



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

Respuesta en miotubos, de línea celular H9c2(2-1), a  
estímulos de campo eléctrico con variabilidad

TESIS

que presenta

Fernando Villafranca Martínez

para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

**en Ingeniería y Física Biomédicas**

Dirección de la tesis:

Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González

Apodaca, Nuevo León

Septiembre 2019

# Agradecimientos

Primeramente quiero agradecer a todos los profesores del CINVESTAV por aceptarme e instruirme en el posgrado, así como al personal administrativo por facilitar los procesos de inscripción, de beca y transporte. En especial agradezco a los doctores Jesús Rodríguez por su confianza y paciencia en todo el desarrollo del proyecto, Daniel Sánchez por introducirme y asesorarme en la biología y fisiología celular, Bruno Escalante por sus observaciones y recomendaciones acerca de mis resultados y Christian Scheckhuber por todos sus consejos que me ayudaron a recuperar el ánimo.

A mis padres, ya que sin sus sacrificios y su apoyo permanente no hubiese logrado salir adelante. A Héctor, Alejandro y Luis por las distracciones durante las vacaciones. A mis amigos y compañeros que hicieron más amena mi estancia por el volibol, los videojuegos y las  $\mu$ pizzas. A Bere por ayudarme con las figuras de esta tesis y por jugar Mario.

Dentro del laboratorio obtuve ayuda de Alberto Ramírez al enseñarme las técnicas y cuidados del cultivo celular y de Karen Garza Cuellar al apoyarme con la preparación de soluciones y en la coordinación de mis experimentos. Agradezco también a Humberto, Jorge y Ángel por sus consejos sobre el cultivo celular.

Este proyecto fue apoyado por el CONACyT por medio de su beca.

# Índice general

<b>1. Marco teórico y antecedentes</b>	<b>7</b>
1.1. El corazón . . . . .	7
1.1.1. Acoplamiento excitación-contracción de músculo cardiaco . . . . .	8
1.2. Estimulación con campo eléctrico . . . . .	10
1.3. Ruido en los sistemas biológicos . . . . .	13
1.4. Modelo celular H9c2(2-1) . . . . .	14
<b>2. Hipótesis y objetivos</b>	<b>16</b>
2.1. Justificación . . . . .	16
2.2. Hipótesis . . . . .	16
2.3. Objetivos . . . . .	17
2.3.1. Objetivo general . . . . .	17
2.3.2. Objetivos específicos . . . . .	17
<b>3. Metodología</b>	<b>18</b>
3.1. Cultivo celular . . . . .	18
3.2. Fluorescencia . . . . .	19
3.3. Estimulación con cafeína . . . . .	19
3.4. Estimulación eléctrica . . . . .	20
3.5. Viabilidad . . . . .	21
3.6. Adquisición y análisis de las señales . . . . .	22
3.7. Estadística . . . . .	23

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	4
<b>4. Resultados</b>	<b>25</b>
4.1. Respuesta a estímulos con cafeína . . . . .	25
4.2. Respuesta a estímulos eléctricos . . . . .	26
<b>5. Discusión</b>	<b>30</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>34</b>
<b>7. Limitaciones y perspectivas</b>	<b>35</b>

# Resumen

El ruido añadido a los estímulos puede alterar el funcionamiento de los sistemas biológicos excitables. Con cierto nivel de variabilidad estas modificaciones pueden ser benéficas para el sistema, a esto se le conoce como resonancia estocástica. Este fenómeno ha sido demostrado en el desempeño del corazón de ratón como órgano aislado y en modelo *in vivo* de rata. Este descubrimiento llevó a la experimentación sobre los dos tipos principales de células presentes en el corazón: las autoexcitables y las excitables.

En las primeras no se encontraron cambios significativos ante estímulos de campo eléctrico con variabilidad. Sin embargo, en el segundo tipo, empleando el modelo celular H9c2(2-1), se encontró que estos tienen un efecto sobre la amplitud máxima y la velocidad de subida de la concentración de calcio intracelular. Por otra parte, la cantidad de células que respondieron a estos estímulos fueron muy pocas por lo que quedó abierta la pregunta sobre cuál es el montaje experimental adecuado para poder hacer un estudio sistemático en este modelo.

En este trabajo se compararon la respuesta a estímulos de cafeína y de campo eléctrico aplicadas a las células H9c2(2-1) en mioblastos y miotubos. Se encontró que la respuesta de los mioblastos a ambos tipos de estímulos fue inusual, a diferencia de los miotubos que respondieron en su mayoría ante las mismas situaciones.

Además se agregó el diez por ciento de variabilidad a las señales de campo eléctrico aplicadas para evaluar un posible cambio en la respuesta. La subida de la respuesta de calcio fue ralentizada al ser estimulada con ruido, a diferencia del tiempo de remoción que no presentó diferencias. Se concluyó que para hacer un estudio de campo eléctrico en H9c2(2-1) es necesario diferenciarlas a miotubos.

# Abstract

Noise added to stimuli may change the performance of excitable biological systems. With certain amount of variability this modifications may be beneficent to the system, which is known as stochastic resonance. This phenomenon have been proven on the mouse heart efficiency as an isolated organ and in an *in vivo* rat model. This discovery lead to the experimentation on the two main heart cell types: the self-excitables and the excitable.

There was not any significant change on the first type stimulated with variable electric field. Nevertheless, it was found on the second one, using the heart cell model H9c2(2-1), that this kind of stimulus had an effect on the intracellular calcium concentration maximum amplitude and the upward speed. However, there was a few amount of stimuli-responsive cells, so it remained the open question about what is the best experimental setup on this model to make a systematic research.

In this project it was compared the response to caffeine and electric field stimuli applied to H9c2(2-1) in myoblast and myotube stage. It was found that the stimuli-responsive myoblast was unused, on the other hand, the myotubes responses were usual at the same situations.

Also, it was added ten percent of variability to the electric field signals applied to evaluate a possible change. The upward time was slower when the noise was added to the stimuli, but the downward time remained with no changes. It was concluded that in order to study the electric field effects on H9c2(2-1) it is needed their differentiation.

# Capítulo 1

## Marco teórico y antecedentes

### 1.1. El corazón

Un órgano de vital importancia para los mamíferos que se comporta como dos bombas hidráulicas. La función principal de una es distribuir la sangre, que transporta oxígeno y nutrientes, a cada célula del organismo y de la otra es purificar este fluido al trasladarlo a los pulmones en donde se deshace del  $\text{CO}_2$  y captura  $\text{O}_2$  para volver al primer sistema.

Este está formado principalmente por cuatro compartimentos, dos aurículas y dos ventrículos compuestos de fibras musculares. Las aurículas se llenan de sangre proveniente de las venas, al contraerse, esta pasa a los ventrículos, que por la misma acción, es bombeada hacia los sistemas circulatorios sistémico y pulmonar. Cabe mencionar que en cada compartimento existen válvulas que sirven para evitar el retorno de la sangre hacia el espacio anterior al que se encuentra.

Para llevar esto a cabo se requiere de la contracción sistemática de las aurículas y ventrículos orquestada por oscilaciones de potencial eléctrico generadas en el nódulo sinusal y transmitidos a través de las fibras musculares que enervan al órgano [1].

En resumen, el corazón está formado por tipos principales de fibras musculares: las excitables, que son las que forman las paredes de los compartimentos y se encargan de la eyección

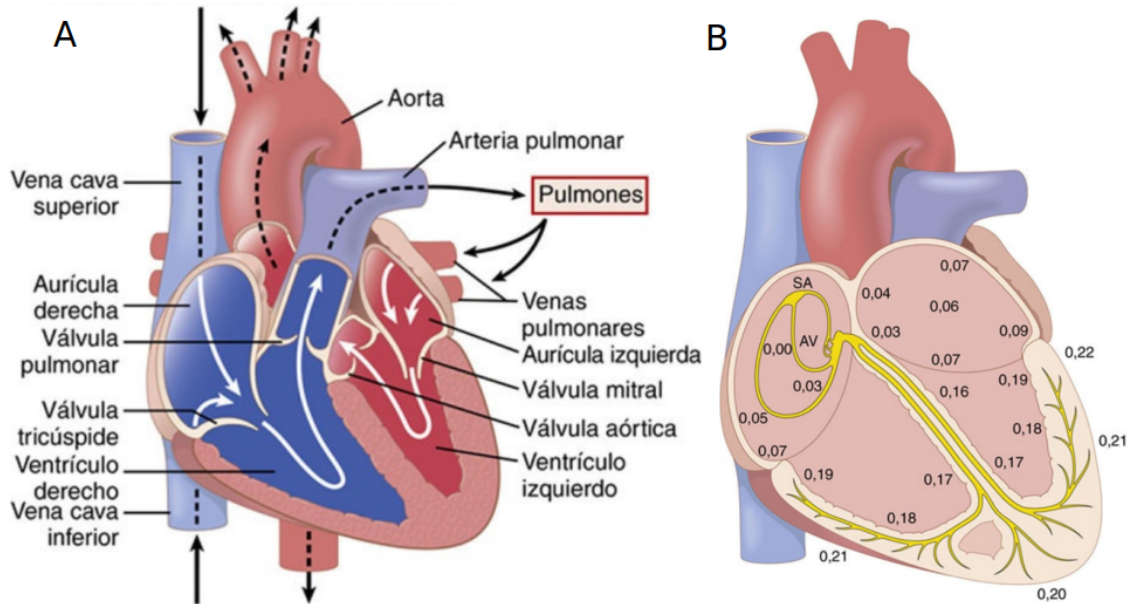


Figura 1.1: Esquemas del corazón. A muestra los comportamientos del corazón y como la sangre se distribuye, mientras que B presenta las fracciones de segundo que el potencial de acción tarda en aparecer en cada punto de las fibras, marcadas en color amarillo (SA = nódulo sinusal, AV = nódulo atrioventricular). Modificada de [1].

de la sangre (figura 1.1 A); y las autoexcitables y de transmisión, que son las encargadas de generar el potencial de acción y transmitirlo para que este funcione de manera adecuada (figura 1.1 B). Este trabajo está enfocado en el primer tipo de fibras, por lo que se explicará su fisiología celular a continuación.

### 1.1.1. Acoplamiento excitación-contracción de músculo cardiaco

Es el proceso que conlleva desde la excitación eléctrica de los cardiomiocitos hasta la contracción del corazón. En este el  $\text{Ca}^{2+}$  es de suma importancia ya que es el encargado directo de activar los miofilamentos que llevan a cabo la contracción muscular.

Un estímulo eléctrico que sobrepasa el umbral de activación de los canales dependientes de voltaje de sodio ( $\text{Na}_v$ ) permite que ingresen elevadas cantidades de  $\text{Na}^+$  hacia el citosol,



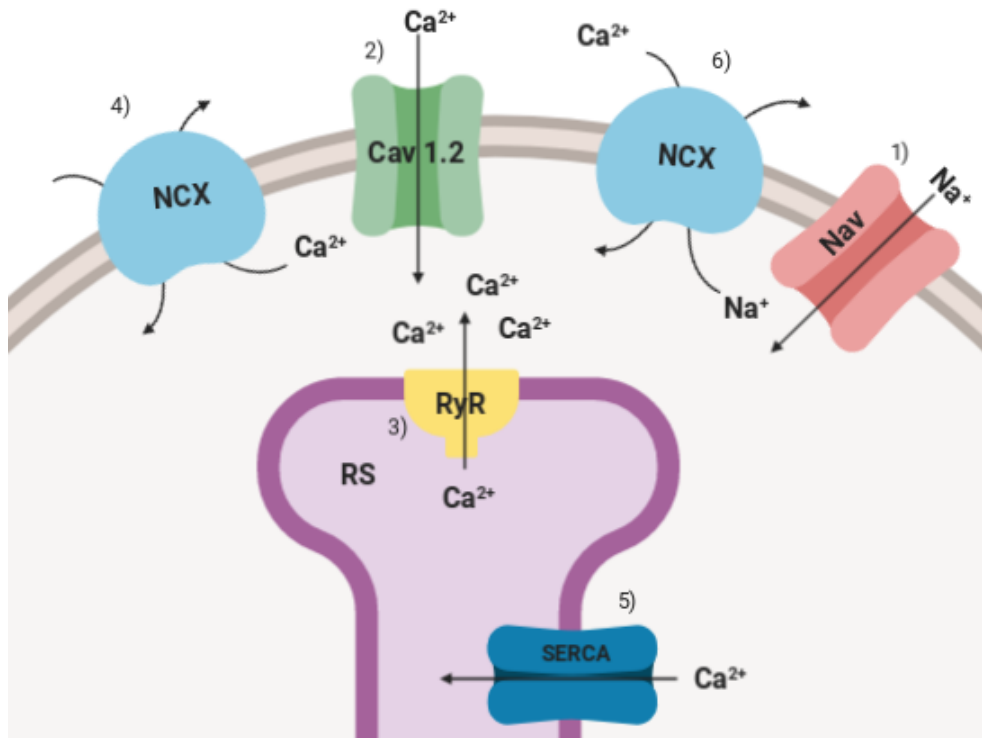


Figura 1.2: Algunos mecanismos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en el cardiomiocito. Tras un estímulo eléctrico entra  $\text{Na}^+$  (1) a la célula lo cual la depolariza abruptamente activando los  $\text{Ca}_v 1.2$  permitiendo el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  (2) hacia el citoplasma. El aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  favorece la liberación de este mismo ion del retículo sarcoplásmico (3) hacia el citoplasma lo cual sirve para llevar a cabo la contracción del miocito. Después de este proceso, el calcio es permutado por sodio hacia el medio extracelular por el NCX (4) y también es reingresado al retículo sarcoplásmico por la SERCA consumiendo ATP (5). Dependiendo de las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  el NCX puede funcionar en modo inverso, (6) lo cual puede aumentar la velocidad de ingreso del calcio hacia el citoplasma.

a consecuencia de esto el potencial de membrana aumenta abruptamente. Tras esta depolarización, los canales de calcio sensibles a voltaje tipo L ( $\text{Ca}_v$ ) se abren dejando que fluya este ion, impulsado por su gradiente de concentración, hacia el interior de la célula. El  $\text{Ca}^{2+}$  en el espacio submembranal provoca la apertura de los canales receptores de rianodina (RyR) del retículo sarcoplásmico (RS) liberando de este espacio altas cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  que se difunde en el medio intracelular. Este proceso es conocido como liberación de calcio inducida

por calcio.

Los iones libres de calcio interactúan con la proteína troponina C de los miofilamentos activándola y permitiendo que se lleve a cabo la contracción, para la relajación del miocito, el calcio necesita liberarse de dicho sitio y ser removido del citoplasma. Para eso se requieren los mecanismos de remoción que involucra principalmente a las proteínas SERCA (*sarcoplasmatic/endoplasmatic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase*), el intercambiador sodio-calcio (NCX), la PMCA (*plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase*) o el MCU (*mitochondrial calcium uniporter*) [2].

Particularmente el NCX, el cual permuta tres iones de sodio por uno de calcio entre el citoplasma y el medio extracelular, puede funcionar en ambas direcciones dependiendo de la diferencia de concentración de cada uno de ellos. El modo directo funciona, la mayor parte del tiempo, cuando la concentración de calcio citoplasmática ( $[Ca_c^{2+}]$ ) es alta transportándola hacia el exterior. El NCX actúa en modo reversa durante un periodo de tiempo relativamente corto, cuando los  $Na^+$  comienzan a ingresar en la célula y la  $[Ca^{2+}]_c$  es mucho menor, este mecanismo tiene un papel relevante en la velocidad de ingreso de calcio o como una redundancia en el sistema para asegurar que la contracción se lleve a cabo tras la depolarización [3].

## 1.2. Estimulación con campo eléctrico

La estimulación con campo eléctrico ha sido utilizada de manera clínica para mantener el ritmo de las contracciones del corazón, así como para revertir las arritmias. Por otra parte, este tipo de estímulos puede llegar a ser perjudicial para el órgano, en distintos niveles taxonómicos, por lo cual esto ha sido objeto de estudio durante muchos años para comprender las implicaciones fisiológicas y los límites viables de los cardiomiocitos[4].

Klee y Plonsey establecieron la teoría sobre la diferencia del voltaje inducido a las células dependiendo de su forma y orientación con respecto al campo eléctrico [5]. Sus resultados, resumidos en la figura 1.3, muestran que mientras menos sean las líneas de campo que inter-

actúan con el cuerpo expuesto, mayor será la diferencia de potencial inducido en este.

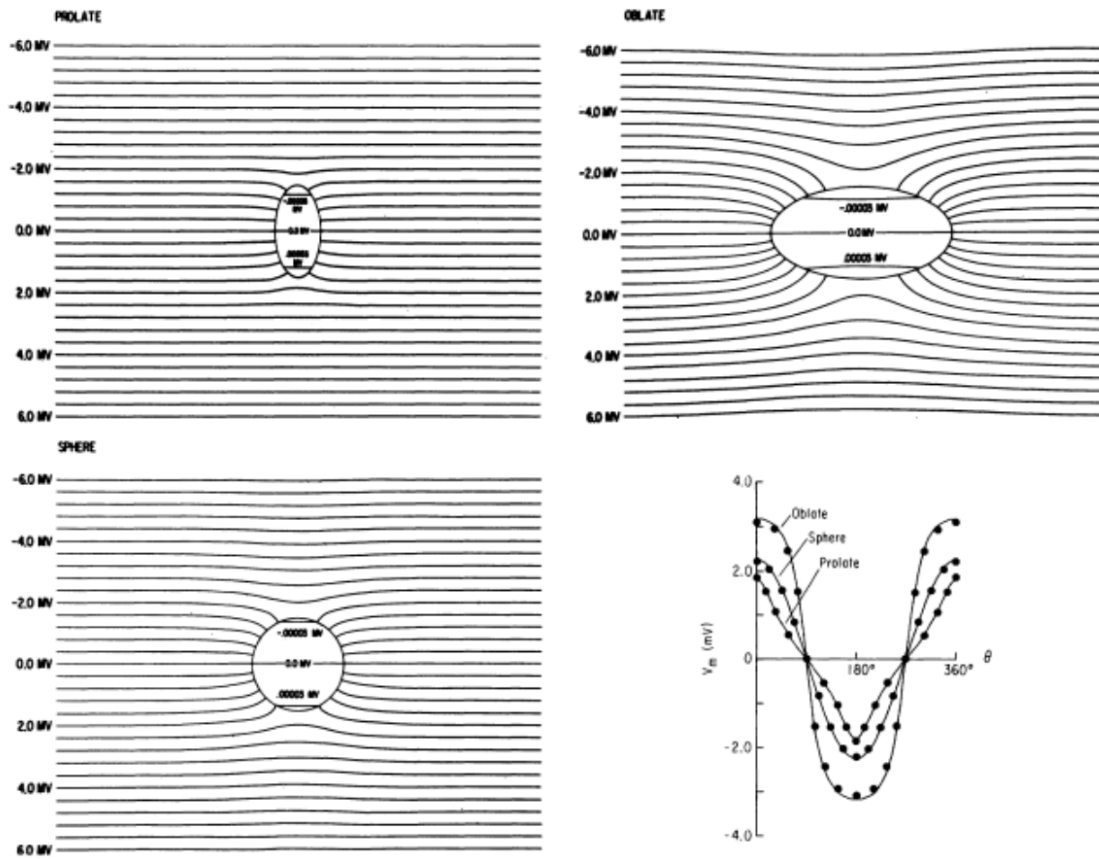


Figura 1.3: Trazos equipotentes de la solución a la teoría de la distribución de campo eléctrico sobre los cuerpos con diferente morfología. La cantidad de líneas de campo, espaciadas entre sí 0.4 mV, que corta el objeto es inversamente proporcional al potencial eléctrico inducido. En la gráfica de abajo a la derecha se representa en puntos los resultados numéricos de cada valor de voltaje para cada ángulo dado y las líneas sólidas representan el ajuste de estas soluciones. Modificada de [5]

Años más tarde Knisley y colaboradores comprobaron esta teoría empleando ventrículos aislados de corazón de conejo de manera experimental utilizando un marcador fluorescente sensible al potencial eléctrico (di-4-ANEPPS). Al exponer los miocitos, que poseen una forma alargada, al campo eléctrico observaron su hiperpolarización en el polo más cercano al ánodo, depolarizando el extremo opuesto [6]. Explicado a detalle en la figura 1.4.

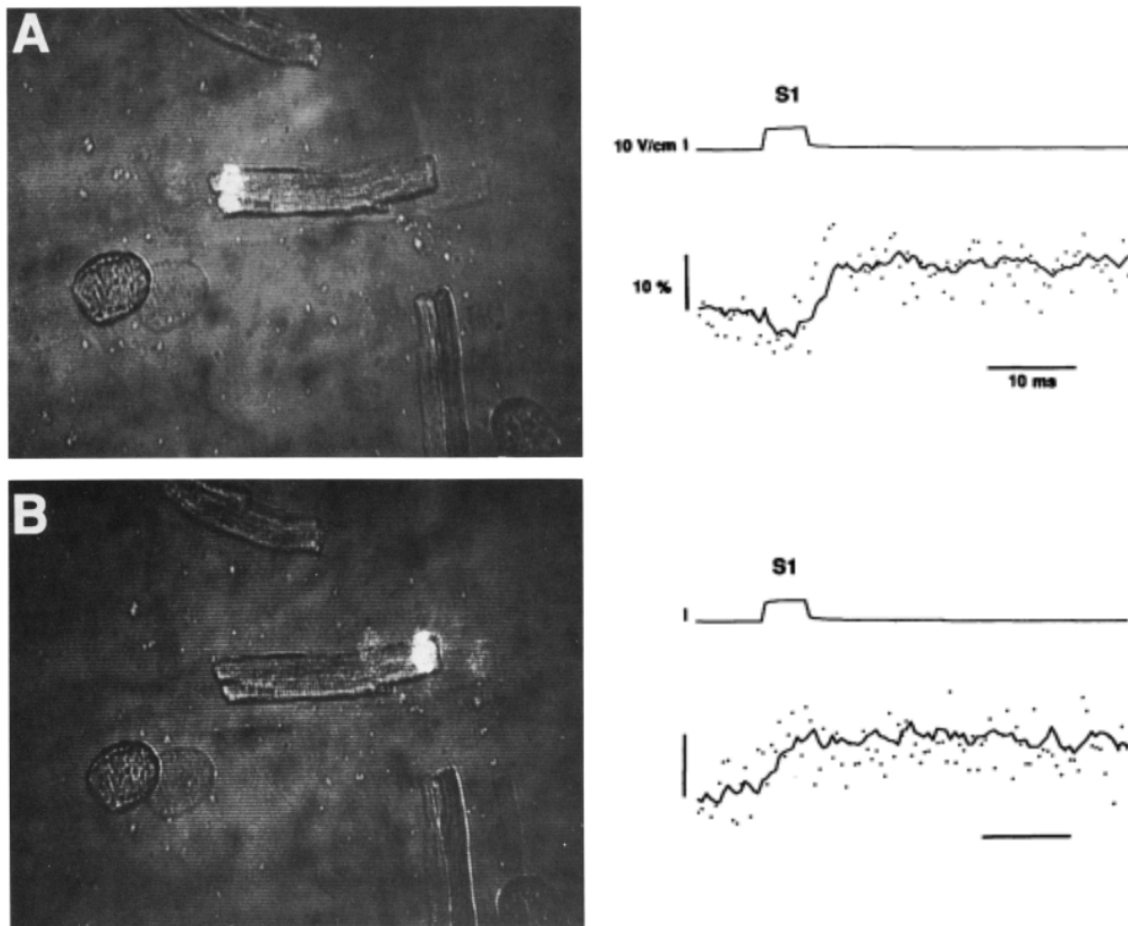


Figura 1.4: Del lado izquierdo se muestra el mismo cardiomiocito estimulado con campo eléctrico con dirección de izquierda a derecha. En la fila A se registra el lado de la célula apuntando hacia el ánodo, mientras que en el B hacia el cátodo. En la columna de la derecha se muestran en la parte superior, de cada fila, el estímulo aplicado (S1) y en la parte inferior la fluorescencia que representa el potencial de membrana adquirido. Para la fila A se puede observar que justo en el momento de la estimulación la célula se hiperpolariza y al terminar se depolariza al nivel del potencial de acción. Por otra parte, en la fila B al momento del estímulo la célula se depolariza manteniendo ese estado aun después que este termine. Modificada de [6]

Por lo tanto, al aplicar campo eléctrico sobre cardiomiocitos estos se pueden depolarizar llevando a cabo su contracción. Bassani y colaboradores investigaron el potencial, inducido

por campo eléctrico, mínimo que las células ventriculares requieren para llevar a cabo este proceso con diferentes orientaciones espaciales de la célula. Sus resultados indicaron que el umbral de activación es el mínimo cuando el eje mayor se encuentra alineado al campo eléctrico y es máximo cuando es ortogonal [4].

### 1.3. Ruido en los sistemas biológicos

El ruido es un factor que se encuentra en todos los niveles de los sistemas biológicos el cual puede ser intrínseco o extrínseco dependiendo de su origen. El primero se refiere a la aleatoriedad de los sucesos que se encuentran dentro del sistema, mientras que el segundo es debido a la variabilidad del entorno del mismo [7].

Este es considerado generalmente como una señal externa que perjudica a la original. En otras disciplinas, como la electrónica, este ha sido siempre no deseado y se trata siempre de minimizarlo o erradicarlo. Por otra parte, en biología el ruido intrínseco es inherente y a pesar de esto los efectos observables de un estudio son apreciables, por ejemplo los trazos de la figura 1.4. Sin embargo, tomando el mismo ejemplo, se procura que el ruido extrínseco con el que se estimula un sistema biológico sea de la menor magnitud posible.

No obstante, el ruido extrínseco a cierto nivel puede ayudar a mejorar el desempeño de un sistema biológico, fenómeno conocido como resonancia estocástica. En el caso de las neuronas se ha demostrado, tanto en simulaciones como experimentalmente, que al aplicar señales débiles y añadir cierto grado de ruido, este ayuda a que sobrepase el umbral de activación y pueda disparar un potencial de acción [8, 9, 10].

Dentro del equipo de trabajo se ha investigado el efecto del ruido añadido a estímulos eléctricos en la respuesta mecánica del corazón de ratón como órgano aislado y en modelo *in vivo* de rata. En el primer caso se encontró que con bajos niveles de este ruido, el corazón mejora su desempeño medido como la capacidad de contraerse ante los estímulos a una rela-

ción de 1:1. En el modelo *in vivo* se encontró que el ruido añadido mejora la capacidad del corazón como bomba aumentando su gasto cardíaco [11].

Estos resultados abrieron nuevas preguntas sobre la repercusión a nivel celular. Por lo que se estudió en células aisladas del nodo sinusal de embrión de pollo, a las cuales se les aplicaron trenes de pulsos de campo eléctrico con distintos niveles de ruido añadido, sin embargo, estas células se mostraron robustas en su funcionamiento ante los estímulos [12].

También se llevó a cabo la investigación sobre células excitables de corazón empleando como modelo celular de cardiomiocito a la línea celular H9c2(2-1). Estas células se estimularon con dos pulsos de campo eléctrico, el primero sin y el segundo con distintos porcentajes de ruido añadido, y se analizó la dinámica de calcio en respuesta a estos estímulos. A niveles de veinte y treinta por ciento de ruido añadido, se observaron cambios en los tiempos de subida y en la amplitud máxima de las señales de calcio observadas [13]. Aunque se vio un efecto relacionado a la variabilidad en el estímulo, el porcentaje de células que respondieron ante estos estímulos fue bajo, por lo que queda la pregunta abierta sobre si las condiciones celulares eran las adecuadas para este tipo de estudio.

## 1.4. Modelo celular H9c2(2-1)

Esta línea celular es un subclon del clon original derivado de ventrículo de embrión de rata BD1X. Aunque histológicamente se pueden caracterizar como mioblastos, al alcanzar la confluencia se diferencian a miotubos que exhiben propiedades de músculo esquelético [14, 15]. Por estos motivos ha sido usada como modelo de estudio tanto de células de músculo cardíaco como esquelético [16, 17].

Fue a principios de los años 90 cuando se comenzó a estudiar las propiedades morfológicas, electrofisiológicas y bioquímicas de esta línea de cultivo celular. Se midieron las corrientes de calcio en célula aislada, empleando bario, cuyos resultados muestran que la actividad de

los canales de calcio tipo L es similar en duración y en el potencial de activación a aquellos reportados en células ventriculares aisladas de cuyo y rata Wistar [18, 19, 20].

Por medio de la electrofisiología se caracterizaron dos clases de canales de calcio tipo L y con ensayo de PCR se concluyó que, en varias semanas de cultivo, estas células expresan simultáneamente canales de calcio dependientes de voltaje de músculo esquelético y cardiaco ( $Ca_v1.1$  y  $Ca_v1.2$  respectivamente). [21].

Años después se encontró que a diferentes tiempos de cultivo las células muestran diferentes proporciones de corrientes de calcio similares a las conocidas de músculo cardiaco ( $I_{CARD}$ ) y esquelético ( $I_{SKM}$ ). En los primeros 3 días se encuentra únicamente  $I_{CARD}$ , a partir del día 5  $I_{CARD}$  e  $I_{SKM}$  son pariguales, mientras que a partir del séptimo día, cuando los miotubos se han formado, predomina  $I_{SKM}$ . Sin embargo, este efecto es anulado al tratarse las células con ácido retinoico lo cual promueve la expresión de  $Ca_v1.2$  en miotubos [22].

A principios de este siglo se observó que al agregar al medio extracelular alta concentración de cloruro de potasio (KCl), cafeína y vasopresina el calcio intracelular de los mioblastos aumentaba únicamente ante el último, sugiriendo que solo se encontraba el receptor a IP3 del retículo sarcoplasmático. A diferencia de los miotubos que respondían a los tres tipos de estímulos aplicados. Se llevaron a cabo ensayos de PCR y se encontró que existía una mayor expresión de los canales de calcio tipo L, tanto cardiacos como esqueléticos, y de los canales RyR en los miotubos comparado con los mioblastos. [23]

Sin embargo, en este modelo celular el uso de campo eléctrico para el estudio de la dinámica de calcio intracelular ha sido estudiado únicamente en el trabajo explicado previamente [13]. Lo anterior sugiere que los mioblastos de esta línea celular no tienen la maquinaria molecular necesaria, explicada en la sección 1.1.1, para disparar su potencial de acción tras una depolarización. También indican que es necesario su diferenciación a miotubos para poder responder a los estímulos eléctricos y así poder hacer un estudio sobre las implicaciones celulares que el ruido puede tener en este modelo.

# Capítulo 2

## Hipótesis y objetivos

### 2.1. Justificación

El desempeño del corazón como órgano aislado, así como en modelo *in vivo*, ha presentado mejoras al ser estimulado con cierto porcentaje de ruido añadido [11]. Sin embargo, las células aisladas de nodo sinusal se presentaron robustas al aplicar estímulos de campo eléctrico con variabilidad [12]. Por otra parte, las células H9c2(2-1) sí presentaron diferencias ante el campo eléctrico con ruido, aunque en una población reducida [13]. Esto último puede deberse a que las condiciones celulares no fueron las adecuadas ya que se ha demostrado que la expresión de las proteínas necesarias para llevar a cabo la liberación de calcio inducida por calcio aumenta conforme incrementa el tiempo de cultivo, cuando se forman los miotubos [23].

### 2.2. Hipótesis

La respuesta de calcio ante estímulos eléctricos en las células H9c2(2-1) puede ser afectada, tanto por su estadio, como por la variabilidad añadida al estímulo.



## **2.3. Objetivos**

### **2.3.1. Objetivo general**

Estudiar la dinámica de calcio en mioblastos y miotubos de la línea celular H9c2(2-1) ante estímulos de campo eléctrico con variabilidad.

### **2.3.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar las condiciones experimentales para garantizar la respuesta de las células a los estímulos.
- Analizar la dinámica de calcio ante los estímulos eléctricos con variabilidad.

# Capítulo 3

## Metodología

### 3.1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular H9c2(2-1), donada por CINVESTAV Unidad Zacatenco, la cual proviene del ventrículo embrionario de rata [14]. Estas se incubaron en medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco) complementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de antibiótico (penicilina, estreptomycin y neomicina) a 37°C en un ambiente húmedo con 5 % de CO<sub>2</sub>.

El cultivo se resembró cada 3 o 4 días cuando la confluencia era aproximadamente del 80 % . Para esto se desechaba el medio, se enjuagaba con buffer de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) dos veces, se agregaba 2 ml de tripsina a 0.25X y se incubaba de 8 a 10 minutos hasta que la mayoría o la totalidad de las células se encontraran suspendidas y no adheridas al frasco de cultivo. Pasado esto se adicionaba 2 ml de medio de cultivo y se llevaba a cabo el conteo celular usando la cámara de Neubauer. Se sembraron aproximadamente 50000 (52 cel/mm<sup>2</sup>) células en un cubreobjetos bañado en 0.5 % de gelatina dentro de una caja petri con medio de cultivo y se incubaba de 1 a 3 días para llevar a cabo los experimentos con los mioblastos.

Al momento en que los cultivos alcanzasen un 90-95 % de confluencia (2 - 3 días) se reducía el porcentaje de SFB a 1 %, lo cual disminuye la síntesis de ADN y favorece la dife-

renciación celular a miotubos. Se cultivaba por otros 4 - 7 días hasta que se hubiesen formado los miotubos para llevar a cabo los experimentos. El medio de cultivo se cambiaba por medio fresco cada dos días en todas las condiciones.

## 3.2. Fluorescencia

Se empleó Fluo-4-AM, el cual es un quelante de calcio modificado para que emita fluorescencia dependiendo de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que permite que sea utilizado para medir la concentración de este ion dentro de las células vivas. Su longitud de onda excitación y emisión son de 494 y 506 nm respectivamente. El éster AM le permite atravesar la membrana plasmática y dentro de las células las esterasas se encargan de separar el grupo ".AM" del Fluo-4. De esta manera el fluoróforo queda atrapado en el espacio intracelular, ya que no puede atravesar la membrana plasmática por si solo, y al unirse a los  $\text{Ca}^{2+}$  emite fluorescencia [24].

Para cargar las células se disolvió 50  $\mu\text{g}$  de Fluo-4-AM en DMSO líquido para obtener una concentración de 2 mM. Las células se lavaron en solución de Tyrode con las siguientes concentraciones (en mM): NaCl 137,  $\text{CaCl}_2$  1.8, KCl 5, MgCl 1, Dextrosa 10 y HEPES 10; para cargarse después con 5  $\mu\text{M}$  de Fluo-4-AM y 0.06 % de Plurónico disueltos en 100  $\mu\text{l}$  de solución de Tyrode. Se incubó de 40 a 60 minutos protegido de la luz. Al transcurrir este tiempo se remuevió el medio extracelular para remover el Fluo-4-AM que no haya sido internalizado a las células y se agrega solución de Tyrode fresca a 37°. De esta manera, el cultivo está listo para realizarse los experimentos que son descritos en las secciones 3.3 y 3.4.

## 3.3. Estimulación con cafeína

Para estimular los canales receptores de rianodina (RyR) se aplicó un bolus de 100  $\mu\text{l}$  de cafeína disuelta en la solución Tyrode a una concentración final de 20 mM. Esta se agregó, a 37°, durante la adquisición de los videos.

### 3.4. Estimulación eléctrica

La señal eléctrica fue construida digitalmente utilizando el software *Labview* y se convirtió a analógica a través de la tarjeta DAQ. Esta señal fue amplificada utilizando el amplificador operacional OPA454 cuya etapa de potencia y de acondicionamiento fue diseñada y construida en nuestro laboratorio por miembros del mismo grupo de investigación en trabajos anteriores.

Las células cargadas con Fluo-4 fueron colocadas en una cámara de estimulación eléctrica modelo RC-21BRFS. La cual cuenta con dos electrodos de platino paralelos distanciados entre sí 5 mm sobre los cuales se aplica la diferencia de potencial.

El protocolo de estimulación constó de la aplicación de dos pulsos cuadrados, de amplitud  $E$ , con duración  $t$  y un periodo de 100 s (figura 3.1). En el grupo control ambos estímulos son sin ruido añadido. Mientras que en el grupo experimental el primer pulso lo es y al segundo se le suma el diez por ciento de ruido. Es decir que en cada instante de tiempo la señal, en el estado alto, puede fluctuar desde  $0.9 E$  hasta  $1.1 E$  y en el nivel basal desde  $-0.1 E$  hasta  $0.1 E$ .

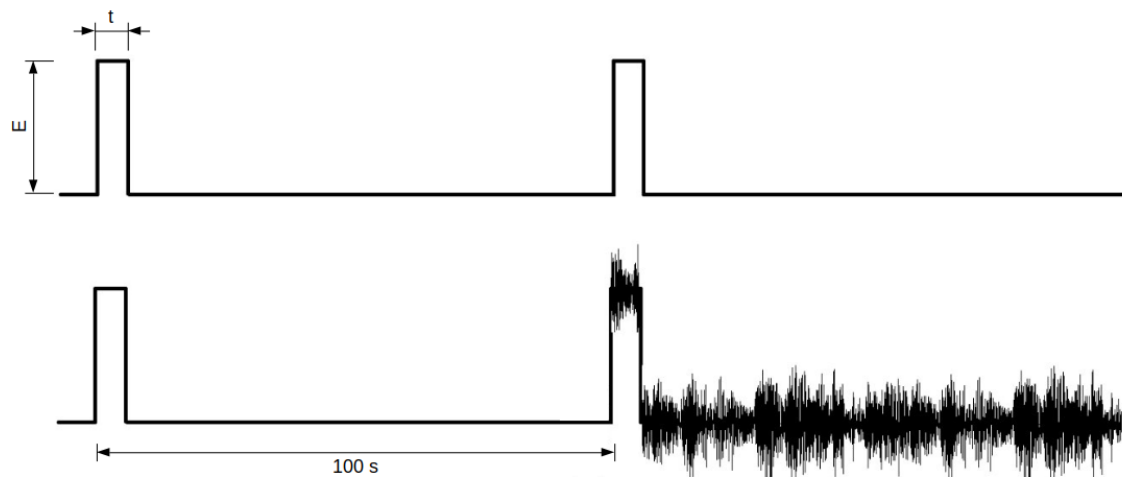


Figura 3.1: Protocolo de estimulación eléctrica donde  $E$  es la magnitud de campo eléctrico y  $t$  la duración del pulso. La señal de arriba representa al grupo control, mientras que la inferior al grupo experimental.

Las células fueron estimuladas con amplitudes desde 22 hasta 35.2 V/cm con duraciones desde 5 hasta 1000 ms. Cada combinación de los parámetros de estimulación fue probada con una población diferente de células para que se encontrara cada una de ellas en las mismas condiciones experimentales iniciales. Esto se hizo con el fin de encontrar los parámetros para garantizar la respuesta de calcio. La señal aplicada fue monitoreada empleando un osciloscopio Tektronix midiendo directamente el ánodo del campo eléctrico. La grabación del video comenzó diez o treinta segundos antes del primer estímulo para monitorear la basal de  $\text{Ca}^{2+}$  y asegurar así que el aumento del calcio coincidiera con el momento en que se aplica el campo eléctrico.

### 3.5. Viabilidad

Para comprobar que las células se mantienen viables durante los procesos de estimulación se llevaron a cabo tinciones con Hoechst 33342 y bromuro de etidio. El primero es una molécula que atraviesa la membrana citoplasmática y emite fluorescencia azul cuando se une a ADNbc, por lo que se utiliza para marcar los núcleos de las células. El segundo es un marcador que emite fluorescencia cuando se une al ADN, a diferencia del anterior, este es impermeable a la membrana plasmática, por lo que solo puede actuar cuando existe un daño que hace inviable a la célula.

Ambos reactivos se diluyeron en DMEM/F12 (sin suplementar) y se mantuvieron a 37° protegidos de la luz. Esta solución se utilizó únicamente el mismo día de su preparación.

Como un control de daño inducido por exposición a la luz, se cargaron las células con Fluo-4-AM, como se explica en la sección 3.2, y se mantuvieron expuestas a la longitud de onda de excitación durante 15 minutos. Después se removió el medio extracelular y se agregó la solución con los marcadores y se incubó, protegidas de la luz, de 20 a 40 minutos. El proceso se repitió también para cultivos que fueron excitados con campo eléctrico hasta 31 V/cm.

### 3.6. Adquisición y análisis de las señales

Para saber si existe un cambio en la  $[Ca^{2+}]_c$  producido por cada estímulo es necesario visualizar adecuadamente las células. Es por eso que después de la incubación descrita en la sección 3.2 se monta la cámara de estimulación en el microscopio Nikon Eclipse TE2000-U y se visualiza con un objetivo de 10x con una lámpara de Hg de 120 W (*Lumen Dynamics*) y por medio de filtro se obtiene una longitud de excitación de  $488 \pm 40$  nm.

La imagen es capturada digitalmente en un computador a 10 cuadros por segundo por 250 segundos utilizando el programa *NIS-Elements Advanced Research* (Nikon Instruments Inc.) en donde, creando un archivo con las regiones de interés, se mide la intensidad de fluorescencia a la longitud de emisión de 516 nm para cada célula con la función *Time Measurement* que permite exportar estos valores a un archivo de *Excel*.

Estos datos se importaron en *Matlab R2018a* en donde se aplicaron filtros pasabajas para eliminar el ruido por adquisición y así realizar el análisis y la estadística.

Para medir la amplitud máxima de  $[Ca^{2+}]_c$  de los estímulos con cafeína se restó la señal de fluorescencia de fondo, se normalizó la intensidad de fluorescencia con respecto del nivel basal ( $F_0$ ) y se calculó el aumento ( $F_{max}/F_0$ ). Este cociente representa cuántas veces aumentó la fluorescencia con respecto a su nivel basal. También se midió el tiempo en que la señal demoraba en regresar al 50 % del valor máximo obtenido.

En el caso de las respuestas al estímulo eléctrico, por ser datos pareados, se normalizó la amplitud de toda la señal con respecto a la de la primera respuesta de la siguiente manera:

$$F_n = \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F_{min}} \quad (3.1)$$

donde  $F$  es la señal de fluorescencia,  $F_{min}$  el valor de la fluorescencia basal antes del primer estímulo y  $F_{max}$  es el valor del primer pico. De esta manera la temporalidad de los sucesos

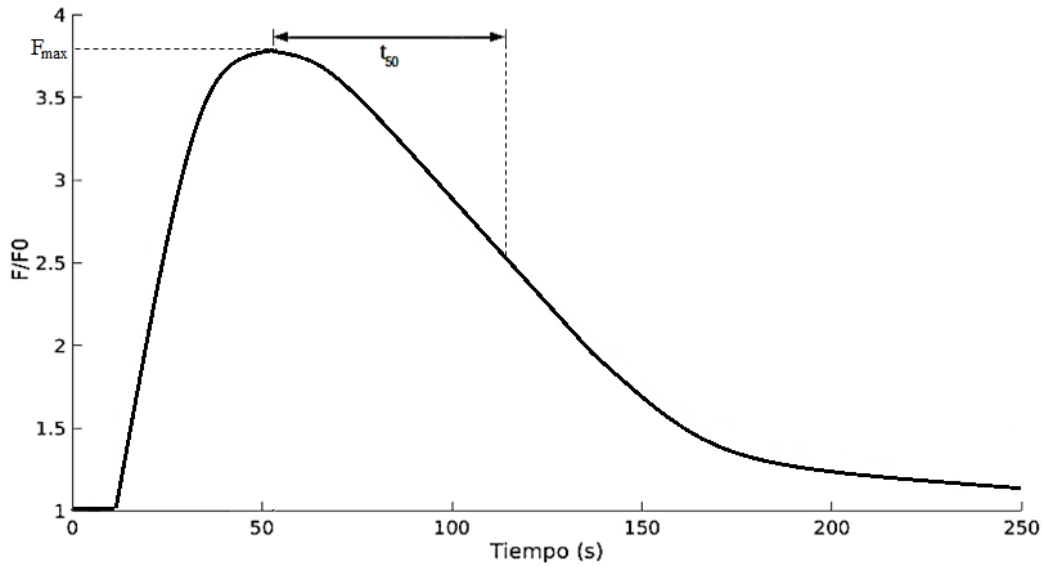


Figura 3.2: Respuesta esperada de estímulo con cafeína. Se muestran los parámetros a medir de amplitud máxima y el tiempo de esta en decaer al 50 %.

no se ve alterada. Se calcularon los tiempos de cada respuesta al llegar a su nivel máximo ( $t_{sub}$ ) y los que esta se requería para alcanzar a un 50 % ( $t_{50}$ ) de su valor estable.

### 3.7. Estadística

Para poder evaluar si el ruido añadido a los estímulos produce algún cambio, se necesita comparar de la manera adecuada con el grupo control. En cada experimento realizado la cantidad de células podía variar de 10 a 30 por campo de visión. Sin embargo, la  $N$  estadística es igual al número de cultivos experimentados y no a la cantidad de células, por lo tanto se obtuvo un solo valor de cada parámetro como se plantea:

$$\Delta t_{sub} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(t_{sub_{i,1}} - t_{sub_{i,2}})}{t_{sub_{i,1}}} \quad (3.2)$$

$$\Delta t_{50} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(t_{50_{i,1}} - t_{50_{i,2}})}{t_{50_{i,1}}} \quad (3.3)$$

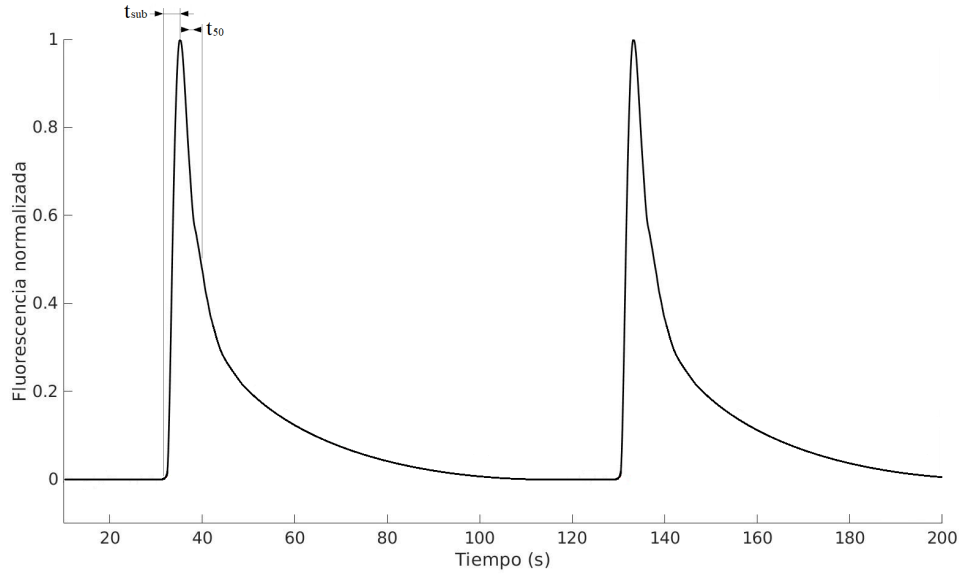


Figura 3.3: Respuesta esperada a los estímulos de campo eléctrico con los parámetros de tiempo de subida y de remoción a medir.

donde  $n$  es el número de células por cultivo e  $i$  es cada una de las células.

Después se plantea la hipótesis nula  $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ , donde  $\mu_{1,2}$  son los promedios del grupo control y experimental para cada uno de los parámetros  $\Delta t_{sub}$  y  $\Delta t_{50}$  evaluados de manera independiente. Se evaluó con  $t$  de Student, debido a que  $N$  es un valor pequeño, de dos colas. De esta manera se puede saber el grado de confiabilidad de que ambas respuestas son iguales.



# Capítulo 4

## Resultados

### 4.1. Respuesta a estímulos con cafeína

Para comprobar la presencia de los canales RyR se aplicó 20 mM de cafeína a los cardiomiocitos en sus dos estadios. En la figura 4.1 se muestra el porcentaje de células por campo de visión que respondieron ante este estímulo. Se consideró como respuesta cuando la fluorescencia subía y volvía a su nivel basal en una temporalidad de decenas de segundos. Fueron muy pocos los mioblastos que llegaron a responder a estos estímulos, sin embargo, después de la diferenciación, como se muestra en la figura 4.1, el porcentaje de respuestas obtenidas ante el mismo ensayo aumentó considerablemente.

Se midió la amplitud máxima de fluorescencia alcanzada, así como el tiempo que requirió en decaer esta a un 50% en las células en las cuales se considero que hubo respuesta. La figura 4.2 resume las diferencias de ambos parámetros entre los diferentes estadios celulares. La  $[Ca^{2+}]_c$  en los miotubos fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) a diferencia del tiempo de remoción de este, ya que no presentó diferencias estadísticas.

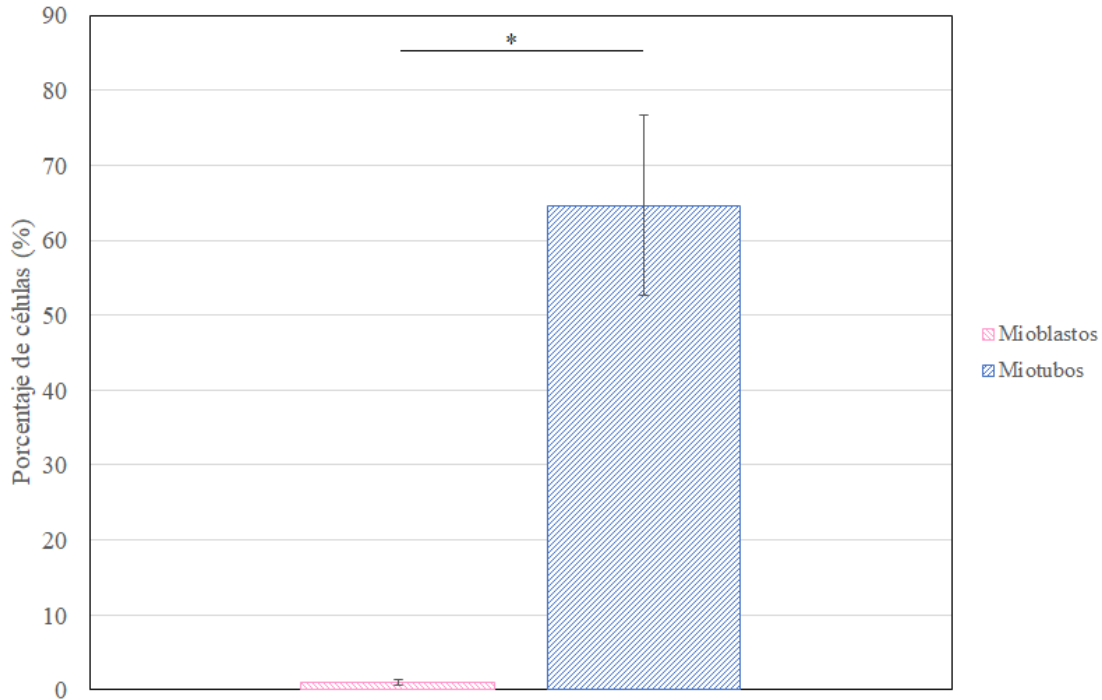


Figura 4.1: Porcentaje de células que respondieron ante los estímulos de 20 mM de cafeína en mioblastos (N = 4) y miotubos (N = 5). Las barras representan el error estándar. \*  $P < 0.01$ .

## 4.2. Respuesta a estímulos eléctricos

Para determinar los parámetros adecuados que garantizaran que el porcentaje de células que respondían por campo de visión al estímulo eléctrico fuera al menos del 50% y de esta manera poder hacer un estudio sistemático de estas células en cultivo, primeramente se estimuló a los mioblastos con campo eléctrico sin variabilidad. Se aplicaron distintos valores de amplitud y duración del estímulo, manteniendo el periodo fijo.

Coincidente con el experiment anterior, el porcentaje de mioblastos que respondieron a estos estímulos fue menor al 10% y la cantidad de experimentos en la que hubo respuesta fue también baja (N = 20).

Para comprobar si de alguna forma el protocolo de estimulación ocasionaba algún daño permanente en los cardiomiocitos, se optó por hacer las pruebas de viabilidad celular. Sin

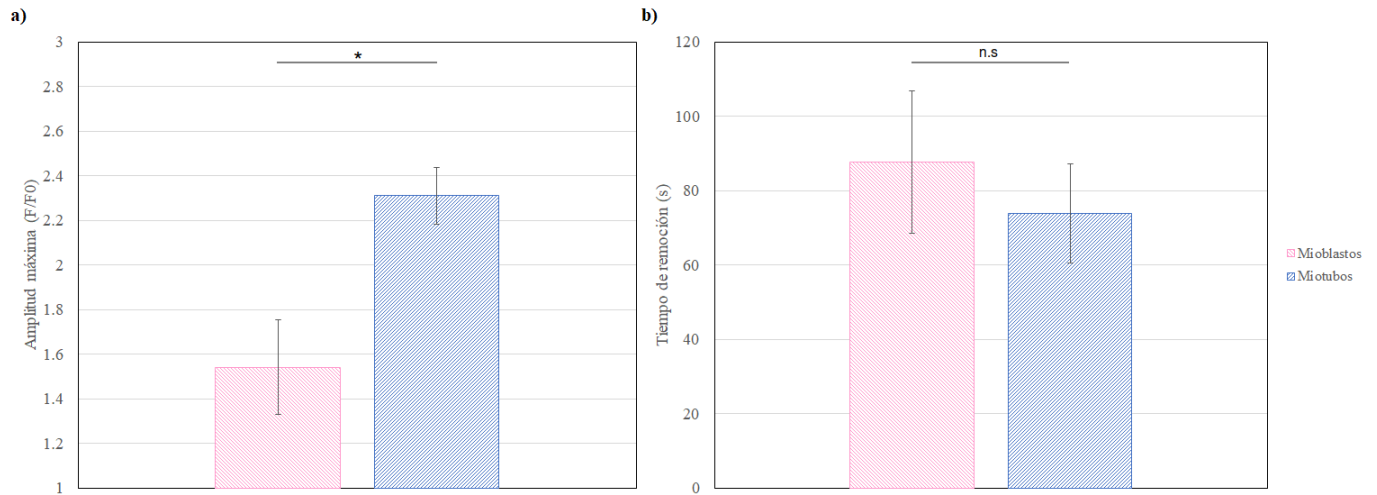


Figura 4.2: Parámetros obtenidos en mioblastos ( $N = 4$ ) y miotubos ( $N = 5$ ). a) Amplitud máxima de la respuesta a 20 mM de cafeína. b) Tiempo de decaimiento al 50% del valor anterior. Más detalle sobre este cálculo en la sección 3.3. Las barras representan el error estándar. \*  $P < 0.05$

embargo, se encontró que se mantenían viables después del tiempo de exposición a la luz azul, así como de los estímulos eléctricos, como se muestra en la figura 4.3.

Posteriormente se determinó la respuesta de los miotubos ante el campo eléctrico, para esto se estimularon con 26.4 V/cm por 500 ms según el protocolo planteado en la sección 3.4. Primeramente se encontró que en este estadio en la mayoría de los cultivos hubo respuesta, al menos, ante el primer estímulo. Sin embargo, para el análisis es imprescindible que las células respondieran a ambos estímulos, así que solo los miotubos que cumplieron este requisito fueron considerados para el análisis en la estadística.

Se observó que al aplicar el campo eléctrico la  $[Ca^{2+}]_c$  aumentaba abruptamente en pequeñas secciones de los miotubos, y a partir de esos puntos focales el  $Ca^{2+}$  aumentando propagándose a lo largo del medio intracelular, tal como se muestra en la figura 4.4. Estas primeras áreas fueron las denominadas regiones de interés y a partir de ellas se analizaron las señales de fluorescencia, representando la  $[Ca^{2+}]_c$  con respecto del tiempo como la mostrada

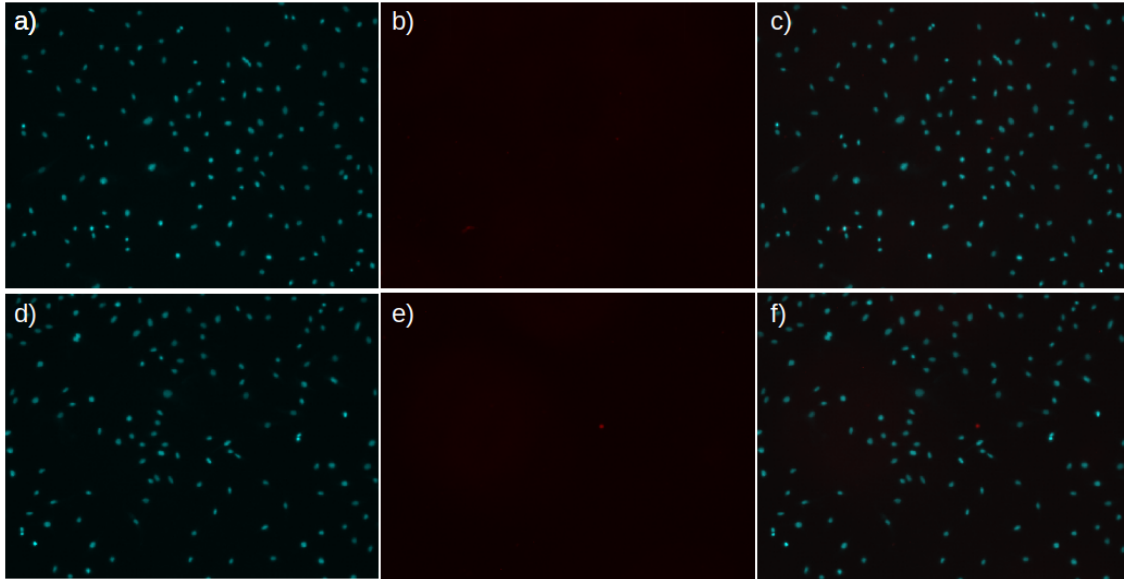


Figura 4.3: Resultados de la prueba de viabilidad explicada en la sección 4.3. La fila de arriba representa al grupo control y la de abajo aquellas que fueron estimuladas con campo eléctrico. Cada fila muestra el mismo campo de visión. En la primera columna se muestran los núcleos de las células marcados por Hoechst 33342, la segunda muestra la tinción por bromuro de etidio y la última es la sumatoria de las primeras dos columnas.

en la figura 3.3.

Para analizar los posibles cambios en los parámetros de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  por agregar el ruido a los estímulos se graficaron los promedios obtenidos como se indicó en la sección 3.7. En la figura 4.5 se comparan las medias de las diferencias normalizadas entre el grupo control y el grupo experimental. Se observó un aumento en la media de  $\Delta t_{sub}$  del grupo experimental cuya prueba estadística indica que el nivel de confiabilidad es  $P = 0.07$ .

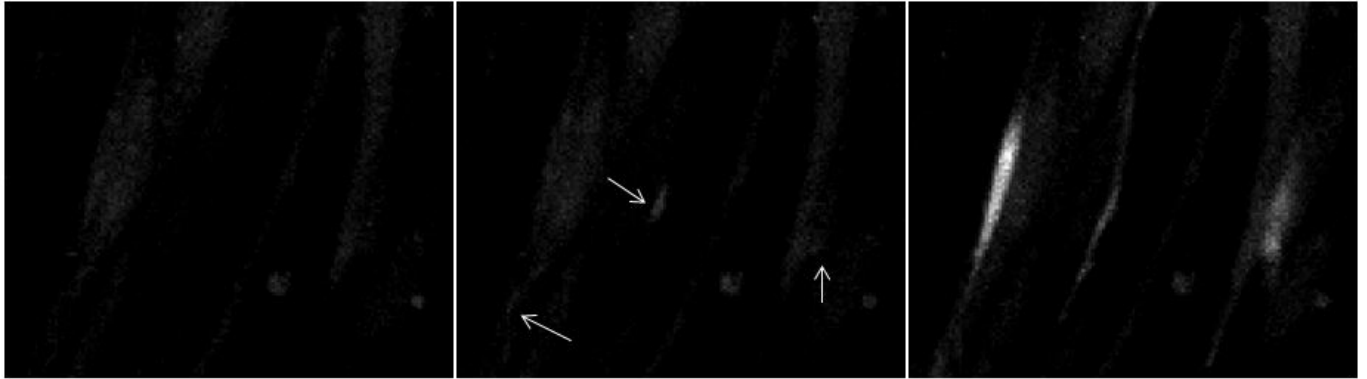


Figura 4.4: Secuencia temporal de las imágenes de fluorescencia obtenidas tras la estimulación con campo eléctrico aplicado con el ánodo en la parte inferior de la imagen. Los tres cuadros pertenecen a la misma zona, la de la izquierda es en el tiempo 0 (justo antes del estímulo), la central son 200 ms después de iniciar el estímulo y para la última transcurrieron 3 segundos aproximadamente. Se puede observar un aumento de calcio en las regiones de los miofilamentos apuntando hacia el ánodo (señalados con las flechas) a partir del estímulo y como este es propagado hacia lo largo de la célula.

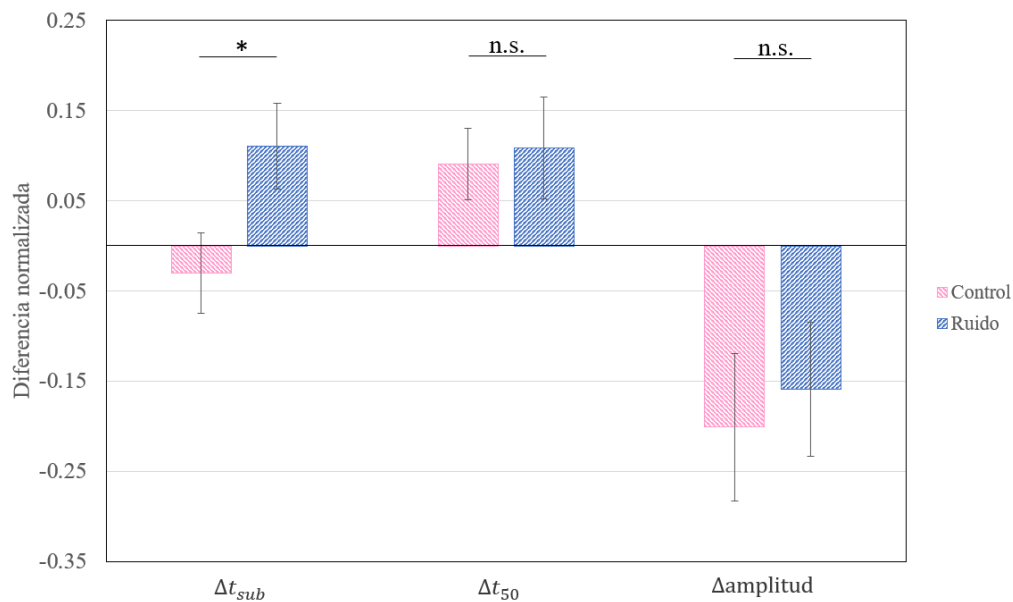


Figura 4.5: Promedio de las diferencias normalizadas de las amplitudes, tiempos de subida y de remoción de las respuestas de  $Ca^{2+}$  al campo eléctrico. Únicamente se observó diferencia en la media del tiempo de subida de la respuesta inducida con ruido añadido con respecto al grupo control. \*  $P = 0,07$

# Capítulo 5

## Discusión

El  $\text{Ca}^{2+}$  es de suma importancia para todo tipo de músculo. Este es responsable directo de la contracción, además de que es un segundo mensajero que ayuda a regular diversas funciones intracelulares [25]. En el corazón, una falla en el manejo intracelular del calcio puede ser causante de disfunción contractil o de arritmias [26]. Es por eso que el papel de cada uno de los mecanismos intracelulares ha sido objeto de estudio durante décadas.

Los mioblastos de la línea celular H9c2(2-1) tienen la particularidad de diferenciarse a miotubos cuando la cantidad de SFB es disminuida en su medio y estos se encuentran confluentes. En este proceso aumenta la expresión de distintas proteínas [27], entre ellas los canales RyR y de calcio tipo L ( $\text{Ca}_v1.1$ ) [23] los cuales son indispensables para el funcionamiento normal del cardiomiocito [2]. Es por esto que se esperaba observar una respuesta de calcio al depolarizar las células diferenciadas con campo eléctrico.

Primeramente se hizo un control estimulando con cafeína para comprobar si los RyR estaban presentes en las células. Aquellas con menos de tres días de cultivo inusualmente respondieron a los estímulos de cafeína. Esto fue distinto en su estado diferenciado en el cual la respuesta estuvo presente en casi la totalidad de las células observadas. Estos resultados coinciden con lo que Szalai y colaboradores [23] reportaron sobre esta línea celular que en los mioblastos la expresión de los canales RyR es inferior a los miotubos, ya que en ausencia de estos, la cafeína carece de sitio de acción y la respuesta es nula o disminuida como se muestra

en las figuras 4.1 y 4.2.

Por otra parte, no hubo diferencias en el tiempo de remoción de la  $[Ca^{2+}]_c$  esto puede deberse a el hecho de que en esta línea las células no diferenciadas, tanto como en las diferenciadas, se encuentra presente la proteína SERCA [27, 28] y el NCX [29], los cuales tienen una contribución directa en el transporte de  $Ca^{2+}$  del citoplasma hacia el lumen del retículo sarcoplasmático y al medio extracelular respectivamente. Sin embargo, esta parte de los resultados difieren de [23], ya que en sus gráficas la  $[Ca^{2+}]_c$  mantiene la misma amplitud por más de cien segundos, esto pudiera estar asociado al tratamiento de permeabilización previo a los estímulos.

De la misma manera que con la cafeína, un porcentaje muy bajo de los mioblastos respondieron a los estímulos con campo eléctrico. Esto debido a que, a parte de necesitar los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, es requerido también la presencia de los canales RyR en el retículo sarcoplásmico que desencadena la liberación de calcio inducida por calcio para observar los transientes de este catión.

Sin embargo, debido a los resultados de [13] quien encontró efecto del campo eléctrico con variabilidad en mioblastos de H9c2(2-1), aunque en un porcentaje bajo de las células observadas, se llevaron a cabo experimentos para encontrar el umbral de activación eléctrica de estas células, es decir, obtener los parámetros eléctricos de amplitud y duración de estímulo que garantizaran respuesta en la dinámica de la  $[Ca^{2+}]_c$ . A consecuencia de la ausencia de respuesta se optó por cesar los experimentos de estimulación eléctrica en mioblastos y estudiar el efecto del ruido en el estadio diferenciado.

Al obtener los transitorios de  $Ca^{2+}$  en las células diferenciadas producidos por la estimulación eléctrica se observó cualitativamente que, en todos los cultivos experimentados, existió respuesta en los miotubos paralelos al campo eléctrico contrario de aquellos perpendiculares al mismo. Esto último conviene con los resultados de Bassani y colaboradores, quienes corroboraron, de manera experimental, la teoría de que la dirección del cardiomiocito al campo

eléctrico afecta su umbral de activación siendo estos más susceptible cuando se encuentran longitudinalmente que transversalmente [4]. Dichos transitorios tuvieron origen siempre en el extremo de la célula cercano al ánodo, con menor frecuencia en secciones intermedias del miotubo, pero nunca del cabo opuesto, tal como se representa en la figura 4.4, lo cual coincide con los resultados obtenidos en ventrículo aislado [6] y la teoría establecida que entre más área sea atravesada por las líneas del campo eléctrico, menor será el voltaje inducido en ella [5].

A partir del aumento abrupto puntual de la  $[Ca^{2+}]_c$  este se propagaba lentamente, comparada con la respuesta anterior, a lo largo del miotubo sugiriendo que se trataba de un proceso de difusión. Este  $Ca^{2+}$  pudiese haber provocado la liberación de más de estos iones al excitar proteínas de otros compartimentos, como la mitocondria [4].

Las señales obtenidas de la región de interés no fueron siempre adecuadas para el análisis debido a que la difusión de  $Ca^{2+}$  proveniente de otra zona del miotubo se traducía en una máscara imposible de filtrar de manera objetiva por lo que estas fueron descartadas implicando una pérdida en la cantidad de células que aportaron información a la estadística. Sin embargo, esto no implica una disminución en la cantidad de células que respondieron a la depolarización y que el número de señales analizadas por campo de visión fue al menos la mitad de las observadas.

Se promediaron las temporalidades de las respuestas al primer y el segundo estímulo las cuales no presentaron diferencia significativa. Esto indica que las células se encuentran en condiciones similares antes de iniciar cada respuesta, lo cual sugiere que los parámetros eléctricos son insuficientes para ocasionar un daño permanente, ya que estos han sido reportados que se presentan a un orden de magnitud mayores a los utilizados en este trabajo [30, 31], información que se corrobora en las pruebas de viabilidad llevadas a cabo (figura 4.3).

Para poder detectar los cambios inducidos por la estimulación los datos fueron analizados de manera pareada. Esto quiere decir que se normalizó la diferencia de la respuesta de cada



célula. En un caso ideal esta diferencia debería ser de 0, pero debido a la misma variabilidad fue alrededor del 10 % para los tiempos y del 20 % para las amplitudes del segundo pico. Sin embargo, ninguna de estas diferencias fueron significativas.

El efecto del ruido se consideró como el cambio en las medias de las diferencias obtenidas del grupo experimental con respecto al grupo control, como se muestra en la figura 4.5. Los resultados indican que al aplicar el ruido añadido a los estímulos la subida del calcio se ralentiza con respecto al grupo control. Para especular sobre este comportamiento cabe recordar las moléculas implicadas en el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$ : los canales de calcio dependientes de voltaje ( $\text{Ca}_v$ ), canales de sodio dependientes de voltaje ( $\text{Na}_v$ ), el intercambiador sodio-calcio (NCX) y los receptores de rianodina (RyR); cuyo comportamiento fue explicado en la sección 1.1.1. La corriente iónica de  $\text{Ca}_v$  y  $\text{Na}_v$  depende directamente del potencial eléctrico, estos tienen diferentes voltajes de activación e inactivación [19]. Una posibilidad del efecto del ruido es que inactive directamente a los  $\text{Ca}_v$ , disminuyendo la cantidad de canales reclutados, lo que pudiese atenuar la respuesta de los RyR. Otra posibilidad es que se inactiven los  $\text{Na}_v$  lo cual puede hacer que el NCX remueva calcio, impidiendo la activación de los RyR, para compensar la falta de sodio .

# Capítulo 6

## Conclusiones

- Para estudiar la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por campo eléctrico en las células H9c2(2-1) es necesario que se hayan diferenciado a miotubos.
- Además, la subida de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  fue ralentizada cuando se añadió ruido a los estímulos.

# Capítulo 7

## Limitaciones y perspectivas

Los miotubos respondieron al primer valor de campo aplicado, el cual se escogió para poder compararlo con el antecedente [13]. Sin embargo, para saber si el ruido en este sistema es benéfico o perjudicial falta realizar un barrido de amplitud y duración de campo eléctrico para encontrar el umbral de activación en esta línea celular y trabajar alrededor de este al añadir el ruido.

En el grupo experimental, el ruido añadido fue del diez por ciento. Sin embargo, para poder comparar con los trabajos anteriores [11, 12, 13] es necesario ampliar el estudio agregando el veinte y treinta por ciento de variabilidad al campo eléctrico aplicado en los miotubos de H9c2(2-1) e inhibir la actividad de los  $Ca_v$  y  $Na_v$  para poder corroborar las suposiciones discutidas.

Por otra parte, el proceso de diferenciación de estas células hace que expresen proteínas, como los  $Ca_v$  de músculo esquelético, lo cual se aleja de lo estudiado previamente en sistemas cardíacos. Por lo que, cabe la posibilidad de aplicar tratamiento con ácido retinoico en el proceso de diferenciación celular para que de esta manera los miotubos obtenidos tengan características más similares a las cardíacas [22, 27].

# Bibliografía

- [1] Guyton A. C. and Hall J. E. *Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Saunders, eleventh edition, 2006.
- [2] Bers D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 415, 2002.
- [3] Dipla K., Mattiello J. A., and Margulies K. B. The sarcoplasmic reticulum and the  $\text{Na}^+$   $\text{Ca}^{2+}$  exchanger both contribute to the  $\text{Ca}^{2+}$  transient of failing human ventricular myocytes. *Circulation Research*, 84:435–444, 1999.
- [4] Bassani R. A., Lima K. A., Gomes P. A. P., Oliveira P. X., and Bassani J. W. M. Combining stimulus direction and waveform for optimization of threshold stimulation of isolated ventricular myocytes. *Physiological Measurement*, 27:851–863, 2006.
- [5] Klee M. and Plonsey R. Stimulation of spheroidal cells - the role of cell shape. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1976.
- [6] Knisley S. B., Blitchington T. F., Hill B. C., Grant A. O., W. M. Smith, T. C. Pilkington, and Ideker R. E. Optical measurements of transmembrane potential changes during electric field stimulation of ventricular cells. *Circulation Research*, 72:255–270, 1993.
- [7] Tsimring L. S. Noise in biology. *Rep Prog Phys*, 77(2), 2014.
- [8] Longtin A. Stochastic resonance in neuron models. *Journal of Statistical Physics*, 70:309–327, 1993.
- [9] Hänggi P. Stochastic Resonance in Biology: How Noise Can Enhance Detection of Weak Signals and Help Improve Biological Information Processing. *CHEMPHYSICHEM*, 3:285–290, 2002.

- [10] Douglass J. K., Wilkens L., Pantazelou E., and Moss F. Noise enhancement of information transfer in crayfish mechanoreceptors by stochastic resonance. *Nature*, 365, 1993.
- [11] Peña-Romo A. L. Estudio del efecto del ruido extrínseco en la respuesta mecánica del corazón, 2018.
- [12] Diaz-Galindo C. Estudio del efecto de la variabilidad en el acoplamiento eléctrico-iónico del calcio en células del nodo sinoauricular., 2016.
- [13] Ramirez-Hurtado A. L. Efecto del campo eléctrico variable en la dinámica del calcio intracelular en células excitables, 2018.
- [14] Kimes B. W. and Brandt B. L. Properties of a clonal muscle from rat heart. *Experimental Cell Research*, 98:367–381, 1976.
- [15] Sipido K. R. and Marban E. L-Type Calcium Channels , Potassium Channels , and Novel Nonspecific Cation Channels in a Clonal Muscle Cell Line Derived From Embryonic Rat Ventricle. *Circulation Research*, 69:1487–1499, 1991.
- [16] Pagano M., Naviglio S., Spina A., Chiosi E., Castoria G., Romano M., Sorrentino A., Illiano F., and Illiano G. Differentiation of h9c2 cardiomyoblasts : The role of adenylate cyclase system. *Journal of Cellular Physiology*, 198:408–416, 2004.
- [17] Takahashi K., Hayashi S., Miyajima M., J.-Wang K. Kaihara M., Omori, Morimatsu M., Wang C., Chen J., Iribe G., Naruse K., and Sokabe M. L-type calcium channel modulates mechanosensitivity of the cardiomyocyte cell line h9c2. *Cell Calcium*, 79:68–74, 2019.
- [18] Hescheler J., Meyer R., Plant S., Krautwurst D., Rosenthal W., and Schultz G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circulation Research*, 69(6):1476–1486, 1991.
- [19] McDonald T. F., Cavalié A., Trautwein W., and Pelzer D. Voltage-dependent properties of macroscopic and elementary calcium channel currents in guinea pig ventricular myocytes. *Pfugers Arch*, 406:437–448, 1986.

- [20] Tsuchida K., Watajima H., and Otomo S. Calcium current in rat diabetic ventricular myocytes. *American Physiological Society*, 1994.
- [21] Mejia-Alvarez R., Tomaselli G. F., and Marban E. Simultaneous expression of cardiac and skeletal muscle isoforms of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel in a rat heart muscle cell line. *Journal of Physiology*, 478(2):315–329, 1994.
- [22] Menard C., Pupier S., Mornet D., Kitzmann M., Nargeot J., and Lory P. Modulation of L-type calcium channel expression during retinoic acid- induced differentiation of H9C2 cardiac cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274:29063–29070, 1999.
- [23] Szalai G., Csordás G., Hantash B. M., Thomas A. P., and Hajnóczky G. Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *The journal of biological chemistry*, 275:15305–15313, 2000.
- [24] Haugland R. P. *Handbok of fluorescent Probes and Research*. 2002.
- [25] Berridge M. J., Bootman M. D., and Roderick H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4:517–529, 2003.
- [26] Pogwizd S. M., Schlotthauer K., Li L., Yuan W., and Bers D. M. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure. *Circulation Research*, 88, 2001.
- [27] Branco A. F., Pereira S. P., Gonzalez S., Gusev O., Rizvanov A. A., and Oliveira P. J. Gene expression profiling of h9c2 myoblast differentiation towards a cardiac-like phenotype. *PLOS ONE*, 2015.
- [28] Ihara Y., Kageyama K., and Kondo T. Overexpression of calreticulin sensitizes serca2a to oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329:1343–1349, 2005.
- [29] Namekata I., Hamaguchi S., and Tanaka H. Pharmacological discrimination of plasmalemmal and mitochondrial sodium-calcium exchanger in cardiomyocyte-derived H9c2 cells. *Biological pharmaceutical bulletin*, 38(1):147–50, 2015.

- [30] Jones J. L., Jones R. E., and Balasky G. Microlesion formation in myocardial cells by high-intensity electric field stimulation. *The American Physiological Society*, 1987.
- [31] Kamiska I., Kotulska M., Stecka A., Saczko J., Drag-Zalesinska M., Wysocka T., Chomanska A., Skolucka N., Nowicki R., Marczak J., and Kulbacka J. Electroporation-induced changes in normal immature rat myoblasts (h9c2). *Gen. Physiol. Biophys.*, 31:19–25, 2012.