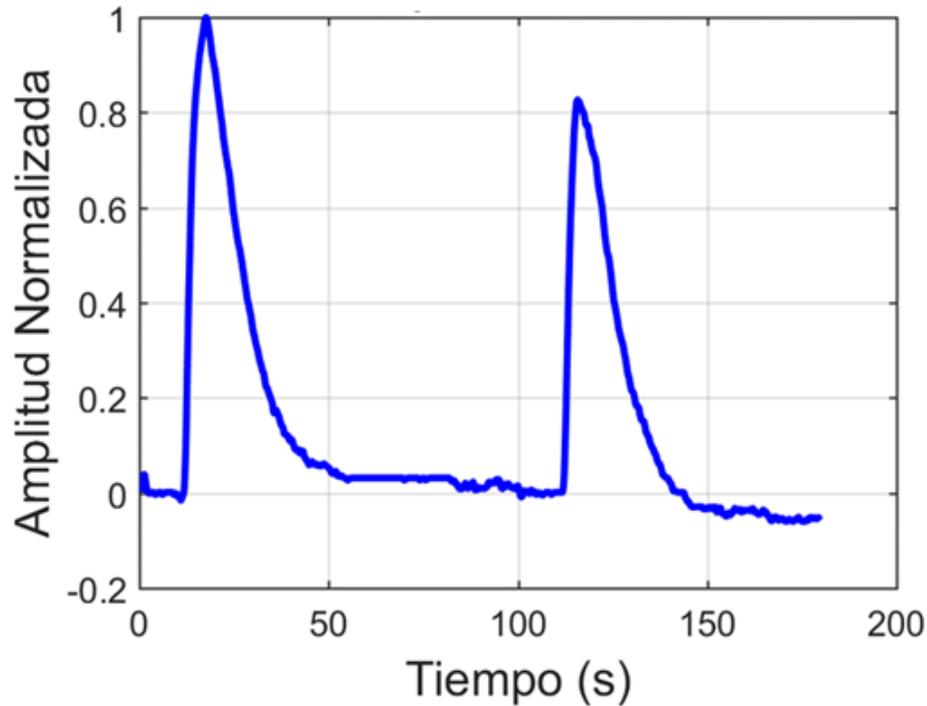


Figura 6.1. Registro de la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  ante el protocolo de estimulación planteado.

Previo al cálculo de los parámetros se normalizó la señal respecto al valor basal y respecto a la amplitud máxima del primer pico, así:

$$F = \frac{F0 - Basal}{Max(F0) - Basal}$$

Donde,  $F$  es la señal normalizada de fluorescencia,  $F0$  es la señal de fluorescencia directamente obtenida del software de adquisición de imágenes,  $Basal$  es la intensidad de fluorescencia correspondiente a los primeros 10 segundos del registro y  $Max(F0)$  es el valor máximo de fluorescencia en respuesta al primer estímulo.

Con los parámetros antes mencionados se calcularon la velocidad de subida ( $V_{subida}$ ) y de decaimiento ( $V_{decaimiento}$ ) para cada pico, de la siguiente manera:

$$V_{subida} = \frac{\Delta amp}{t_{sub}}$$

$$V_{decaimiento} = \frac{0.7 * \Delta amp}{t_{0.3}}$$

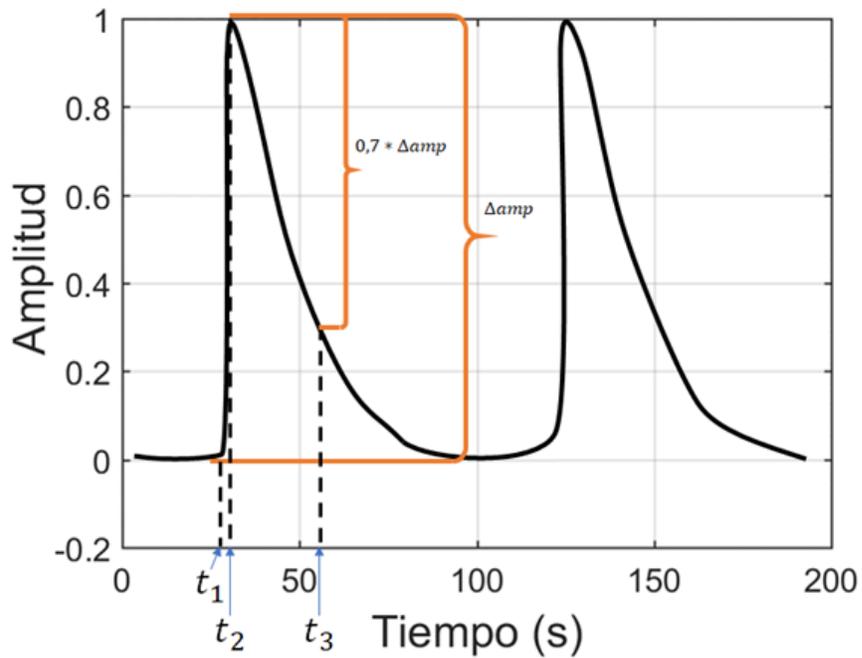


Figura 6.2. Parámetros de interés.

## 6.2. Estadística

Cada uno de los valores numéricos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Por cultivo celular se sembraron en promedio 8 vidrios, destinando 2 vidrios para cada grupo experimental (niveles de variabilidad de 0%, 10%, 20% y 30%), por ende, cada cultivo celular es un  $n$  independiente, el valor correspondiente a  $n$  es de 5 para el grupo de pulsos sin ruido añadido, de 4 para los grupos correspondientes a 10% y 30% y de 3 para el grupo de 20% de ruido.

En las figuras 6.3, 6.4 y 6.5 se observan 4 barras, donde cada barra corresponde al promedio de las diferencias entre los valores del segundo estímulo respecto al primero para cada célula; es importante recalcar que el primer estímulo siempre es aplicado en ausencia de variabilidad añadida y que el segundo estímulo tiene diferentes niveles de ruido, 0 – 30%, de ahí la respectiva etiqueta en cada grupo de barras. Los valores negativos de cada barra significan que el parámetro medido en la dinámica de calcio en respuesta al segundo estímulo es menor que el del primero.

Se realizó una prueba t-student a cada una de las medias de las diferencias entre el estímulo 1 y el estímulo 2, teniendo como hipótesis nula que las medias eran iguales a cero; y para comparar la media de las diferencias entre cada grupo se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, tomando como hipótesis nula la igualdad entre la media de las diferencias de cada grupo respecto al control (en este caso el control es el grupo correspondiente a ambos estímulos sin variabilidad); posterior a la ANOVA se realizó una prueba de múltiple comparación entre grupos (Tukey-Kramer). En todas las gráficas el símbolo † se relaciona con una  $p < 0.01$  y el símbolo \* a una  $p < 0.05$ .

A continuación, se describen los resultados obtenidos, para las diferencias en la amplitud, velocidad de subida y velocidad de decaimiento para todos los grupos (0% - 30%).

### 6.3. Diferencias en amplitudes

En la figura 6.3 se pueden apreciar las diferencias en la amplitud entre ambos transitorios de  $Ca^{2+}$  en respuesta a los estímulos para los diferentes valores de variabilidad añadida (ruido); para el experimento sin ruido (grupo control) se nota que la respuesta ante el segundo estímulo es de menor amplitud que la del primero, comportamiento que se mantiene de manera similar cuando se estimula con un 10% de ruido, sin embargo, al aumentar el porcentaje de

variabilidad añadida al segundo estímulo en 20% y 30%, la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por el segundo estímulo, tiende a igualar a la del primero.

La adición de 20% y 30% de variabilidad produce de manera significativa que la amplitud máxima de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  tengan la misma intensidad ante ambos estímulos al comparar con el grupo control sin variabilidad añadida.

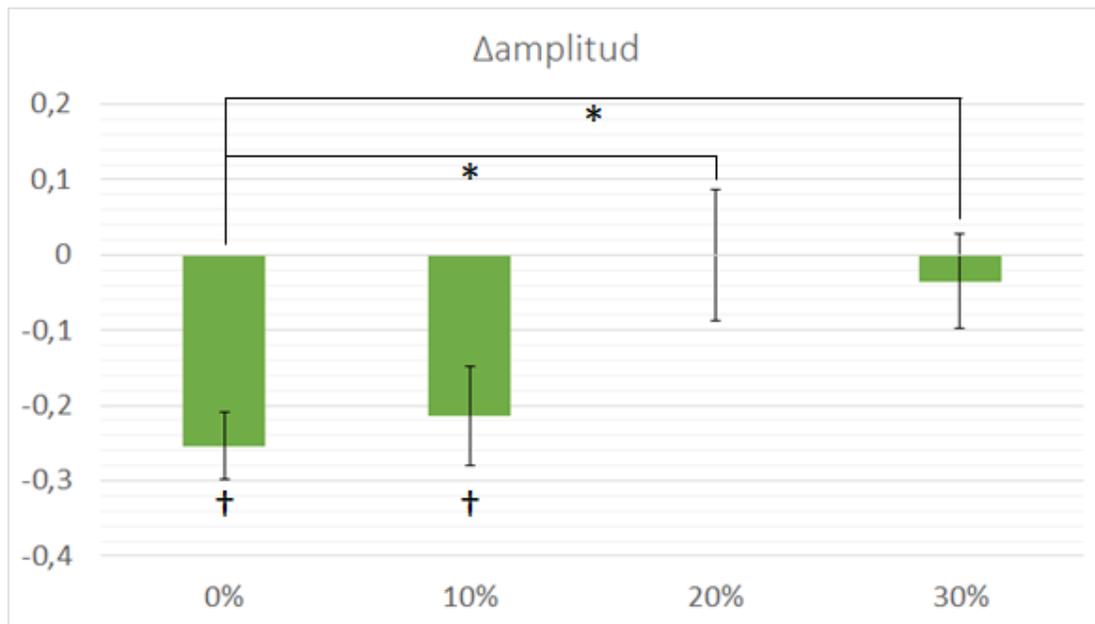


Figura 6.3. Diferencia entre la amplitud máxima de  $[\text{Ca}^{2+}]$ ; del segundo estímulo respecto al primero. \*:  $p < 0.05$ ; †:  $p < 0.01$ .

#### 6.4. Diferencias en velocidades de subida

En la figura 6.4 se presentan las diferencias entre las velocidades de incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Cuando no se añade ruido al segundo estímulo, las diferencias entre las velocidades tienden a cero, no obstante, se nota, que al añadir una variabilidad del 10% y 20%, la velocidad con que incrementa el  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta al segundo estímulo es más rápida que frente al primer estímulo. Cuando el experimento se realiza añadiendo un 30% de

ruido, la velocidad del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta al segundo estímulo disminuye en comparación con la respuesta ante el primer estímulo.

Al comparar entre los grupos, la adición de un 20% de ruido incrementa de manera significativa la velocidad en comparación con el grupo control en ausencia de variabilidad.

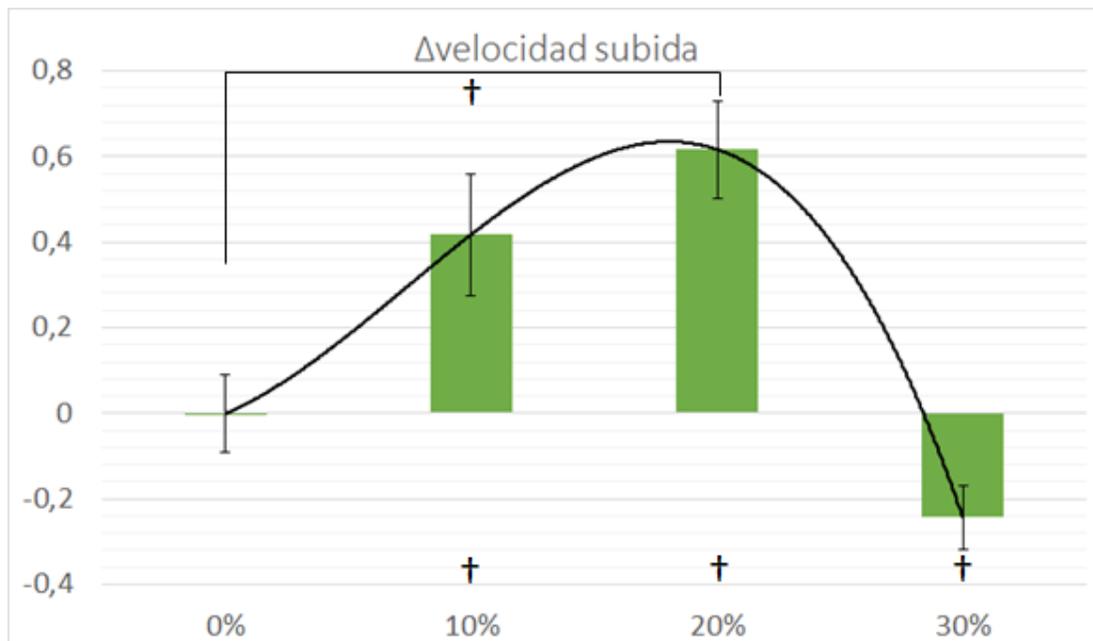


Figura 6.4. Velocidad de ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma (diferencia entre la respuesta ante el segundo estímulo respecto al primero). †:  $p < 0.01$ .

### 6.5. Diferencias en velocidades de decaimiento

En la figura 6.5 se puede apreciar cómo la velocidad de decaimiento de la respuesta ante el segundo estímulo es más lenta que la observada ante el primero, cuando ambos estímulos son sin variabilidad e incluso cuando el segundo estímulo tiene un 10% de variabilidad añadida. Cuando el porcentaje de variabilidad es mayor a 10% la velocidad de decaimiento frente al segundo estímulo tiende a igualar la del primero. Sin embargo, al comparar entre los grupos, la tendencia observada no es significativamente diferente.

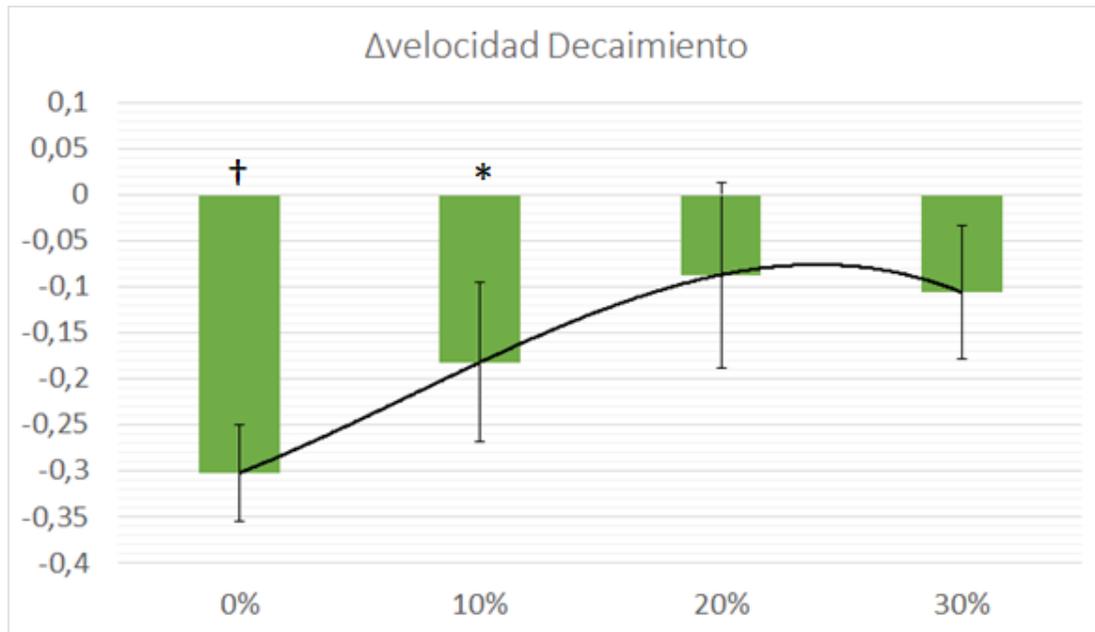


Figura 6.5. Diferencia entre la velocidad de remoción de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular del segundo estímulo respecto al primero. \*:  $p < 0.05$ ; †:  $p < 0.01$ .

## 7. DISCUSIÓN

El  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel muy importante en el acoplamiento excitación-contracción del corazón, donde entre otras funciones es el responsable de la contracción de los cardiomiocitos.

Ya ha sido estudiado el efecto que tienen los campos eléctricos en la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, donde se ha encontrado que tanto la amplitud como la frecuencia del campo eléctrico afectan la amplitud y la frecuencia de la dinámica de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [17][18], además ha sido estudiada también la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  ante estímulos de campo eléctrico con variabilidad añadida en células auto-excitables de corazón de embrión de pollo [20]. Este último encontró que para el nivel de variabilidad de 30% se observó una respuesta más lenta en el tiempo de decaimiento en su etapa final (decaimiento al 90%).

En el presente trabajo se realizó el estudio de cómo los campos eléctricos variables afectan las células excitables, específicamente en la línea celular H9c2(2-1).

Se encontró como tal que el ruido en esta línea celular no genera efecto significativo en la velocidad de remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, sin embargo contrario a lo encontrado por [20], el ruido afecta tanto a la amplitud máxima del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como a la velocidad de ingreso del  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma.

Las células H9c2(2-1) son excitables eléctricamente, pero a diferencia de las células del nodo sinoauricular, estas no son auto-excitables, por lo que nuestro protocolo de estimulación de dos pulsos permitió estudiar el comportamiento de la dinámica del calcio intracelular (concentración máxima, velocidad de aumento de la concentración de calcio citoplasmático y velocidad de remoción del calcio citoplasmático) de una misma célula frente a dos estímulos de

campo eléctrico y de este modo poder comparar cómo el ruido añadido al segundo estímulo cambia la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  respecto al primer estímulo sin ruido.

En nuestro experimento control se estudió el comportamiento de una célula ante dos estímulos sin adición de variabilidad. Respecto a la amplitud máxima de la respuesta del  $Ca^{2+}$  a los estímulos (figura 6.3), se puede notar cómo la dinámica de calcio frente al segundo estímulo tiende a ser menos amplia que la del primero, esto puede ser debido a que el tiempo de espera entre un estímulo y otro en nuestro protocolo es corto y puede estar generando un efecto relacionado con el aumento de la frecuencia de estimulación, el cual de acuerdo con otros reportes puede alterar la cantidad de liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplasmático [26].

Por su parte, la velocidad de decaimiento de la respuesta ante el segundo estímulo es menor en comparación con la del primero, lo cual puede significar que al haber una menor  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta al segundo pulso, puede estar afectando la remoción de  $Ca^{2+}$  a través del NCX, Hilgemann et al. sugieren que la presencia tanto del  $Na^+$  como del  $Ca^{2+}$  en el citoplasma afectan la pendiente de la corriente de intercambio a través del intercambiador en mención [27]. Respecto a la velocidad de subida no se encontraron diferencias significativas entre las respuestas ante el primer y segundo estímulo.

El efecto de la adición de un 10% de ruido al segundo estímulo se puede resumir de la siguiente manera: tanto la amplitud como la velocidad de decaimiento de la respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  tuvieron el mismo comportamiento que el grupo control (segundo estímulo sin ruido); con 10% de ruido, sin embargo, la velocidad con que incrementa la  $[Ca^{2+}]_i$  se vio elevada, lo cual puede deberse a que el ruido esté promoviendo la activación de algunos canales de calcio voltaje dependientes tipo L adicionales, que tal vez sin ruido no se habrían activado; alternativamente también el ruido puede estar favoreciendo

el ingreso de calcio a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , esta última suposición se debe a que el NCX a pesar de ser una de las vías principales de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$ , puede presentar también un modo de funcionamiento en reversa en el cual debido a la inversión del gradiente de  $\text{Na}^+$  durante la despolarización, podría transportar  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma [28].

Cuando se añadió un 20% de ruido al segundo estímulo se observó que la amplitud de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a ese estímulo tendió a igualar la amplitud observada debido el primero; además se aprecian diferencias significativas al comparar el grupo con 20% de ruido contra el grupo sin ruido añadido. Respecto a la velocidad de aumento de la concentración de calcio citoplasmático, esta fue más rápida en la respuesta al segundo estímulo respecto al primero y se observa que la diferencia entre las velocidades de ambos estímulos es mayor cuando se elevó el nivel de ruido de 10% a 20%, en la figura 6.4. se nota que al comparar las diferencias entre las velocidades de subida del grupo correspondiente al 20% de ruido contra el grupo sin ruido añadido, hay un incremento estadísticamente significativo; estos dos comportamientos pueden deberse al mismo argumento mencionado anteriormente, donde quizás la adición de variabilidad en el estímulo esté promoviendo la activación de una mayor cantidad de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L y/o favoreciendo el ingreso de mayor cantidad de iones de calcio a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .

Respecto a la velocidad de decaimiento, en presencia del mismo nivel de variabilidad, se observó un aumento, tendiendo a igualar la velocidad de decaimiento de la remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta ante el primer estímulo, sin embargo, al analizar las diferencias entre las medias de cada grupo experimental no se observaron que fueran significativas respecto al grupo control (0% de variabilidad añadida) (figura 6.5).

Al aumentar la variabilidad hasta un 30%, tanto la amplitud como la velocidad de decaimiento de las respuestas no presentan cambios respecto a las respuestas observadas con el nivel de ruido de 20%, la velocidad de subida por su parte para la respuesta ante el segundo pulso tiende a ser menor (figura 6.4), sin embargo, al comparar las diferencias entre las velocidades de subida del grupo de 30% contra el grupo del 0%, no se observan diferencias significativas, pudiendo ser que la magnitud del ruido añadido esté afectando a los canales de calcio tipo L, disminuyendo el número de canales disponibles para ser activados llevándolos a un estado inactivado directamente.

Respecto a las diferencias en la velocidad de subida (figura 6.4) y las diferencias en la velocidad de decaimiento (figura 6.5) se puede observar que la velocidad tiende a aumentar a medida que se aumenta el nivel de variabilidad añadida al estímulo eléctrico, misma que disminuye cuando el nivel de ruido alcanza valores más altos de 20%; esto nos dice que un nivel de variabilidad del 20% al acelerar ambas velocidades podría estar afectando la frecuencia de contracción, toda vez que podría acortar un poco los periodos y permitirle a la célula hasta cierto punto responder a estímulos un poco más frecuentes.

Es importante recordar los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación, quienes después de estimular el corazón eléctricamente con ruido añadido y realizar una comparación entre las frecuencias cardíaca y de estimulación, observaron que con bajas proporciones de ruido la respuesta de frecuencia se favorecía debido a que se ampliaba el rango de sincronización entre el estímulo y la respuesta mecánica del corazón [19]; Además, teniendo en cuenta los resultados encontrados por [20], donde el ruido adicionado al campo eléctrico con el que estimulaban células cardíacas auto-excitables, generaba un efecto en el tiempo de decaimiento de la dinámica de calcio intracelular solo en la etapa final de la remoción. Con esto, relacionando esos resultados con los resultados

presentados en este trabajo y desde una perspectiva más general, se podrían dar varias observaciones:

- ✓ Que las células auto-excitables mostraron ser más robustas ante la adición de diferentes niveles de ruido a los estímulos, lo cual es de esperarse ya que son las células responsables de mantener el ritmo funcional del corazón y cambios bruscos en su comportamiento comprometerían fuertemente el correcto acoplamiento estimulación-contracción del corazón.
- ✓ Sin embargo, tomando la perspectiva de lo observado en el órgano completo, se evidenció que el ruido de hecho está afectando de alguna manera la respuesta del órgano completo, por lo que se podría suponer que tal vez el ruido se pueda estar enmascarando en la señal periódica transmitida por las células marcapasos, la cual viaja por todo el sistema de conducción cardiaco y finalmente estimula los cardiomiocitos ventriculares.
- ✓ Respecto a esto último, los resultados que competen a este proyecto confirman tal aseveración dado que los análisis presentados en párrafos anteriores muestran que las células ventriculares son susceptibles a la variabilidad añadida a los estímulos con campo eléctrico, lo cual es lógico teniendo en cuenta que este tipo de células no presentan comportamientos auto excitables, sino que, al contrario, están a la espera de un estímulo externo para responder contrayéndose.

Por otro lado, el hecho de que el ancho de banda del ruido sea de aproximadamente 100 Hz significa que la duración de la adición/sustracción aleatoria de voltaje a la señal de estimulación es de mínimo 10 ms, y teniendo en cuenta que el tiempo de activación de los canales de calcio voltaje dependientes tipo L (Cav1.2) es en promedio de 1 ms [29], nos da a entender que cada canal como tal podría estar percibiendo en lugar de una estimulación

ruidosa, estímulos específicos con niveles de amplitud y duración aleatoria, de esta manera, debido al tipo de estímulos presentes por la adición de variabilidad, apoya las observaciones mencionadas del efecto que puedan estar generando los campos eléctricos variables en la dinámica de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

## 8. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

### 8.1. Conclusión

La estimulación de células H9c2(2-1) con un campo eléctrico variable genera modificaciones en el transitorio de calcio, más específicamente en las velocidades de ingreso de calcio al citoplasma y en la concentración máxima a la cual se llega en dicha dinámica.

## 8.2. Perspectivas

A partir de los resultados encontrados con este trabajo y luego de algunas suposiciones hechas se pueden proponer varias cosas por hacer:

Determinar a nivel molecular las afectaciones de la variabilidad añadida a los estímulos, realizando un estudio de la dinámica de calcio intracelular afectada con campo eléctrico con variabilidad añadida, cuando se generen bloqueos farmacológicos en algunas de las proteínas involucradas en la dinámica de calcio, por ejemplo, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  o la bomba SERCA.

Estudiar también el efecto que tiene la estimulación con campos eléctricos con variabilidad, en el potencial de acción de las células, con el fin de encontrar cómo la variabilidad pueda afectar a la frecuencia de generación de estos potenciales, dado que en los cardiomiocitos ventriculares sí se encontró un mayor efecto por parte del ruido.

Realizar un estudio similar al reportado, pero utilizando células de tejido primario, con el fin de determinar en condiciones más cercanas a la realidad fisiológica los efectos del ruido añadido al sistema.

Dado que el ancho de banda del ruido fue de 100 Hz, sería recomendable controlar este ancho de banda en los experimentos mencionados y tratar de llevarlo a un valor máximo donde, tanto el programa de estimulación como el hardware de conversión análogo digital y amplificación lo permitan, con el fin de tener un ruido que tienda más a ser más aproximado al ruido blanco.

## 9. REFERENCIAS

- [1] E. Conti, Fiorenzo; Battaglini, Piero Paolo; Mora, *Fisiología médica*. McGraw-Hill, 2010.
- [2] A. Guyton and J. Hall, *Textbook of Medical Physiology*, 11th ed. Elsevier Saunders, 2011.
- [3] B. Hille, *Ion Channel Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer, 2001.
- [4] H. Irisawa, H. F. Brown, and W. Giles, "Cardiac pacemaking in the sinoatrial node.," *Physiol. Rev.*, vol. 73, no. 1, pp. 197–227, 1993.
- [5] M. Baruscotti, A. Barbuti, and A. Bucchi, "The cardiac pacemaker current," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 55–64, 2010.
- [6] G. Karp, *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*, Quinta edi. McGraw Hill Mexico, 2011.
- [7] M. Kappl, G. Nagel, and K. Hartung, "Voltage and Ca(2+) dependence of pre-steady-state currents of the Na-Ca exchanger generated by Ca(2+) concentration jumps.," *Biophys. J.*, vol. 81, no. 5, pp. 2628–2638, 2001.
- [8] B. Ehrenberg, D. L. Farkas, E. N. Fluhler, Z. Lojewska, and L. M. Loew, "Membrane potential induced by external electric field pulses can be followed with a potentiometric dye," *Biophys. J.*, vol. 51, no. 5, pp. 833–837, 1987.
- [9] D. Gross, L. M. Loew, and W. W. Webb, "Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields," *Biophys. J.*, vol. 50, no. 2, pp. 339–348, 1986.
- [10] S. B. Knisley *et al.*, "Optical measurements of transmembrane potential changes during electric field stimulation of ventricular cells," *Circ Res*, vol. 72, pp. 255–270, 1993.
- [11] M. B. Elowitz, A. J. Levine, E. D. Siggia, and P. S. Swain, "Stochastic gene expression in a single cell," *Science (80-. )*, vol. 297, no. 5584, pp. 1183–1186, 2002.

- [12] Y. Horikawa, "Noise effects on spike propagation in the stochastic Hodgkin-Huxley models," *Biol. Cybern.*, vol. 66, no. 1, pp. 19–25, 1991.
- [13] B. Hille, "Ionic channels in nerve membranes," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 21, no. C, pp. 1–32, 1970.
- [14] J. VON NEUMANN, "Probabilistic logics and the synthesis of reliable organisms from unreliable components," *Autom. Stud.*, vol. 34, pp. 43–98, 1956.
- [15] R. Benzi, A. Sutera, and A. Vulpiani, "The mechanism of stochastic resonance," *J. Phys. A. Math. Gen.*, vol. 14, no. 11, pp. 453–457, 1981.
- [16] Y. Shu, A. Hasenstaub, M. Badoual, T. Bal, and D. a McCormick, "Barrages of synaptic activity control the gain and sensitivity of cortical neurons.," *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 32, pp. 10388–10401, 2003.
- [17] M. A. D. Brotto and T. L. Creazzo, "Ca<sup>2+</sup> transients in embryonic chick heart: Contributions from Ca<sup>2+</sup> channels and the sarcoplasmic reticulum," *Am. J. Physiol.*, vol. 270, pp. H518–H525, 1996.
- [18] G. Ristagno, T. Wang, M.-S. Tsai, S. Sun, W. Tang, and M. H. Weil, "High-energy defibrillation impairs myocyte contractility and intracellular calcium dynamics.," *Crit. Care Med.*, vol. 36, no. 11, pp. S422-427, 2008.
- [19] A. Peña-Romo, A. M. Gámez-Méndez, A. Ríos, B. A. Escalante, and J. Rodríguez-González, "Noise enhanced the electrical stimulation-contractile response coupling in isolated mouse heart," *Int. J. Cardiol.*, vol. 221, pp. 155–160, 2016.
- [20] C. A. Diaz Galindo, "Estudio del efecto de la variabilidad en el acoplamiento eléctrico-iónico del calcio en células del nodo sinoauricular," Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, 2016.
- [21] J. Hescheler, R. Meyer, S. Plant, D. Krautwurst, W. Rosenthal, and G. Schultz, "Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart," *Circ. Res.*, vol. 69, no. 6, pp. 1476–1486, 1991.
- [22] I. Namekata *et al.*, "Fluorescence Analysis of the Mitochondrial Effect of

- a Plasmalemmal Na/Ca Exchanger Inhibitor, SEA0400, in Permeabilized H9c2 Cardiomyocytes,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 40, no. 9, pp. 1551–1555, 2017.
- [23] I. Namekata, S. Hamaguchi, and H. Tanaka, “Pharmacological discrimination of plasmalemmal and mitochondrial sodium-calcium exchanger in cardiomyocyte-derived H9c2 cells.,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 38, no. 1, pp. 147–50, 2015.
- [24] G. Tang, Y. Shen, P. Gao, S. Song, and L. Si, “Klotho attenuates isoproterenol-induced hypertrophic response in H9C2 cells by activating Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and inhibiting the reverse mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger,” pp. 250–256, 2018.
- [25] D. K. Cheng, L. Tung, and E. A. Sobie, “Nonuniform responses of transmembrane potential during electric field stimulation of single cardiac cells,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 277, no. 1, pp. H351–H362, 1999.
- [26] D. M. Bers, “Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction,” *Circ. Res.*, vol. 87, no. 4, pp. 275–281, 2000.
- [27] D. W. Hilgemann, S. Matsuoka, G. A. Nagel, and A. Collins, “Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent inactivation.,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 100, no. 6, pp. 905–32, 1992.
- [28] D. M. Bers, “Cardiac Excitation-Contraction Coupling,” *Nature*, vol. 415, no. January, pp. 198–205, 2002.
- [29] W. a Catterall, E. Perez-Reyes, T. P. Snutch, and J. Striessnig, “International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 57, no. 4, pp. 411–425, 2005.