



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

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL RUIDO EN LA
RESPUESTA CONTRÁCTIL EN CARDIOMIOCITOS**

Tesis que presenta

Humberto Montesinos Larrinaga

Para obtener el grado de

Maestro en ciencias

Con especialidad en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de la Tesis:

Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González

Monterrey, Nuevo León

Octubre, 2020

AGRADECIMIENTOS:

Dirigido a todos mis familiares y amigos, los cuales hicieron más amena la estancia desde las practicas hasta los últimos momentos en el Cinvestav, a mi generación por el apoyo emocional y académico, así como los muy buenos momentos y experiencias que vivimos juntos como una familia. Así como al buen Alberto, Carlos y Wendolyn por el apoyo incondicional.

A mi asesor, el Dr. Jesús Rodríguez por depositar su confianza en mí desde antes del inicio de la maestría, por tener la paciencia de instruirme en un mundo nuevo para mí, por los buenos consejos y los ratos de calidad dentro del grupo de investigación, siendo siempre una excelente persona.

Dr. Bruno Escalante, al Dr. Moisés Santillán por su ayuda en el entendimiento de muchos conceptos biológicos, por su amabilidad y particularmente por su preciada retroalimentación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por patrocinar este proyecto y por fomentar el desarrollo de la ciencia en México. Al resto de la comunidad del Cinvestav Monterrey por abrirme cálidamente sus puertas y permitirme desenvolverme con facilidad en un ambiente académico y multicultural.

CONTENIDO

RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Marco teórico.....	9
1.1.1 El Corazón	9
1.1.2 Músculo cardiaco.....	10
1.1.3 Cardiomiocitos	11
1.1.4 potencial de acción de ventricular	11
1.1.5 Acoplamiento Excitación-Constracción (EC).	13
1.1.6 Interacción de los filamentos de actina y miosina.	14
1.1.7 Ciclo de contracción.....	15
1.1.8 Ruido en sistemas biológicos.	17
1.2 Antecedentes	17
1.2.1 Patrones de respuestas neuronales debidos al ruido.....	17
1.2.2 Respuesta de miofibrillas del músculo FCD.....	19
1.2.3 Ruido en el modelo de corazón aislado.....	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
3.1 Hipótesis	24
3.2 Objetivos.....	24
4. METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	25
4.1 Extracción del corazón.....	25
4.1.1 Preparación del ratón.....	25

4.1.2	Incisión en Planos y Extracción del corazón.....	25
4.1.3	Perfusión retrograda.....	26
4.1.4	Técnica de Langendorff para corazón aislado.....	27
4.2	Obtención de los cardiomiocitos.	28
4.2.1	Perfusión y disgregación del corazón	28
4.2.2	Reintroducción de calcio.....	29
4.3	Estimulación eléctrica.....	30
4.3.1	Rango de estímulo.	30
4.3.2	Estimulación eléctrica sin ruido blanco inducido	31
4.3.3	Estimulación eléctrica con ruido blanco inducido	33
4.4	Obtención de los registros contráctiles.	35
4.5	Parámetros analizados.....	37
4.5.1	Porcentaje de acortamiento, velocidad máxima de contracción y relajación.	37
4.5.2	Tiempo de contracción y de relajación	39
4.5.3	Áreas del evento de contracción y relajación.....	40
5.	RESULTADOS	40
5.1	Validación del montaje experimental: experimentos control.....	41
5.2	Comportamiento de las respuestas contráctiles de los cardiomiocitos ante estímulos con ruido.	44
5.3	Correlación de la velocidad máxima de relajación en contra del porcentaje de acortamiento.	49
6.	DISCUSIÓN	51
7.	CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	54
8.	REFERENCIAS.....	55
9.	APENDICE.....	58

Lista de Figuras.

Figura	Descripción	Página
1.1	Estructura del corazón y trayecto del flujo sanguíneo.	9
1.2	Naturaleza interconectada “sincitial” de las fibras del músculo cardíaco.	10
1.3	Potencial de acción cardíaco.	12
1.4	Transporte de Ca^{2+} en miocitos ventriculares.	14
1.5	Mecanismo de deslizamiento de los filamentos de la contracción muscular.	15
1.6	Ciclo de contracción.	16
1.7	Patrones de sincronización en la actividad neuronal debidos al ruido.	18
1.8	Transitorios de calcio provocados por EMGstim y estímulos estándar.	20
1.9	Efecto del ruido en el nodo SA sobre la frecuencia cardíaca en el modelo de corazón aislado.	21
2.1	Ventana temporal de las oscilaciones de Ca^{2+} en células de asilada de corazón en embrión de pollo.	22
4.1	Perfusión retrograda.	26
4.2	Técnica langendorff para corazón aislado para aislamiento celular.	27
4.3	Corte de corazón para la obtención de los cardiomiocitos.	29
4.4	Efecto de la frecuencia sobre el acortamiento en miocitos de ratón.	31
4.5	Cámara de estimulación.	32
4.6	Estimulación eléctrica externa.	33
4.7	Estímulo eléctrico con ruido inducido.	34

4.8	Registros de la señal eléctrica que estimula a los cardiomiocitos aislado a 20V y 0.2Hz.	35
4.9	Procesamiento de video en tiempo real para el reconocimiento de borde del cardiomiocito.	36
4.10	Registro contráctil de célula ventricular.	36
4.11	Registro de una sola contracción de un cardiomiocito aislado.	38
4.12	Derivada de un registro de contracción.	38
4.13	Registro de una sola contracción de un cardiomiocito aislado, tiempo.	39
4.14	Registro de una sola contracción de un cardiomiocito aislado, área.	40
5.1	Registros temporales de la repuesta contráctil de los cardiomiocitos sin ruido en el estímulo.	41
5.2	Gráfico de la respuesta del porcentaje de acortamiento a diferentes intensidades de frecuencias de estímulos eléctricos sin variabilidad.	42
5.3	Velocidad máxima de contracción.	43
5.4	Efecto del ruido en la respuesta contráctil representado en el porcentaje de acortamiento.	45
5.5	Efecto del ruido en las velocidades máximas de contracción y relajación.	47
5.6	Efecto del ruido en el porcentaje de acortamiento, velocidades máximas de contracción y relajación con frecuencia de estimulación de 5 Hz.	48
5.7	Correlación de la velocidad máxima de relajación en contra del porcentaje de acortamiento.	50
9.1	Tiempo de contracción.	58
9.2	Tiempo de relajación.	58
9.3	Áreas bajo la curva de la contracción celular.	59
9.4	Áreas bajo la curva de la relajación celular.	59
9.5	Regresión lineal por cada frecuencia.	60 - 61

RESUMEN

Para que el corazón desempeñe sus funciones biológicas, se llevan a cabo dos fenómenos de distinta naturaleza. Uno es de tipo eléctrico en el cual la membrana plasmática de las células marcapaso se despolariza transmitiendo el impulso eléctrico. Como consecuencia de un estímulo eléctrico se tiene una respuesta mecánica en el cual el corazón se contrae eyectando sangre hacia los tejidos y posteriormente se relaja. En condiciones normales existe una sincronización entre estos dos fenómenos, es decir, a un estímulo eléctrico corresponde un evento mecánico, la cual se repite en promedio sesenta veces por minuto. Sin embargo, esta sincronización se pierde cuando este proceso se acelera, donde la respuesta mecánica empieza a ralentizarse conforme aumenta la frecuencia de estimulación y comienzan a presentarse patologías, como lo es el caso de la fibrilación. Por otro lado, se sabe que las células involucradas en la contracción del corazón son llamadas cardiomiocitos, las cuales son las principales efectoras de la fuerza contráctil del corazón cuando todas trabajan en conjunto iniciadas por un estímulo eléctrico proveniente del nodo sino auricular, además es bien sabido que en diferentes patologías esta fuerza de contracción es alterada llevando al corazón a un mal funcionamiento, por lo cual, se desea estudiar la respuesta contráctil a distintos estímulos con ruido ya que se ha visto que ciertos niveles de variabilidad extrínseca en células excitables mejoran la respuesta. No obstante, para llevarse a cabo un estudio sobre la variabilidad en las células ventriculares del corazón, es necesario aislar al corazón para extraer dichas células. Para este estudio se utilizarán corazones de ratón, los cuales son perfundidos retrógradamente en un sistema de Langendorff para la obtención de cardiomiocitos. Para la estimulación eléctrica, se utilizarán trenes de pulsos creados a partir de un generador de funciones, transmitido mediante dos electrodos de platino, donde es posible controlar la amplitud (20 V) y la frecuencia (0.2-5Hz), así como la intensidad de ruido blanco aditivo a la señal, como factor de variabilidad. Los resultados muestran que un nivel del 10% de variabilidad inducido en el estímulo eléctrico repercute en la respuesta contráctil de cardiomiocitos, incrementando las velocidades máximas de contracción y de relajación, así como un leve aumento en el porcentaje de acortamiento. Con los resultados obtenidos nos permite especular de una cinética alterada de los puentes cruzados, teniendo foco principal el aumento de la dinámica del hidrolisis del ATP.

ABSTRACT

For the heart to accomplish its biological functions, two phenomena of different nature take place. One is electrical, in which the plasma membrane of the pacemaker cells is depolarized by transmitting an electrical impulse. As a consequence of the electrical stimulus, there is a mechanical response, in which the heart contracts, ejecting blood into the tissues, and subsequently, relaxes. Under normal conditions, there is a synchronization between these two phenomena, so, an electrical stimulus corresponds to a mechanical event, repeated approximately sixty times per minute. However, this synchronization is lost when the process is accelerated, and the mechanical response begins to slow down as the stimulation frequency increases, thus pathologies, such as fibrillation, begin to appear. On the other hand, it is known that the cells involved in the contraction of the heart, called cardiomyocytes, are the main effectors of the contractile force of the heart by working together due to an electrical stimulus from the sinoatrial node, but in different pathologies this contraction force is altered, leading the heart to malfunction. Therefore, it is necessary to study the contractile response to different stimuli with noise, since it has been seen that certain levels of extrinsic variability in excitable cells could improve the contractile response. To carry out a study on the variability in the ventricular cells of the heart, it is necessary to isolate the heart to extract these cells. For this study, mice hearts will be used, which are retrograde perfused in a Langendorff system to obtain cardiomyocytes. For electrical stimulation, pulse trains created from a function generator will be used, transmitted by two platinum electrodes, where it is possible to control amplitude (20 V) and frequency (0.2-5Hz), as well as the intensity of additive white noise to the signal, as a variability factor. The results show that a 10% level of induced variability, affects the contractile response of cardiomyocytes, increasing the maximum contraction and relaxation speed, as well as a slight increase in the shortening percentage. The results obtained allow us to speculate that there is an altered kinetics of the cross bridges, whose main focus is the ATP hydrolysis dynamics increase.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Marco teórico

1.1.1 El Corazón

El corazón es uno de los principales órganos y más importantes del cuerpo humano, está formado por cuatro espacios volumétricos, dos aurículas y dos ventrículos que en sincronía bombea sangre hacia los pulmones, así como, el bombeo de sangre través de la circulación sistémica que aporta flujo sanguíneo a los demás órganos y tejidos de cuerpo como se muestra en la Figura 1.1. Estas cámaras están constituidas en su mayoría por tejido muscular (miocardio) el cual consta de células alargadas unidas en puntos específicos conocidos como sincitios de tal manera, que cuando el corazón se contrae lo hace como si fuera una unidad. El potencial de acción de musculo cardiaco es similar al musculo esquelético, con la peculiaridad de que la duración de la contracción que es mucho mayor [1].

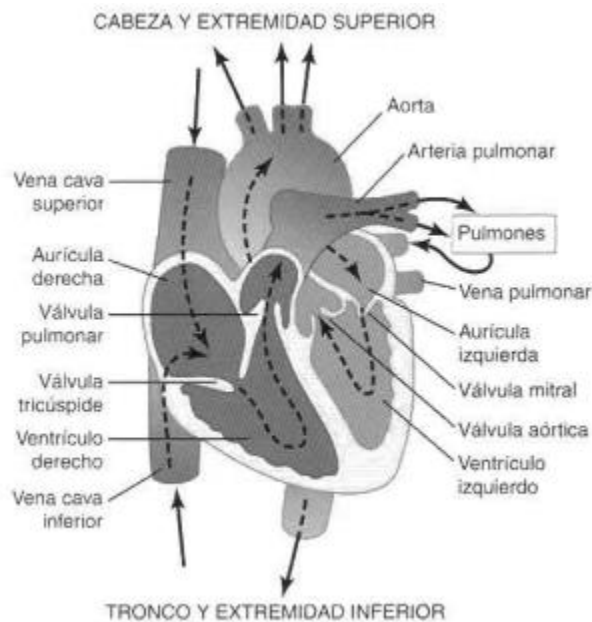


Figura 1.1 Estructura del corazón y trayecto del flujo sanguíneo a través de las cavidades y válvulas cardiacas [1].

1.1.2 Músculo cardíaco

El corazón está formado por tres tipos principales de músculo cardíaco: músculo auricular, músculo ventricular y fibras musculares especializadas de excitación y de conducción. Los músculos auricular y ventricular se contraen de manera muy similar al músculo esquelético, excepto que la duración de la contracción es mucho mayor. Por el contrario, las fibras especializadas de excitación y de conducción se contraen sólo débilmente porque contienen pocas fibras contráctiles; en cambio, presentan descargas eléctricas rítmicas automáticas en forma de potenciales de acción que se propagan por todo el corazón, formando así un sistema excitador que controla el latido rítmico cardíaco [1].

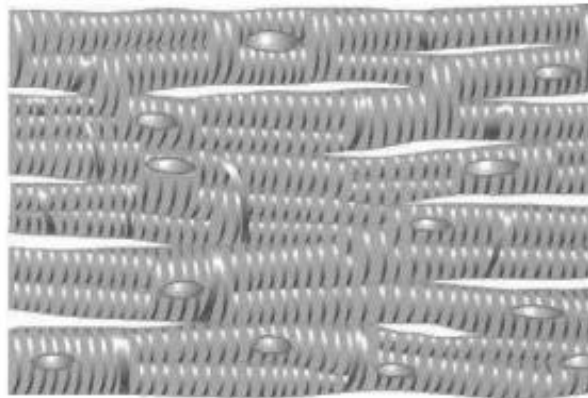


Figura 1.2 Naturaleza interconectada “sincitial” de las fibras del músculo cardíaco [1].

El músculo cardíaco del corazón es notablemente estriado y tiene las miofibrillas típicas que contienen filamentos de actina y miosina delimitadas por las bandas z, igual que el músculo esquelético. Sin embargo, las zonas oscuras que atraviesan las fibras musculares cardíacas (denominadas discos intercalados) realmente son membranas celulares que separan las células musculares cardíacas individuales (cardiomiocitos) entre sí; es decir, las fibras musculares cardíacas están formadas por muchas células individuales interconectadas en serie y en paralelo. En cada uno de los discos intercalados, las membranas celulares se fusionan de tal manera que forman uniones en hendidura (GAP), proporcionando continuidad

iónica entre las células musculares cardiacas contiguas y así dejan que las macromoléculas de información pasen de una célula a la otra [4]. Por tanto, el músculo cardiaco es un sincitio de muchas células musculares cardiacas interconectadas entre sí, que cuando una de ellas se excita, el potencial de acción se propaga rápidamente a todas.

1.1.3 Cardiomiocitos

Los cardiomiocitos son células excitables especializadas de los músculos ventriculares, encargadas de la contracción y relajación del corazón. Tienen los mismos tipos y la misma organización de los filamentos contráctiles que el musculo esquelético [4]. Muestran en promedio dimensiones de 15 μm de diámetro y unos 100 μm de largo. Morfológicamente los cardiomiocitos no forman un sincitio; pero sí existe un "sincitio funcional", gracias a la existencia de los discos intercalados. Las uniones entre los cardiomiocitos son uniones proteicas que tienen una baja impedancia, por lo que facilitan la conducción eléctrica entre células, generando una contracción sincrónica.

1.1.4 potencial de acción de ventricular

El potencial de reposo de los cardiomiocitos se encuentra alrededor de los -90 mV, Debido a la corriente rectificadora de K^+ , en este valor del potencial de membrana, los canales de Na^+ y Ca^{2+} se encuentran cerrados. Estas células no poseen automatismo (células excitables), por lo que necesitan de un estímulo lo suficientemente grande para alcanzar el umbral, provocando la despolarización de la célula y como consecuencia se genere un potencial de acción [1,2]. Esquemáticamente, en la descripción del potencial de acción cardiaco se distinguen cinco fases: despolarización rápida, repolarización parcial lenta, meseta, repolarización rápida e hiperpolarización, como se muestra en la Figura 1.3.

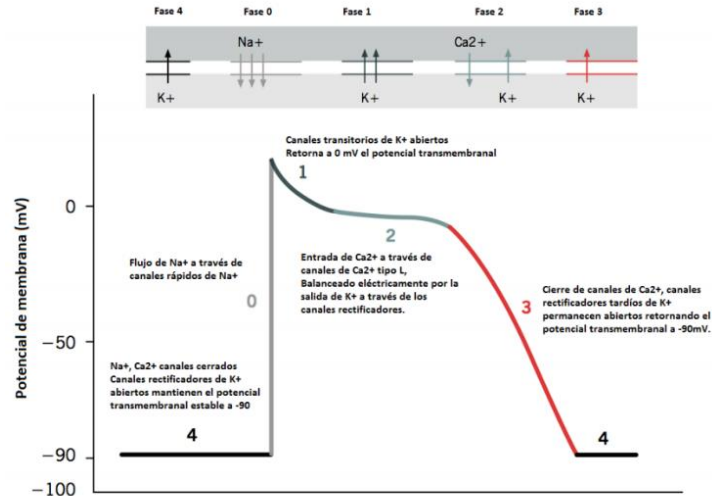


Figura 1.3 Potencial de acción característico de las células ventriculares modificado [3].

1. Despolarización Rápida (Fase 0). Sucede cuando la célula cardiaca es estimulada y se despolariza, el potencial de membrana se hace mas positivo. Los canales de sodio son activados por el voltaje (canales de sodio rápidos), permitiendo libre paso de sodio hacia el interior de la célula. El potencial de membrana alcanza +20 mV aproximadamente antes de que los canales de sodio se cierren.
2. Repolarización parcial lenta (Fase 1). En esta fase, ocurre el cierre de los canales de Na⁺ con una activación transitoria de una corriente de potasio (K⁺), también conocida como corriente de salida transitoria.
3. Meseta (Fase 2). Está es la denominada fase de meseta, determinada por el equilibrio relativamente prolongado entre las conductancias de Ca²⁺ que tienden a despolarizar la membrana (incremento de calcio intracelular), y las conductancias de K⁺ al medio extracelular que tienden a repolarizarla.
4. Repolarización rápida (Fase 3). Se lleva a cabo cuando, por la gradual inactivación de las corrientes de Ca²⁺ y contrapuesta por el aumento progresivo de las corrientes de K⁺ repolarizando a la célula a su estado en reposo.

5. Hiperpolarización (Fase 4). Finalmente, los canales de salida de K^+ completan la fase de repolarización final, devolviendo a la célula a un potencial de membrana de reposo con valor medio aproximado de -90 mV.

1.1.5 Acoplamiento Excitación-Constracción (EC).

El acoplamiento de excitación-contracción cardíaca es el proceso desde la excitación eléctrica de los cardiomiocitos, seguida de la contracción del corazón que impulsa la salida de sangre de los ventrículos hacia la periferia del cuerpo y a los pulmones para la oxigenación de la sangre. Este proceso está ligado íntimamente con el ion de Ca^{2+} , el cual es fundamental para que se lleve a cabo la contracción mediante la interacción con los filamentos de actina y miosina del músculo cardíaco y esquelético, sin embargo, la activación de las proteínas contráctiles cardíacas se obtiene por mecanismos que difieren de los del músculo esquelético, como se menciona a continuación.

A medida que el potencial de acción se propaga a lo largo del sarcolema, hace que se abran los canales L de Ca^{2+} dependientes de voltaje, provocando una entrada gradual de Ca^{2+} al interior de la célula. La entrada de Ca^{2+} desencadena la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (SR) al activarse los receptores de rianodina (RyR-2). La combinación de influjo y liberación de Ca^{2+} aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular libre ($[Ca^{2+}]_i$), permitiendo que Ca^{2+} se una a la troponina C de la proteína del miofilamento, que luego enciende la máquina contráctil, generando la contracción del músculo cardíaco, como se muestra en la Figura 1.4. [5]

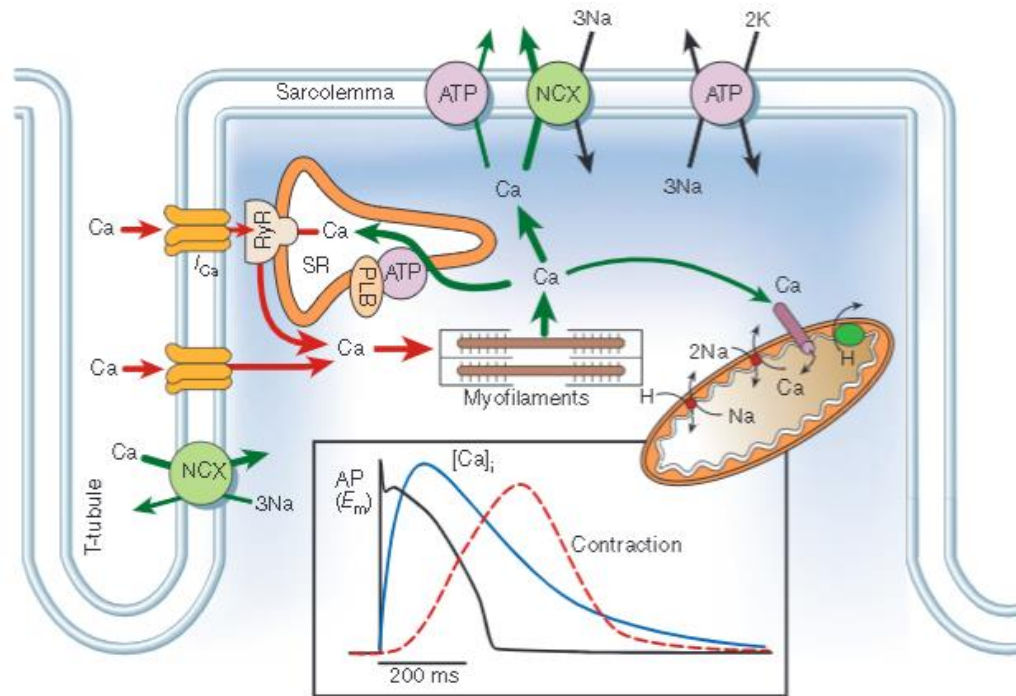


Figura 1.4 Transporte de Ca^{2+} en miocitos ventriculares. En el recuadro se muestra el curso temporal del potencial de acción, el transitorio de Ca^{2+} y la contracción medidos en un miocito ventricular de conejo a $37^{\circ}C$. NCX, intercambio Na^{+} / Ca^{2+} ; ATP, ATPasa; PLB, fosfolamban; SR, retículo sarcoplásmico.[cita]

Para que ocurra la relajación, el Ca^{2+} intracelular debe disminuir, permitiendo que Ca^{2+} se disocie de la troponina. Esto requiere un transporte Ca^{2+} fuera del citosol por cuatro vías que involucran SR Ca^{2+} -ATPasa, intercambio sarcolema de Na^{+} / Ca^{2+} , sarcolema Ca^{2+} -ATPasa o unipuerto mitocondrial de Ca^{2+} . Una vez que los iones Ca^{2+} se disocian del complejo tropomiosina debido a la disminución gradual de Ca^{2+} , la interacción de la actina y la miosina finaliza generando la relajación [5].

1.1.6 Interacción de los filamentos de actina y miosina.

Dentro de estas células ventriculares (cardiomiocitos) se encuentran las unidades principales encargadas de la contracción, llamados sarcómeros, están delimitadas por los discos Z, y conformado principalmente por filamentos de actina (filamentos delgados) y miosina

(filamentos gruesos). La contracción muscular se produce porque las cabezas de miosina se unen y caminan a lo largo de los filamentos finos en ambos extremos del sarcómero, lo que se traduce a una contracción [6], Como se muestra en la Figura 1.5.

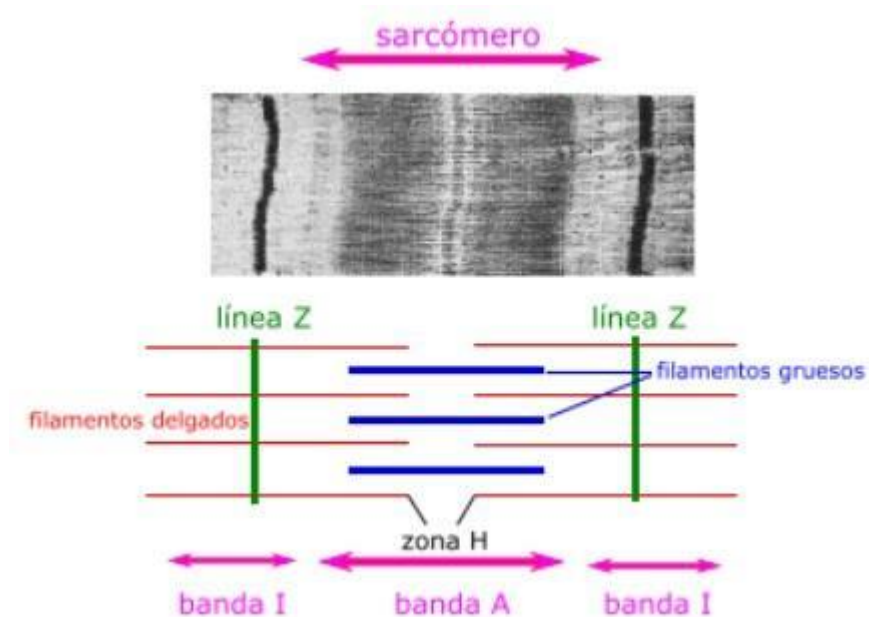


Figura 1.5 Mecanismo de deslizamiento de los filamentos de la contracción muscular. Filamentos de actina también llamados filamentos delgados y filamentos de miosina como filamentos gruesos.

1.1.7 Ciclo de contracción

Al comienzo de la contracción, el retículo sarcoplásmico libera iones de calcio hacia el sarcoplasma. Ahí, se unen a la troponina. Entonces, la troponina desplaza a la tropomiosina de los sitios de unión a miosina de la actina. Una vez que los sitios de Unión están libres, comienza el ciclo de la contracción, que es la secuencia de eventos repetitivos del desplazamiento de los filamentos, este ciclo de contracción consiste en 4 pasos [6].

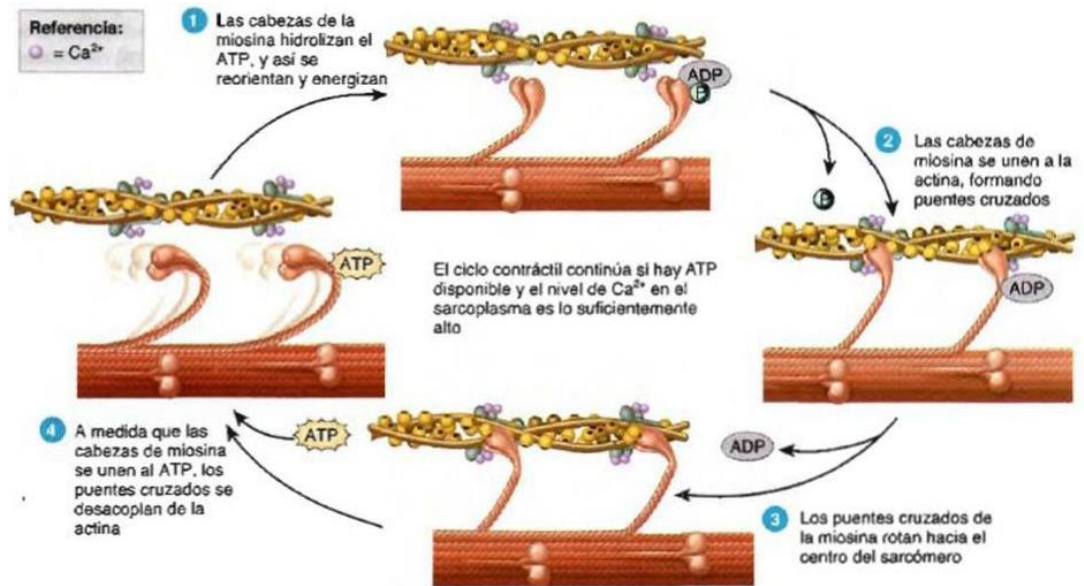


Figura 1.6 Ciclo de contracción. Los sarcómeros ejercen fuerza y se acortan a través de ciclos repetidos, durante los cuales las cabezas de miosina se unen a la actina (puentes cruzados), rotan y se desacoplan [6].

1. Hidrolisis del ATP. La cabeza de miosina incluye un sitio de Unión a ATP y una encima ATPasa que hidroliza el ATP a ADP (adenosín trifosfato) y un grupo fosfato. Esta reacción de hidrolisis reorienta y carga de energía la cabeza de miosina. Observe que los productos de la hidrolisis del ATP –ADP y un grupo fosfato– siguen unidos a la cabeza de miosina.
2. Unión de la miosina a la actina para formar puentes cruzados. La cabeza de miosina, cargada de energía, se adhiere al sitio de Unión a miosina de la actina y libera el grupo fosfato previamente hidrolizado. Cuando la miosina se une a la actina durante la contracción, estas uniones se dominan puentes cruzados.
3. Fase de deslizamiento. Después de la formación de los puentes cruzados, se produce la fase de deslizamiento. Durante esta, se abre el sitio del puente cruzado al que todavía está unido el ADP. En consecuencia, el puente cruzado rota y libera el ADP. dicho puente genera fuerza cuando rota hacia el centro del sarcómero, lo que desliza el filamento fino sobre el filamento grueso hacia la línea M.
4. Separación de la miosina y la actina. Al final de la fase de deslizamiento, el puente cruzado permanece firmemente adherido a la actina hasta que se une a otra molécula

de ATP. La Unión del ATP a su sitio de Unión en la cabeza de miosina hace que esta se separe de la actina.

1.1.8 Ruido en sistemas biológicos.

Es bien sabido que todas las respuestas de los procesos biológicos no suelen ser iguales uno tras otro cuando hablamos del mismo fenómeno, por ejemplo, los potenciales de acción ya que depende de los cambios de la permeabilidad de membrana por la actividad de canales, o proteínas embebidas en la membrana de bicapa lipídica que facilitan el movimiento pasivo de iones específicos en favor de sus gradientes electroquímicos [7]. Por otro lado, observaciones sugieren que los eventos moleculares subyacentes a la fisiología celular están sujetos a fluctuaciones y han llevado a la propuesta de un modelo estocástico para la expresión génica y bioquímica en general [8]. Es esencialmente esta variabilidad relativamente alta que existe en las interacciones bioquímicas las que definen al ruido en un sistema biológico.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Patrones de respuestas neuronales debidos al ruido.

En el último año del siglo XX, un grupo de investigadores demostraron los efectos del ruido sobre la actividad de células excitables, concluyendo que la presencia de ruido extrínseco en la actividad neuronal puede desencadenar patrones de sincronización entre una estimulación periódica y la cantidad de disparos obtenidos [9]. Para lograr lo cometido, realizaron un ajuste al modelo matemático por FitzHugh-Nagumo en 1961[10] sobre la actividad eléctrica neuronal, añadiendo un término aditivo de ruido en distintas intensidades. En este modelo matemático, se estimuló a una neurona (correspondiente a una célula excitable) con una señal eléctrica senoidal y se obtuvo un disparo como respuesta por cada ciclo de estímulo. Ahora, añadiendo ruido aditivo(extrínseco) al estímulo (parámetro denominado como densidad de

ruido, D) se obtuvieron más disparos por cada ciclo (Figura 1.7). Sin embargo, incrementando la cantidad de ruido aditivo al estímulo, no es posible determinar una sincronización clara con la respuesta neuronal; y se dice que el sistema está gobernado por el ruido.

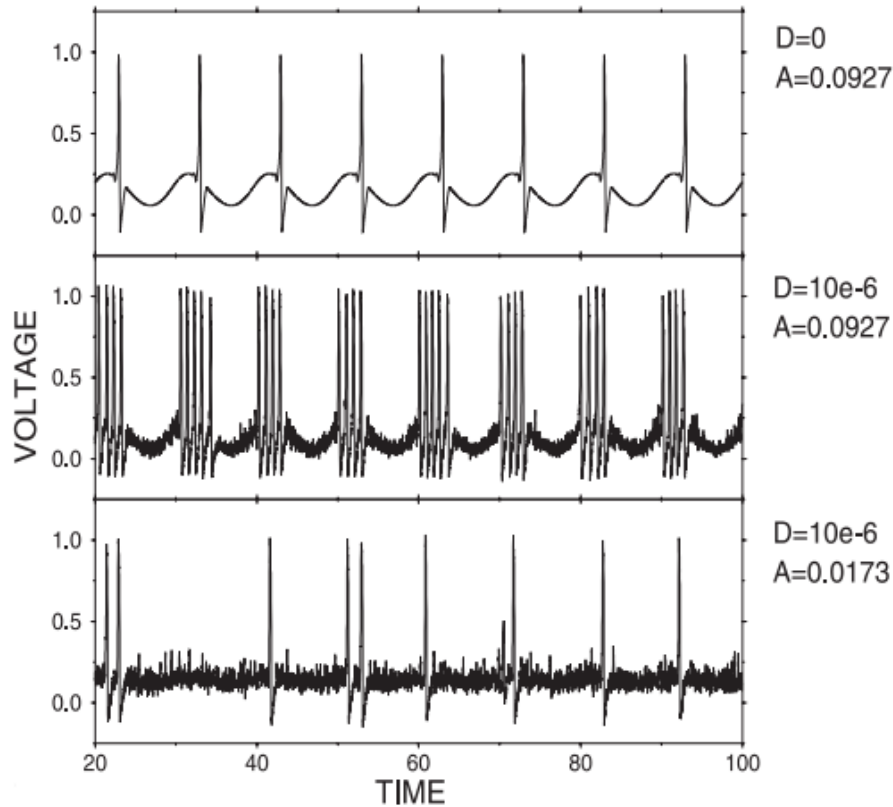


Figura 1.7 Patrones de sincronización en la actividad neuronal debidos al ruido [9]. La neurona es estimulada por una señal senoidal con una amplitud A y $D = 0$. Como respuesta, se tiene un disparo por cada ciclo (panel superior). Ahora, Añadiendo ruido aditivo al estímulo (parámetro D), $D > 0$, se obtienen más disparos por ciclo (panel central). Sin embargo, disminuyendo la amplitud de la señal senoidal y dejando fijo el parámetro de ruido, el sistema está gobernado por el ruido y no es posible determinar un patrón de sincronización clara (panel inferior).

1.2.2 Respuesta de miofibrillas del músculo FCD

Una reciente publicación de un grupo de investigadores italianos, realizó una exploración sobre un protocolo de estimulación "ruidoso" derivado de registros electromiográficos humanos (estimulación EMG) para promover la regeneración muscular. Dentro de los experimentos se estudiaron las respuestas de las miofibrillas del musculo FCD (flexor corto de los dedos) ante estímulos ruidosos, denominados EMGstim (Figura 1.8 A) y estímulos estándar (Figura 1.8 B), ambos con una frecuencia de 1 Hz. Curiosamente encontraron que, el EMGstim provocó transitorios de Ca^{2+} con un área significativamente mayor y una mayor amplitud que el protocolo de estimulación estándar (sin ruido) como se muestra en la Figura 1.8 C. Concluyendo, que La variabilidad intrínseca que caracteriza al ES "ruidoso" podría facilitar una despolarización de membrana acumulativa, responsable de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico durante el acoplamiento de excitación-contracción, lo que resulta en transitorios de Ca^{2+} con picos y área más grandes [11].

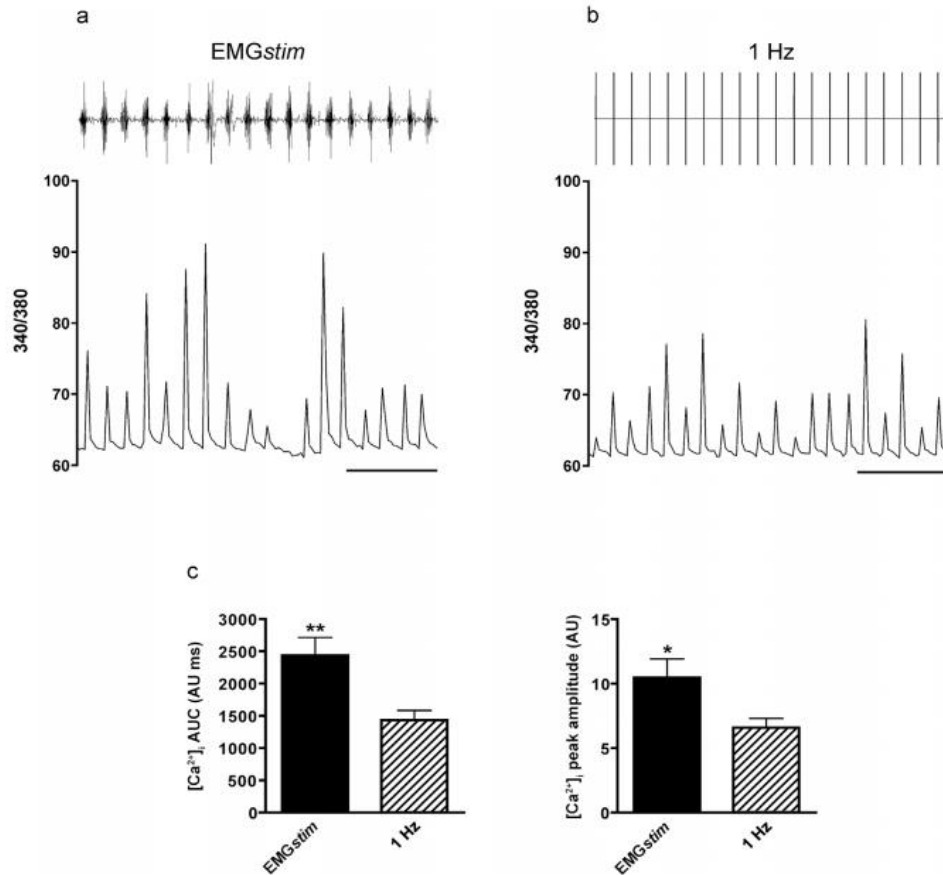


Figura 1.8 Transitorios de calcio provocados por EMGstim y estímulos estándar, ambos a 1 Hz. En la parte superior de cada figura, se muestra el protocolo de estimulación. Los valores de la relación de fluorescencia 340/380 están en unidades arbitrarias. Barras de escala, 5 s. Las áreas medias debajo de la curva (AUC) y las amplitudes medias de pico de Ca²⁺ + inducidas por EMGstim y 1 Hz estimulación estándar, están representadas (n = 8 miofibras). * p < 0.05, ** p < 0.01 [11].

1.2.3 Ruido en el modelo de corazón aislado

Últimamente en nuestro laboratorio, se evidenció que la presencia de ruido blanco aditivo a la estimulación eléctrica en el nodo SA, favorece la respuesta contráctil en el modelo de corazón aislado [12]. Para ello, se utilizaron corazones de ratón, los cuales fueron perfundidos retrógradamente desde la aorta con ayuda del sistema langendroff. Seguido de esto, los corazones fueron estimulados eléctricamente en el nodo SA con trenes de pulsos periódicos agregando cierta cantidad de ruido blanco, para después obtener los registros temporales de las respuestas contráctiles. Los resultados expusieron que, la presencia de bajas

intensidades de ruido (10 %), provocan que el patrón de sincronización 1:1 se presente en un ancho de banda de frecuencias de electroestimulación más amplio, en contraste, con el grupo control (sin ruido). Como resultado, se obtuvo evidencia experimental de la presencia de resonancia estocástica en el modelo de órgano de corazón aislado [12]. Como se muestra en el gráfico inferior (Figura 1.9), dando como la máxima eficacia de la respuesta, ante el 10% de variabilidad.

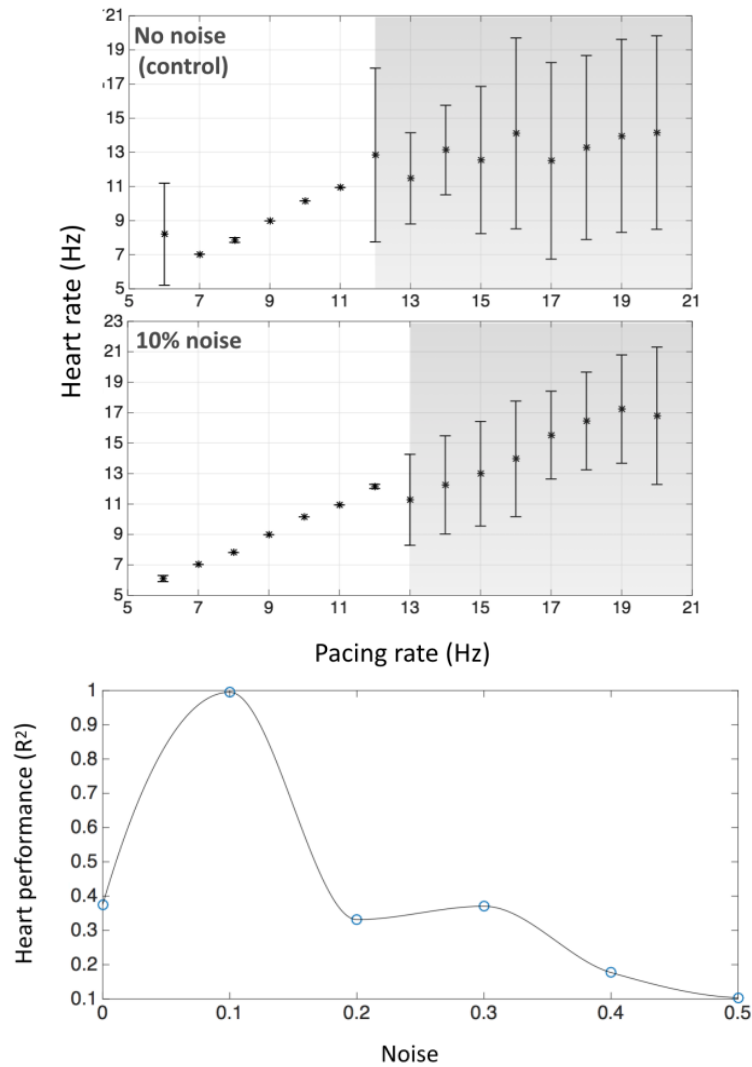


Figura 1.9 Efecto del ruido en el nodo SA sobre la frecuencia cardiaca en el modelo de corazón aislado [12]. La presencia de bajas intensidades de ruido (10%) en la electroestimulación (imagen central) aumenta el ancho de banda de frecuencias de estimulación donde se presenta la sincronización 1:1 con respecto a la frecuencia de respuesta cardiaca, contrastado con experimentos control (imagen superior), demostrando la presencia de resonancia estocástica en el modelo de corazón aislado (imagen inferior).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace tiempo se han realizado diversos estudios teóricos para determinar el comportamiento de los sistemas excitables ante estímulos [10], así como estímulos con ruido [9], como se habló anteriormente en el apartado de los antecedentes. Si embargo, estos modelos matemáticos que describen dichos sistemas suelen estar compuestos con ciertas suposiciones, desarrollando el sistema en un ambiente ideal, lo cierto es que los procesos fisiológicos no lo son, pero la incorporación del comportamiento inexacto proporciona un resultado más apegado a la realidad.

Haciendo todo esto evidente, la variabilidad se encuentra presente en los potenciales de acción, en la regulación de hormonas, así como la regulación de calcio en las células. En la Figura 2.1, se muestra el registro temporal de las oscilaciones de Ca^{2+} citoplasmático de células aislada de corazón de embrión [13], en la cual se puede observar que, pese a que los pulsos mantienen cierta amplitud y periodicidad, éstos no son perfectamente simétricos.

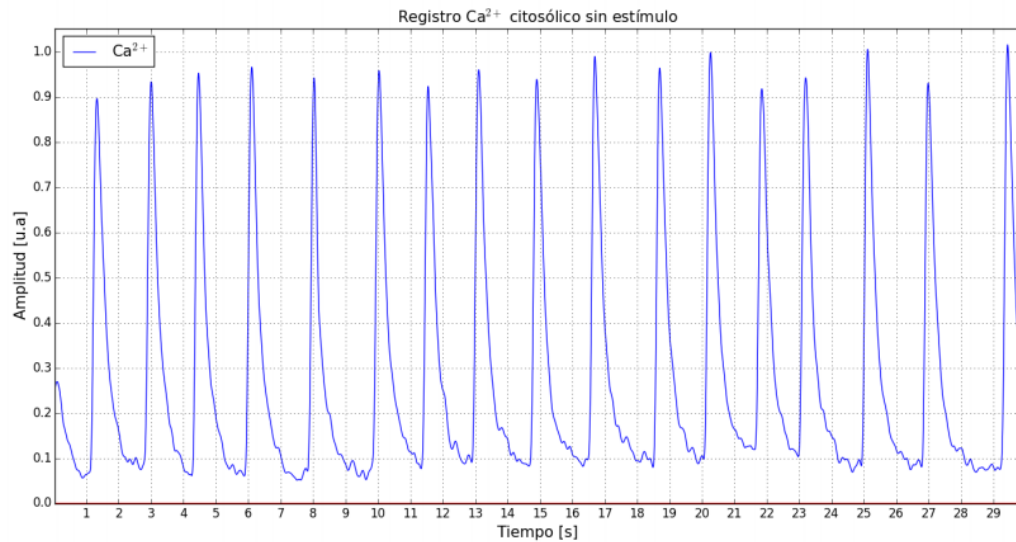


Figura 2.1 Ventana temporal inicial de las oscilaciones de Ca^{2+} citoplasmático en células de asilada de corazón en embrión de pollo a una frecuencia promedio de 0.7 Hz.

Esto es debido a los cambios de la permeabilidad de membrana por la actividad de canales, o proteínas embebidas en la membrana de bicapa lipídica que facilitan el movimiento pasivo de iones específicos en favor de sus gradientes electroquímicos [7], siendo el promedio de un flujo de iones entrando y saliendo de una célula, concluyendo que hay cierta variabilidad inherente en dicha señal.

Hay un creciente interés en tomar en cuenta factores estocásticos en la dinámica cardíaca, ya que el origen de arritmias se ha asociado a inestabilidades a nivel celular del corazón [14, 12]. Dentro de nuestro grupo de investigación se ha hecho estudios en órgano completo, demostrando que, al inducir cierto porcentaje de ruido blanco al estímulo eléctrico, este repercute en la respuesta cardíaca alterando la frecuencia y fuerza de contracción en el corazón. Concluyendo que, a bajos porcentajes de variabilidad, se aumenta el rango de acoplamiento entre la excitación y la contracción [12].

Con todo lo antes mencionado, nace la necesidad de estudiar al corazón y su contribución con el ruido a nivel celular, específicamente las células involucradas en la contracción del corazón, llamadas cardiomiocitos, las cuales son las principales efectoras de la fuerza contráctil del corazón cuando todas trabajan en conjunto iniciadas por un estímulo eléctrico proveniente del nodo sino auricular. Es bien sabido que, en diferentes patologías esta fuerza de contracción es alterada llevando al corazón a un mal funcionamiento, es por ello, se desea estudiar la respuesta contráctil ante estímulos con y sin ruido en cardiomiocitos aislados de ratón, obtenidos de tejido primario, dado a un mejor acercamiento a la fiabilidad de los resultados experimentales en estas células.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Intensidades controladas de ruido extrínseco inducido al estímulo eléctrico, repercuten en la respuesta contráctil de los cardiomiocitos.

3.2 Objetivos

General:

Estudiar el efecto del ruido extrínseco inducido al estímulo eléctrico en la respuesta contráctil en cardiomiocitos de ratón.

Particulares:

1. Validar los parámetros dinámicos de la respuesta contráctil en cardiomiocitos control de ratón.
2. Demostrar el efecto del ruido inducido en la estimulación eléctrica en la dinámica de la respuesta contráctil en cardiomiocitos de ratón.

4. METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL.

4.1 Extracción del corazón.

4.1.1 Preparación del ratón.

Para este proyecto se utilizaron ratones silvestres de la cepa C57-BL/6 de una edad aproximada de 5 semanas de edad con una masa corporal aproximada entre 30 y 36g, siguiendo los protocolos éticos de experimentación animal aprobados por el Cinvestav-IPN. fueron inyectados vía intraperitoneal con 200µl de heparina de una solución 5000 U/ml para evitar la generación de trombos intracoronarios. Después de 20 minutos, se sacrificó al animal mediante dislocación cervical.

4.1.2 Incisión en Planos y Extracción del corazón.

Una vez realizada la dislocación cervical en el animal, se hace una incisión en la línea media desde el abdomen hasta el cuello, retirando piel y músculo. Posterior a eso se rompe el diafragma y se retira el esternón por completo exponiendo toda la cavidad torácica. Se reconocen las venas cavas superior e inferior, así como la aorta y se aplica un nudo (sin apretar) a ésta última con un hilo de seda. Rápidamente se retira el corazón de la cavidad, teniendo especial cuidado de cortar la aorta en un punto distal a la primera rama del cayado de manera que se pueda introducir una cánula de perfusión 5 a 10 mm sin riesgo de ocluir el orificio de las coronarias o atravesar la válvula aórtica [15]. La cánula tiene una longitud de 15mm y diámetro de 0.95mm [16]. Después de introducir la cánula en la aorta, se procede a fijarla con dos nudos realizados con hijos de seda. Desde la remoción completa del corazón hasta el inicio de la perfusión transcurren aproximadamente entre 30 y 90 segundos.

4.1.3 Perfusión retrograda

Se le conoce como perfusión retrógrada al proceso por el cual el flujo de nutrientes va en sentido contrario al fisiológico, hablando del corazón, esta perfusión es de vital importancia llevarla a cabo cuando necesitamos que el corazón siga latiendo aun estando fuera del individuo, esto es, en lugar de salir del corazón por la aorta, entra a través de esta ejerciendo cierta presión, dada esta presión se produce el cierre de la válvula aortica, haciendo que la solución de perfusión fluya directamente hacia las coronarias, manteniendo al tejido cardiaco irrigado, como se muestra en la en la Figura 4.1. La presión de perfusión coronaria se mantiene dentro de un rango constante lo cual permite una variación de flujo de acuerdo con los mecanismos de autorregulación del corazón.

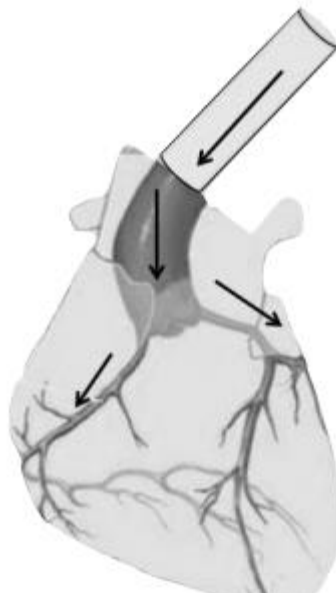


Figura 4.1 perfusión retrograda.

El flujo constante de los nutrientes que irrigan a las arterias coronarias para la supervivencia del corazón es llevado a cabo gracia al sistema de Langendorff, el cual se describe a continuación.

4.1.4 Técnica de Langendorff para corazón aislado

El sistema Langendorff es una técnica experimental de órgano aislado. Su funcionamiento es básico, consiste en ejercer un flujo retrogrado a través de una cánula insertada en la aorta, aportando cierta presión a la válvula aortica, como consecuencia, esta se ve ocluida por sentir un flujo en contra de su apertura unidireccional, provocando que el flujo de nutrientes se desplace por las arterias coronarias para nutrir a todo el miocardio del corazón, conservando su supervivencia y latir en el vacío. El médico y fisiólogo alemán Oscar Langendorff describió la técnica en 1895 [17].

En la Figura 4.2 se muestra un esquema representativo de la técnica de perfusión de Langendorff [17]. La solución de perfusión se encuentra contenida en un reservorio a un pH de 7.4, para nuestros fines esta solución no fue oxigenada. La solución viaja a un flujo de 3mL/min hasta la cánula de perfusión retrógrada con ayuda de una bomba peristáltica (mini pump variable flow) [18]. Para mantener la temperatura constante de 37°C, se hace circular agua desde una cámara controladora de temperatura (PolyScience®) a través de un serpentín en un circuito de recirculación.

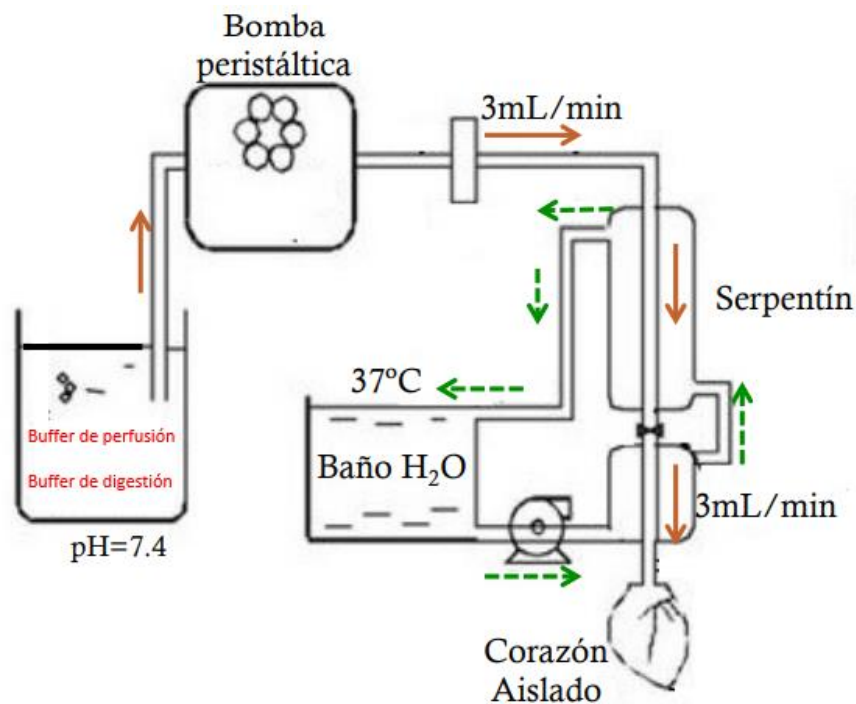


Figura 4.2 técnica langendorff para corazón aislado para aislamiento celular

4.2 Obtención de los cardiomiocitos.

4.2.1 Perfusión y disgregación del corazón

Una vez realizada la extracción del corazón, se procede a montar al corazón en el sistema langendorff (antes descrito) para continuar con la obtención de los cardiomiocitos. La solución para perfundir al corazón extraído es un búffer de perfusión el cual está conformado por NaCl 113.0 mM, KHCO_3 10.0 mM, KCl 4.7 mM, MgSO_4 1.2 mM, KH_2PO_4 , 0.6 mM, HEPES 10.0 Mm, Na_2HPO_4 0.6mM, NaHCO_3 12.0 Mm, TAURINA 30.0 Mm. [19]. Al buffer de perfusión se le añade una concentración de glucosa 5.5 mM y BDM 10 Mm, posteriormente se ajuste el pH a 7.45 con NaOH o HCL según lo requiera. La solución del buffer de perfusión viaja a un flujo de 3.5 mL/min hasta la cánula de perfusión retrograda, suministrado durante un tiempo de 3-5 minutos hasta que las arterias coronarias se hallan limpiado por completo con ayuda de una bomba peristáltica, manteniendo una temperatura constante de 37°C.

Enseguida, se perfunde el corazón con una solución de buffer de digestión durante 5 minutos, teniendo en cuenta que el tiempo de perfusión con esta solución depende de la actividad enzimática de la colagenasa (Worthington Biochemical), por lo que se requiere caracterizar el tiempo adecuado. Una vez pasado los 5 minutos con el buffer de digestión se prosigue con un corte transversal entre el septum y el ápice del corazón, esto con la finalidad de delimitar el músculo ventricular del corazón como se muestra en la Figura 4.3.



Figura 4.3 corte de corazón para la obtención de los cardiomiocitos.

En un recipiente con 4 mL buffer de paro se procede a la disgregación del tejido ventricular con tijeras finas. La suspensión consecuente es transferida a un tubo falcon™ de 15 ml, para continuar con la disgregación mecánica por pipeteo con un gradiente descendente de luz de las puntas, comenzando con una pipeta Pasteur y finalizando con una punta de pipeta de 1000 uL. hasta obtener una suspensión celular homogénea. Por último, se lleva a cabo la filtración de la suspensión para remover posibles restos de tejido y sangre que no se logró disgregar.

4.2.2 Reintroducción de calcio.

Hasta este punto del protocolo de aislamiento, los cardiomiocitos han estado en un ambiente libre de calcio con la finalidad de mantener una tasa metabólica baja y no generar contracciones espontáneas durante la disgregación, evitando un decadente e ineficiente aislamiento [19]. Tratando de reanudar con el funcionamiento natural de los cardiomiocitos se lleva a cabo la reincorporación de calcio, la cual se divide en 5 reintroducciones de calcio, controlando la concentración entre cada reintroducción, dejando 4 minutos entre una reintroducción y otra, comenzando con 20 ml de CaCl₂ [10 mM], 20 ml

de CaCl₂ [10 mM], 40 ml de CaCl₂ [10 mM], 12 ml de CaCl₂ [100 mM], y por último 20 ml de CaCl₂ [100 mM]. teniendo una concentración final de 1 mM. Al término de la reintroducción de calcio se procede a suspender las células durante 10 minutos, para después eliminar el sobrenadante y agregar 5 ml de solución Tyrode a una temperatura de 37°C, dando como finalizada la obtención de los cardiomiocitos para su posterior uso.

4.3 Estimulación eléctrica

4.3.1 Rango de estímulo.

Para investigar el papel de la variabilidad en la función cardiaca se midió el acortamiento celular dependiente de la frecuencia de estímulo, en estudios previos en donde estimulan a las células sin variabilidad han llevado este rango de estímulo de los 0.2Hz a los 2Hz [20], sin embargo, nosotros decidimos aumentar ese rango hasta los 5hz para observar un mayor ancho de banda del fenómeno y las repercusiones que tiene el ruido en los cardiomiocitos.

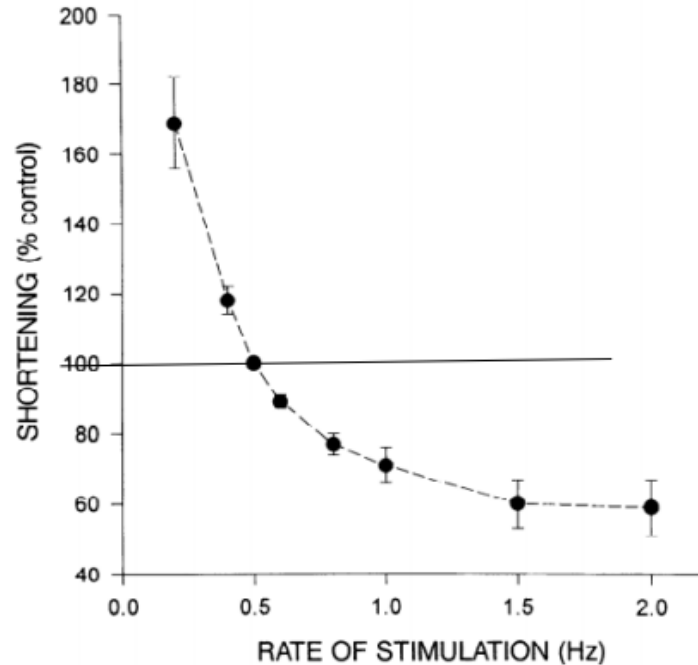


Figura 4.4 Efecto de la frecuencia (de 0.2 a 2.0 Hz) sobre el acortamiento en miocitos de ratón. El acortamiento a 0,5 Hz se estableció como 100%. Los datos se presentan como medias + SE (n = 7 células).

4.3.2 Estimulación eléctrica sin ruido blanco inducido

Para llevar a cabo la estimulación de las células fue de necesidad utilizar cámaras de estimulación modelo RC-21BRFS como se muestra en la Figura 4.5. Los cardiomiocitos situados entre los electrodos de platino (Aldrich Chemistry) con diámetro de 0.25mm, fueron estimulados eléctricamente con la ayuda de un generador de funciones en LabView (National Instruments, USA) con una amplitud de pulso de 20 V y 5 ms de duración de pulso (esto para evitar una perturbación durante periodos refractarios), generando un campo uniforme de 30 V/cm, logrando estimular a más del 80% de las células situadas en la cámara de estimulación [20].

El protocolo de electroestimulación sin variabilidad de los cardiomiocitos fue el siguiente: los trenes de pulsos eléctricos fueron suministrados de manera controlada manteniendo una amplitud constante de 20V y una duración de pulso de 5 milisegundos, la frecuencia de estimulación eléctrica inicial fue establecida en 0.2Hz seguido de 0.5Hz, 1Hz, con incrementos de 1Hz hasta una máxima frecuencia de estimulación de 5Hz.

El tiempo de estimulación para cada rango de frecuencia fue de 30 segundos exceptuando la frecuencia de 0.2Hz, en esta frecuencia se estimuló durante un minuto, ya que la célula miocárdica recibe un estímulo cada 5 segundos y con un minuto obtenemos una estabilidad de las contracciones los cardiomiocitos. A continuación, se esquematiza el protocolo de estimulación en la Figura 4.6.

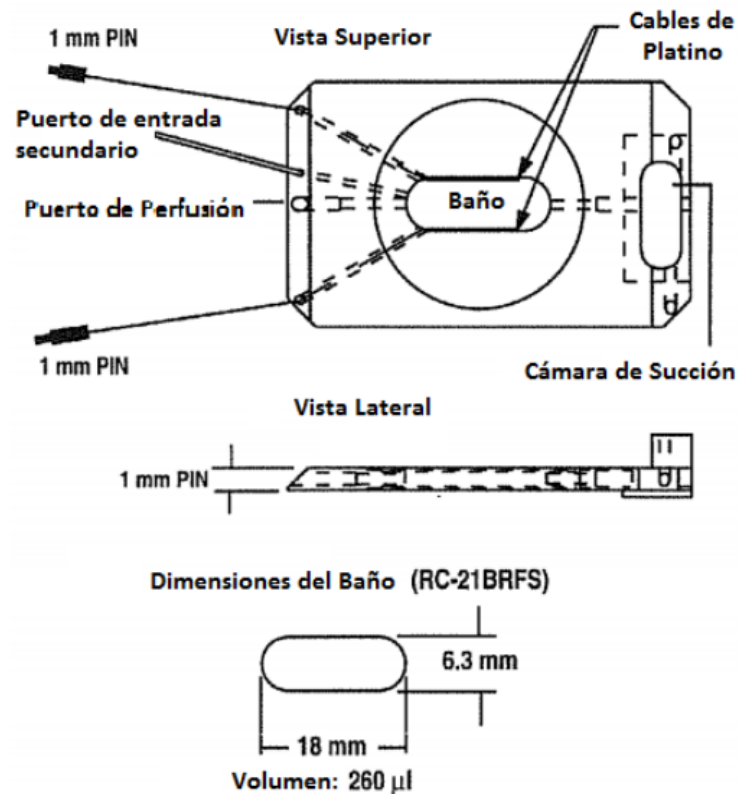


Figura 4.5 Cámara de estimulación.

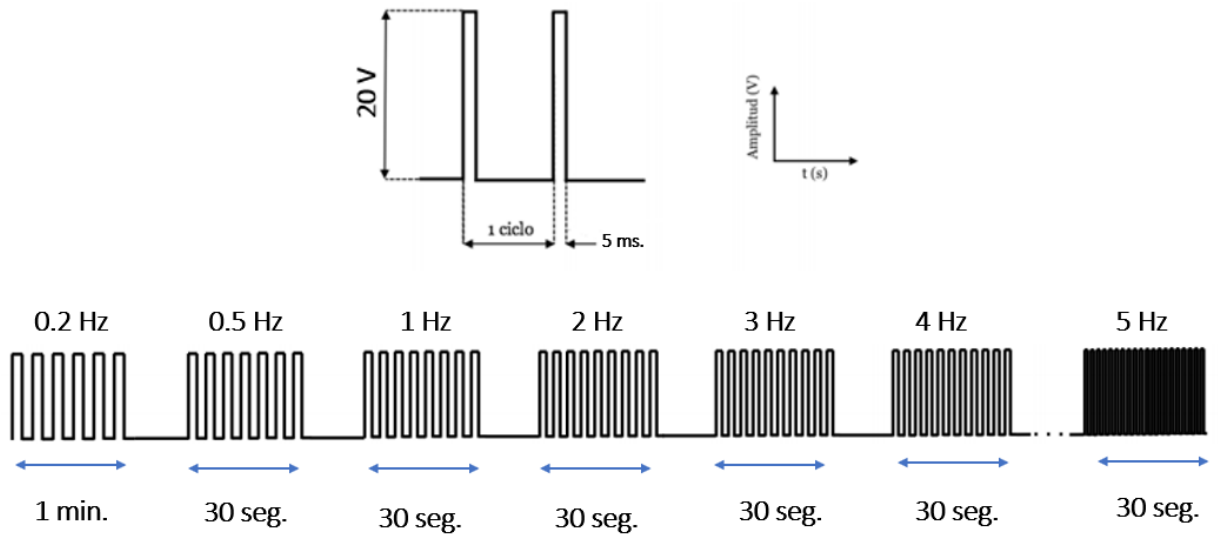


Figura 4.6 Estimulación eléctrica externa. La estimulación consiste en trenes de pulsos periódicos con 5 ms de la duración total del ciclo en alto, con el objetivo de evitar posibles efectos refractarios. La frecuencia de estimulación mínima es 0.2Hz hasta una máxima de 5Hz, mediante ventanas de 30 segundos de estimulación por célula.

4.3.3 Estimulación eléctrica con ruido blanco inducido

Para la segunda parte de los experimentos en donde el ruido es añadido, se llevó a cabo el mismo protocolo experimental descrito anteriormente con la diferencia de que se indujo ruido blanco aditivo a la señal con una amplitud equivalente al 10% con respecto a la señal original (señal sin ruido), en otras palabras, se tiene el tren de pulsos eléctricos el cual es perturbado por otra señal ruidosa del amplitud variable, la fusión de estas dos señales da como resultado el estímulo que excita a los cardiomiocitos, la morfología de esta señal se muestra a continuación (Figura 4.7).

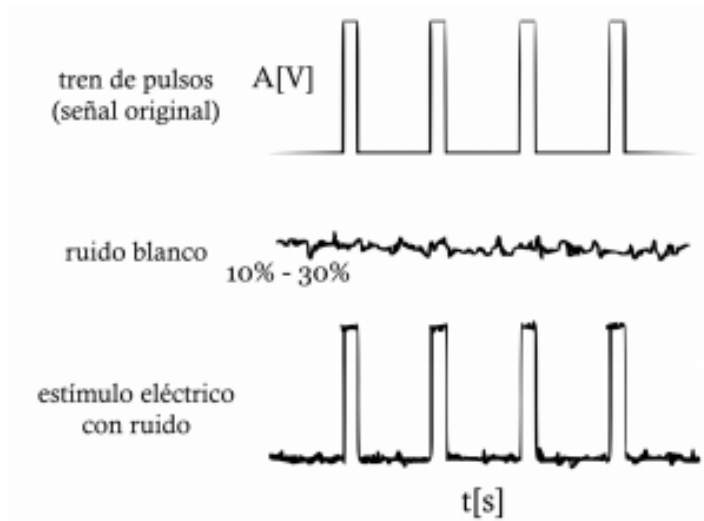


Figura 4.7 Estímulo eléctrico con ruido inducido. La señal original de tren de pulsos es perturbada por una señal de ruido blanco aditivo con 10, 20 y 30% de amplitud con respecto a la señal original. La fusión de las señales compone al estímulo eléctrico con ruido.

A continuación, se hicieron registros incrementando la amplitud del ruido blanco en 10% de amplitud con respecto a la señal original, hasta obtener un ruido máximo de 30%. La Figura 4.8 se muestran los gráficos de la señal registradas del generador de funciones desarrollado en LabView. Teniendo estos cuatro registros como los efectores de la estimulación de las células a diferentes niveles de ruido.

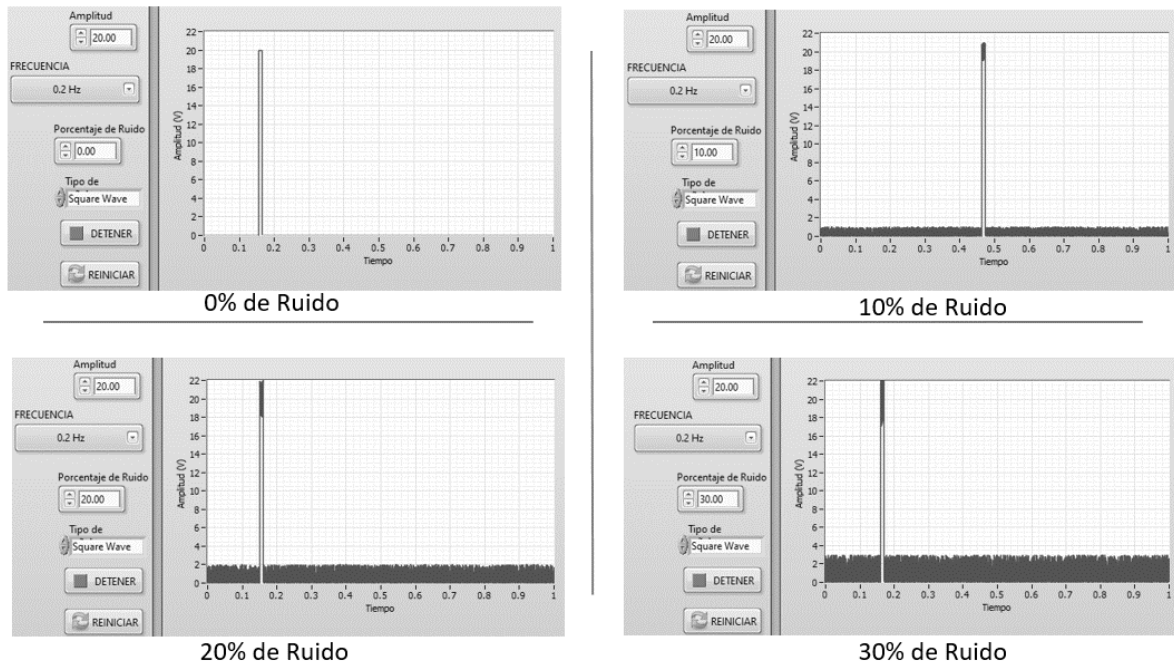


Figura 4.8 Registros de la señal eléctrica que estimula a los cardiomiocitos aislado a 20V y 0.2Hz con diferentes intensidades de ruido comenzando con 0% (control) seguido de 10,20 y 30%.

4.4 Obtención de los registros contráctiles.

Para la obtención de los registros temporales de la contracción se eligieron cardiomiocitos de una longitud aproximada de 150-180 micrómetros, fue de necesidad utilizar una cámara rápida (IONoptix), la cual adquiere 250 imágenes por segundo, siendo suficiente para captar los eventos contráctiles con buena resolución. Estas imágenes eran procesadas en tiempo real por medio de reconocimiento de bordes (Figura 4.9), con ayuda IonWizard, software encargado de tal procesamiento en tiempo real, obteniendo registros contráctiles como el que se muestra en la Figura 4.10.

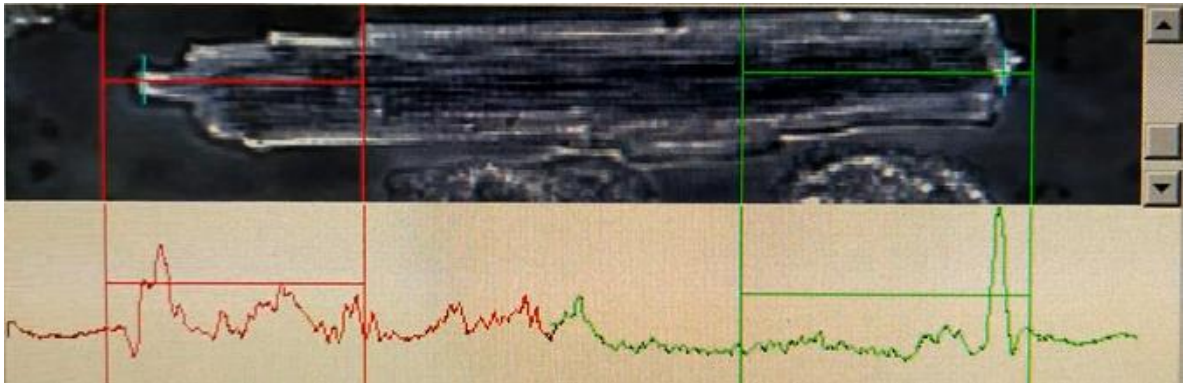


Figura 4.9 Procesamiento de video en tiempo real para el reconocimiento de borde del cardiomiocito.

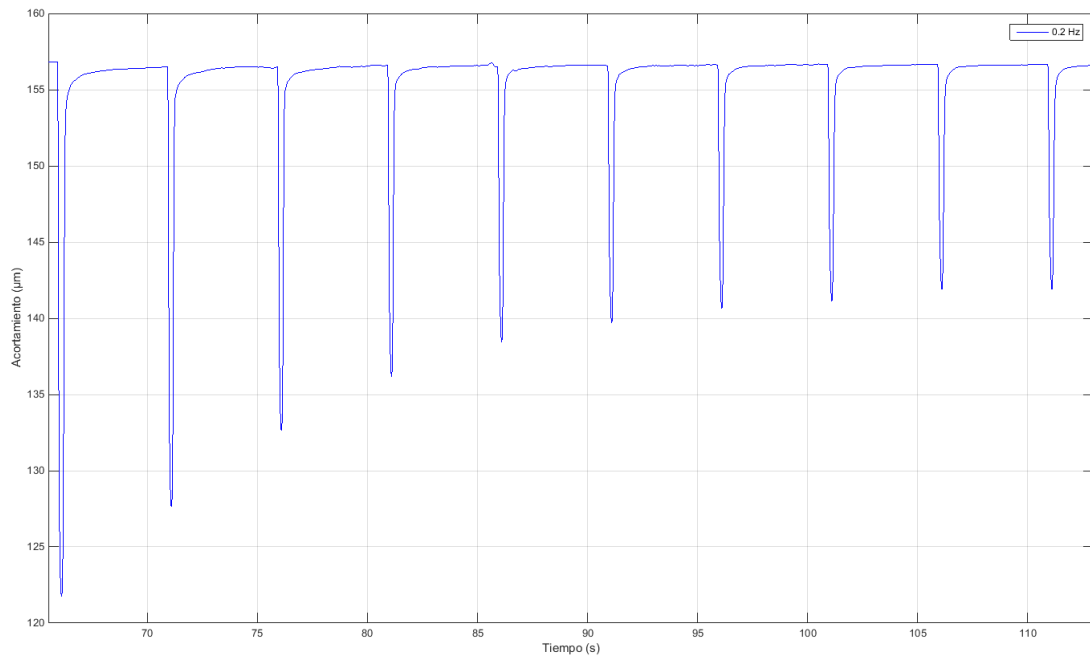


Figura 4.10 Registro contráctil de célula ventricular (cardiomiocito) perturbada con una serie de estímulos sin variabilidad a una frecuencia de 0.2Hz..

4.5 Parámetros analizados

4.5.1 Porcentaje de acortamiento, velocidad máxima de contracción y relajación.

Uno de los principales parámetros para estudiar la variabilidad en la respuesta cardiaca es analizar el acortamiento celular dependiente de la frecuencia de estímulo [20], para ello, es necesario determinar el porcentaje de acortamiento, que es, la relación entre la amplitud absoluta de la contracción y la longitud de la célula diastólica, en otras palabras, es la relación que existe entre la longitud de la contracción absoluta y el tamaño basal de la célula antes de iniciar con la serie de estímulos, arrojando las contracciones normalizadas respecto a la misma célula en su estado basal (Figura 4.11).

Las velocidades máximas tanto de contracción y de relajación fueron adquiridas al derivar los registros contráctiles, es sabido, que la derivada mide la razón de cambio instantáneo con el que varía un valor en el tiempo, dándonos como resultado las velocidades de los eventos contráctiles en cada instante transcurrido en el tiempo ($\mu\text{m/s}$). Observando el gráfico de la derivada de los registros contráctiles, notamos que cada evento cuenta con dos picos, uno inferior y otro superior, siendo estos puntos las velocidades máximas alcanzadas por cada evento de construcción (sístole), así como el de relajación (diástole) respectivamente, como se muestra en la Figura 4.12.

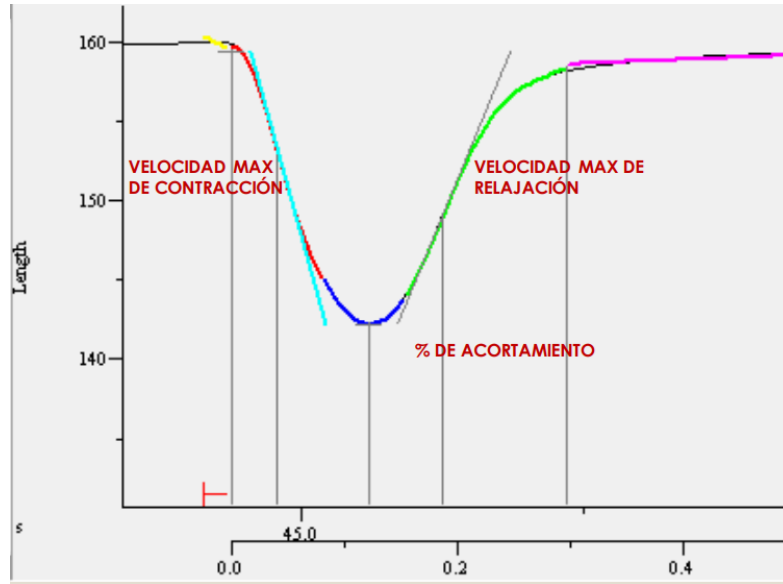


Figura 4.11 Registro de una sola contracción de un cardiomiocito aislado. Se muestra las variables analizadas (porcentaje de acortamiento, velocidad máxima de contracción y de relajación).

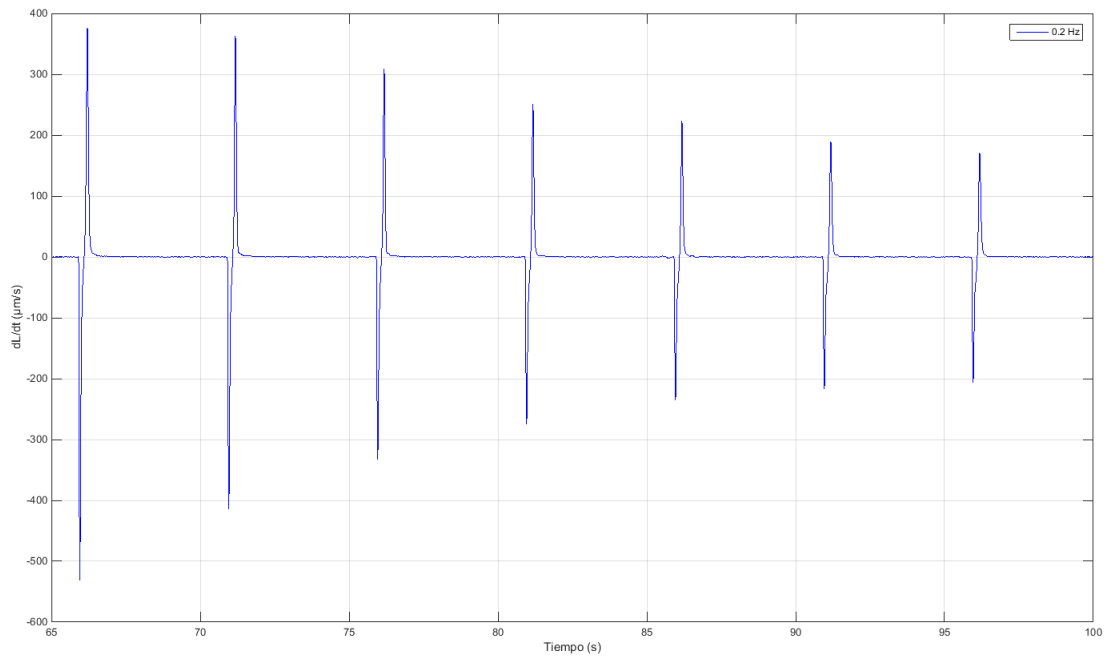


Figura 4.12 Derivada de un registro de contracción con una frecuencia de estímulo de 0.2 Hz, mostrada en una ventana de 35 segundos, donde cada uno de los eventos (proyectando un total de 7 eventos) representa la derivada cada contracción, teniendo como consecuencia la velocidad máxima de contracción (pico inferior) y la velocidad máxima de relajación (pico superior).

4.5.2 Tiempo de contracción y de relajación

Se midió el tiempo de contracción, el cual nos da información de la cantidad de tiempo que se llevó el evento de contracción desde el estado basal, justo antes de comenzar a contraerse hasta llegar a la máxima contracción, dando como finalizado tal tiempo. Mientras que el tiempo de relajación comienza exactamente en el punto máximo de contracción y termina cuando la célula comienza a presentar cambios no significativos en la pendiente, esquematizado en la Figura 4.13.

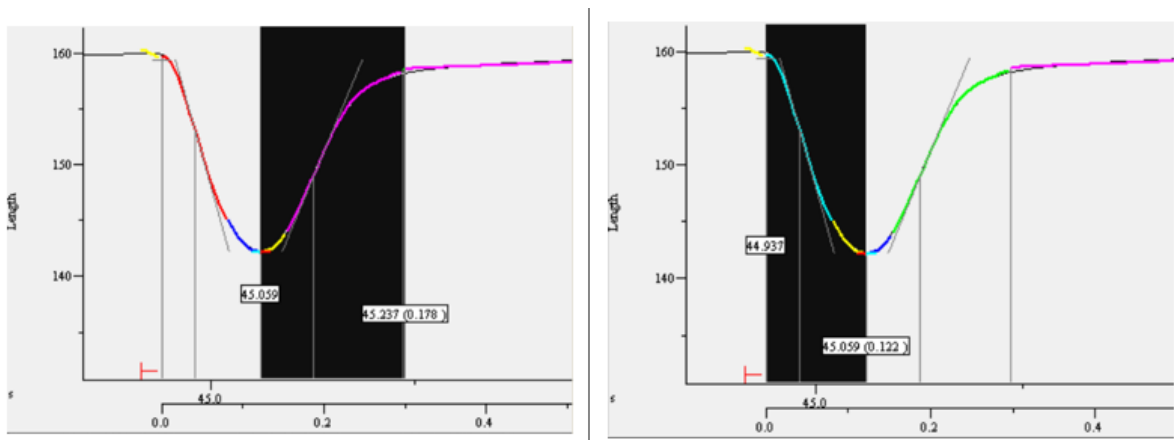


Figura 4.13 Registro de una sola contracción de un cardiomiocito aislado en donde la sombra de color negro representa el tiempo en el que dura el evento de contracción y relajación respectivamente.

4.5.3 Áreas del evento de contracción y relajación

Por último, se analizaron las áreas bajo la curva correspondientes a los eventos de contracción y de relajación, dando una información adicional de los efectos ante los estímulos a diferentes niveles de variabilidad. Estas áreas se ven representadas en la Figura 4.14.

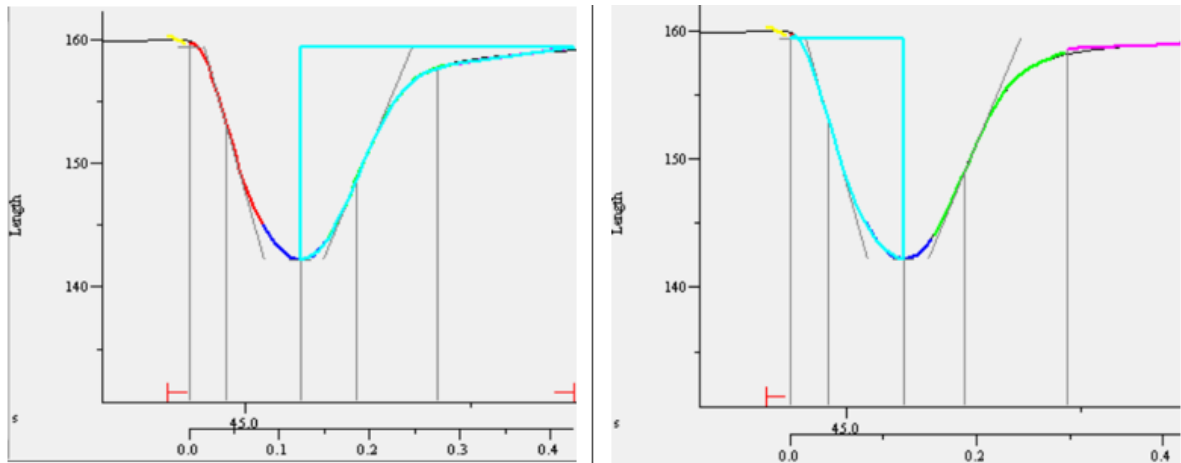


Figura 4.14 Registro de una sola contracción de un cardiomiocito aislado en donde se ve representadas las áreas de contracción y relajación respectivamente.

5. RESULTADOS

La magnitud de la contracción celular (μm) en un evento sistólico de un cardiomiocito, así como las velocidades máximas de contracción y relajación, están ligadas íntimamente con la frecuencia de estímulo, con la que es perturbada dicha célula, proporcionando información suficiente para dilucidar los efectos que se obtienen debidos a una estimulación eléctrica externa con y sin ruido inducido [21]. Tomando principalmente en cuenta la dependencia de la estimulación eléctrica a nivel celular y los mecanismos intracelulares involucrados, así como las propiedades reflectarías que juegas un papel importante para valores relativamente altos de frecuencias de estimulación. Por ello, se tomaron registros temporales de la repuesta contráctil de los cardiomiocitos ante estímulos perturbados sin variabilidad inducida,

teniendo un marco de referencia para después ser contrastada con futuros experimentos, agregando ciertos niveles de variabilidad al estímulo eléctrico. La Figura 5.1 muestra los registros representativos (normalizados) para distintos valores de frecuencia de estimulación sin ruido inducido.

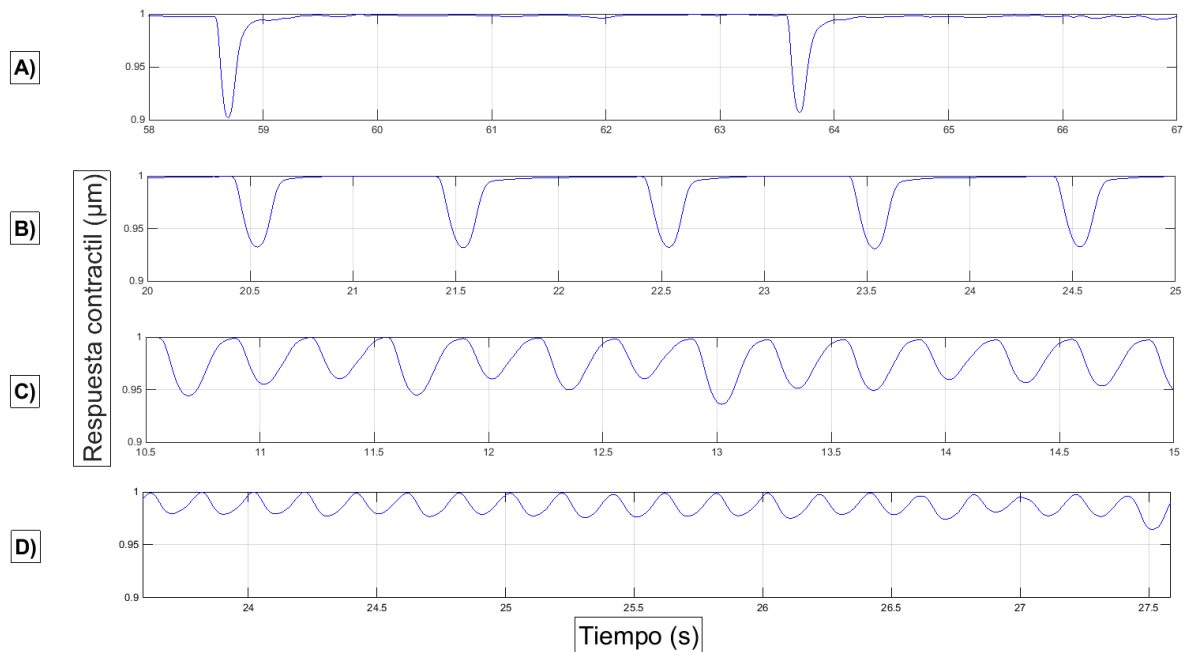


Figura 5.1 Registros temporales de la repuesta contráctil de los cardiomiocitos sin ruido en el estímulo. Para valores bajo de frecuencia (A) 0.2 Hz, (B) 1 Hz, las contracciones suelen ser constantes y sostenidas, mientras que para medianos y altos valores de frecuencia de estimulación (C) 3 Hz, (D) 5Hz, se presenta una dinámica diferente, teniendo mayor repercusión en la amplitud de la contracción.

5.1 Validación del montaje experimental: experimentos control

Para asegurar la fiabilidad el montaje experimental, se realizaron registros contráctiles y se midió el porcentaje de acortamiento, así como velocidad máxima de contracción y relajación de cinco corazones diferentes (n=5), para los experimentos control (señal eléctrica inducida sin variabilidad). Figura 5.1, se observa que la amplitud de las señales se mantiene constante durante la ventana de estimulación con frecuencias bajas (0.2 Hz y 1 Hz) y tiende a decrecer conforme aumenta la frecuencia de estímulo (3 Hz y 5 Hz).

Se obtuvo el comportamiento de la amplitud de la contracción a consecuencia del estímulo eléctrico, representado como el porcentaje de acortamiento, que es la relación existente de la longitud de la contracción absoluta y el tamaño basal de la célula antes de ser estimulada.

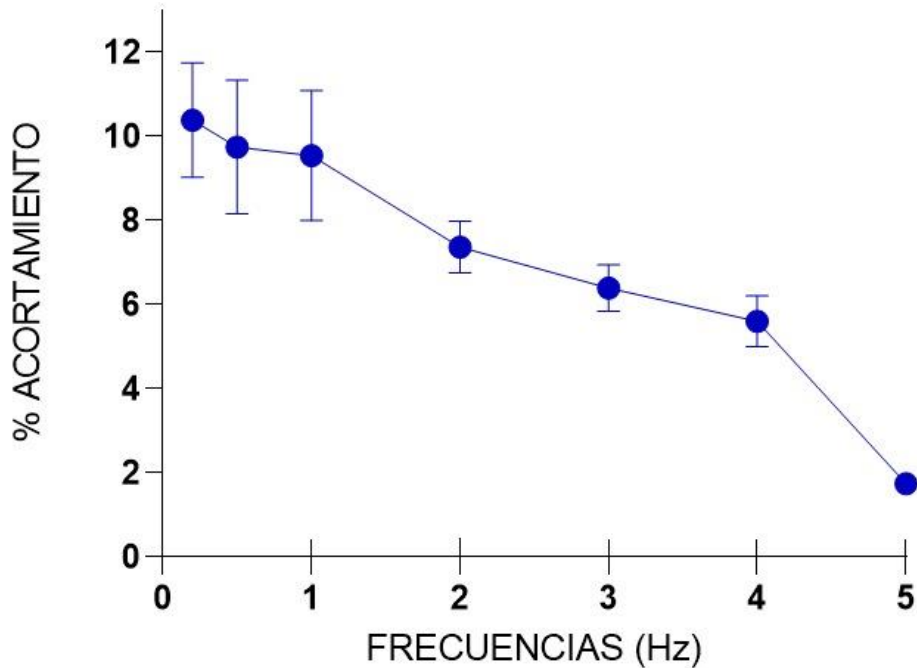


Figura 5.2 Gráfico de la respuesta del porcentaje de acortamiento a diferentes intensidades de frecuencias de estímulos eléctricos sin variabilidad inducida. Los resultados se muestran como valor promedio \pm Error estándar ($n=5$).

Figura 5.2, el eje de las abscisas muestra la frecuencia a la cual la célula es estimulada, mientras que el eje de las ordenadas proporciona la magnitud del porcentaje de acortamiento a consecuencia del estímulo eléctrico. Como se observa, el porcentaje de acortamiento tiene una tendencia negativa conforme aumenta la frecuencia de estímulo, emprendiendo con un porcentaje de acortamiento de **10.38 %** ante una frecuencia de estimulación de 0.2 Hz y terminando con el **1.75 %** del porcentaje de acortamiento cuando la célula es estimulada a 5 Hz (frecuencia máxima del protocolo de estimulación). Haciendo que las contracciones lleguen a ser cada vez menores (menor amplitud) y sostenidas.

Al mismo tiempo se analizó las velocidades máximas de contracción y de relajación, las cuales dan información indirecta de los mecanismos fisiológicos internos de la célula, para que esta pueda llevar a cabo el proceso de sístole y diástole en un evento contráctil, con la implementación de la derivada (d/dt) a los registros contráctiles obtenidos.

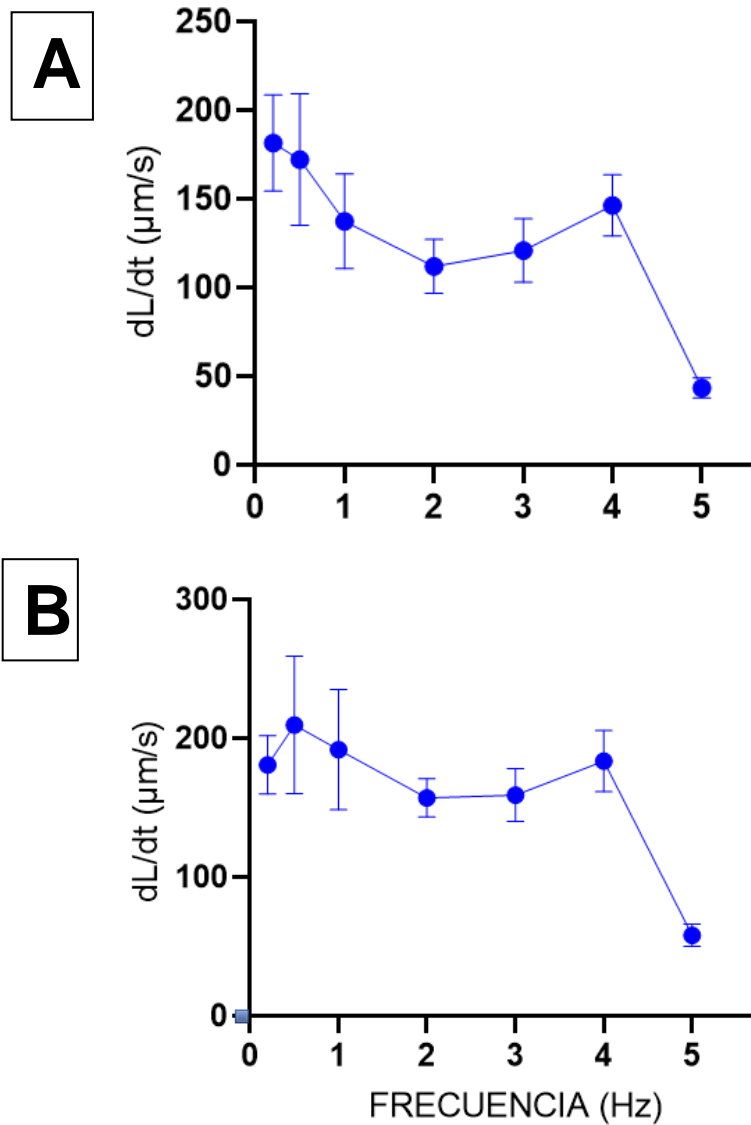


Figura 5.3 Velocidad máxima de contracción (figura A) y relajación (figura B) de un evento contráctil de célula ventricular (cardiomiocito) estimuladas eléctricamente sin variabilidad a diferentes frecuencias de estímulo. Los resultados se muestran como valor promedio \pm Error estándar ($n=5$).

El grafico 5.3, en el eje de las abscisas se muestra la frecuencia a la cual es estimulada la célula, mientras que en el eje de las ordenadas proporciona la magnitud de las velocidades máximas de contracción (figura A) y relajación (figura B) a consecuencia del estímulo eléctrico sin variabilidad. Es apreciable como la velocidad máxima de contracción se ve comprometida, ralentizando el proceso de sístole a medida que incrementa el número de estímulos por segundos (frecuencia), sin embargo, el desplome de la velocidad es evidente en la más alta frecuencia del protocolo de estimulación, es decir, cuando la célula es perturbada con cinco estímulos por cada segundo transcurrido (5 Hertz), asignando un umbral en los 4Hz, donde la pérdida de las velocidades máximas de contracción y relajación tiende ser relativamente constante, pero cuando pasa a la siguiente intensidad de frecuencia, rápidamente pierde una cantidad considerable de velocidad en ambos eventos contráctiles.

Los tiempos de contracción y de relajación (considerando solo hasta el 90 % de la relajación), así como, las áreas bajo la curva de ambos eventos fueron variables a considerar, sin embargo, estos resultados se anexan en el apartado de apéndice, ya que, con los resultados de las variables antes descritas (porcentaje de acortamiento y Velocidades máximas) dan suficiente información para discutir los efectos del papel de la variabilidad en células ventriculares (cardiomiocitos).

Los resultados mostrados previamente concuerdan con lo reportado en la literatura [19][20][21], por lo tanto, el montaje experimental es adecuado para responder a la hipótesis del trabajo.

5.2 Comportamiento de las respuestas contráctiles de los cardiomiocitos ante estímulos con ruido.

Para investigar el efecto del ruido en la contracción de cardiomiocitos, se realizó el siguiente experimento, se estudiaron los efectos de los diferentes niveles de ruido, en el porcentaje de acortamiento, así como las velocidades máximas de contracción y relajación. A partir de aquí, el nivel de variabilidad del 10 % será señalado con rojo, el 20 % será señalado con verde y el 30 % será señalado con gris (con líneas punteadas).

Este nuevo protocolo de estimulación consta de una señal de ruido blanco Gaussiano con diferentes intensidades (10, 20 y 30% de amplitud con respecto a la señal eléctrica original), la cual, fue añadida a la señal de estimulación y se obtuvieron registros de la respuesta contráctil. Los resultados de la respuesta contráctil debida a estímulos con diferentes niveles de ruido inducido se muestran en la Figura 5.4. Como se puede apreciar, independientemente de la intensidad de ruido inducido, el porcentaje de acortamiento (respuesta normalizada con respecto a la célula en reposo) decrementa conforme incrementa la frecuencia de estimulación. No se encontró ninguna diferencia significativa entre el grupo control (experimentos sin ruido) y los grupos con diferentes intensidades de ruido inducido en el estímulo eléctrico ($P < 0.05$).

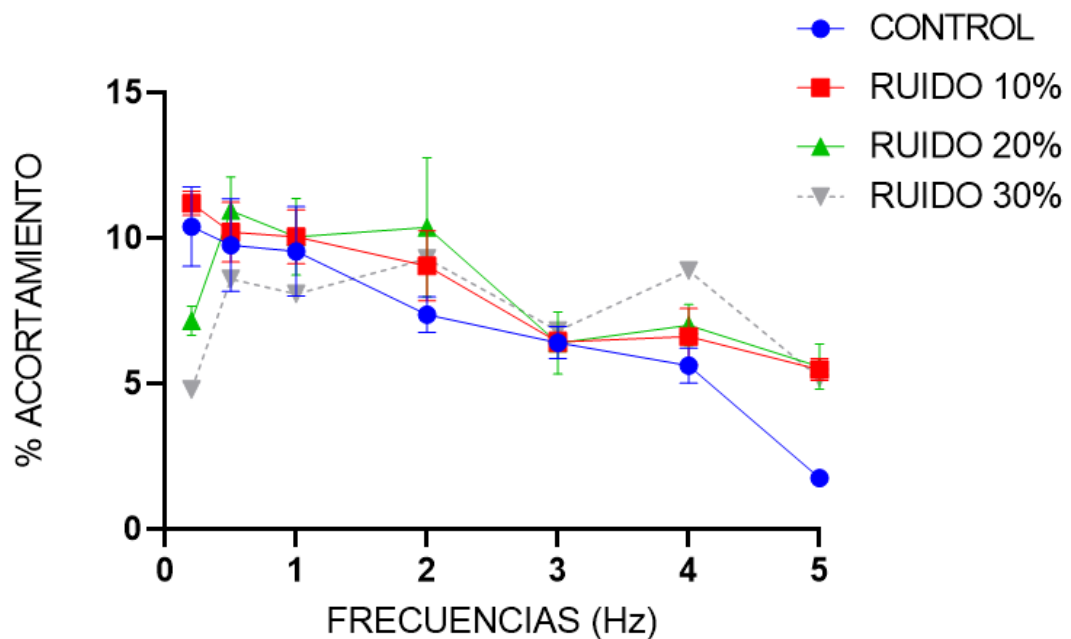


Figura 5.4 Efecto del ruido en la respuesta contráctil representado en el porcentaje de acortamiento. Los resultados se muestran como valor promedio \pm Error estándar ($n=5$). 30% $n= 1$. El análisis estadístico se llevó mediante ANOVA 1 vía, seguido de una prueba Tukey.

Sin embargo, cuando se añade el 10% de ruido en el estímulo eléctrico, el porcentaje de acortamiento se encuentra por arriba respecto al control en todos los escenarios de frecuencias, teniendo mayor énfasis cuando se estimula a 5 Hz (cinto estímulos en un

segundo), sospechando de una recuperación de la contracción en contraste con el control, ante un nivel supra de frecuencia en nuestro protocolo de estimulación (5 Hz). Se considera 5 Hz, una frecuencia relativamente alta, esto debido a que los procesos dinámicos moleculares de los iones involucrados se encuentran comprometidos por la velocidad del estímulo, siendo el efecto del 10 % de ruido en el estímulo eléctrico el cual supera esta carencia de amplitud en la contracción.

De igual forma que en los experimentos control, se obtuvieron las variables de velocidades máximas de los eventos contráctiles a distintos niveles de ruido (10%,20% y 30%). A continuación, se describe el comportamiento de las velocidades máximas de contracción (Figura 5.5 A) y relajación (Figura 5.5 B) a consecuencia del estímulo eléctrico con ruido inducido a diferentes niveles, comparado con los resultados de la respuesta contráctil ante estímulos sin variabilidad.

Para comprobar el efecto del papel de la variabilidad en la respuesta contractil en cardiomiocitos de raton, se realizo el análisis estadístico mediante ANOVA 1 vía, seguido de una prueba Tukey, dando como resultado, el hallazgo de una diferencia significativa entre el grupo control (experimentos sin ruido) y el grupo con el 10% de ruido, en las velocidades máximas de contracción (P= 0.11) y relajación (P= 0.035), como se muestra en la Figura 5.5.

Como observa en los resultados obtenidos (Figura 5.5), al añadir ruido en el estímulo eléctrico, las velocidades máximas de contracción y relajación se ven alteradas, mostrando un aumento de ambas velocidades respecto al control y al mismo tiempo una disminución de la tendencia negativa de las velocidades a medida que aumenta la frecuencia de estímulo, particularmente cuando se añade el 10% de variabilidad, mostrando un efecto significativo del ruido en la respuesta contráctil de los cardiomiocitos, siendo más evidente cuando la célula es llevada a un estrés temporal en la frecuencia de estímulo, en otras palabras, cuando la magnitud de exigencia contráctil (tasa de acortamiento) es elevada por encima de su tasa óptima de contracción, la cual está ligada al potencial de acción de dicha célula, sin entrar en procesos refractarios que juegan un papel importante para valores relativamente altos de frecuencias de estimulación.

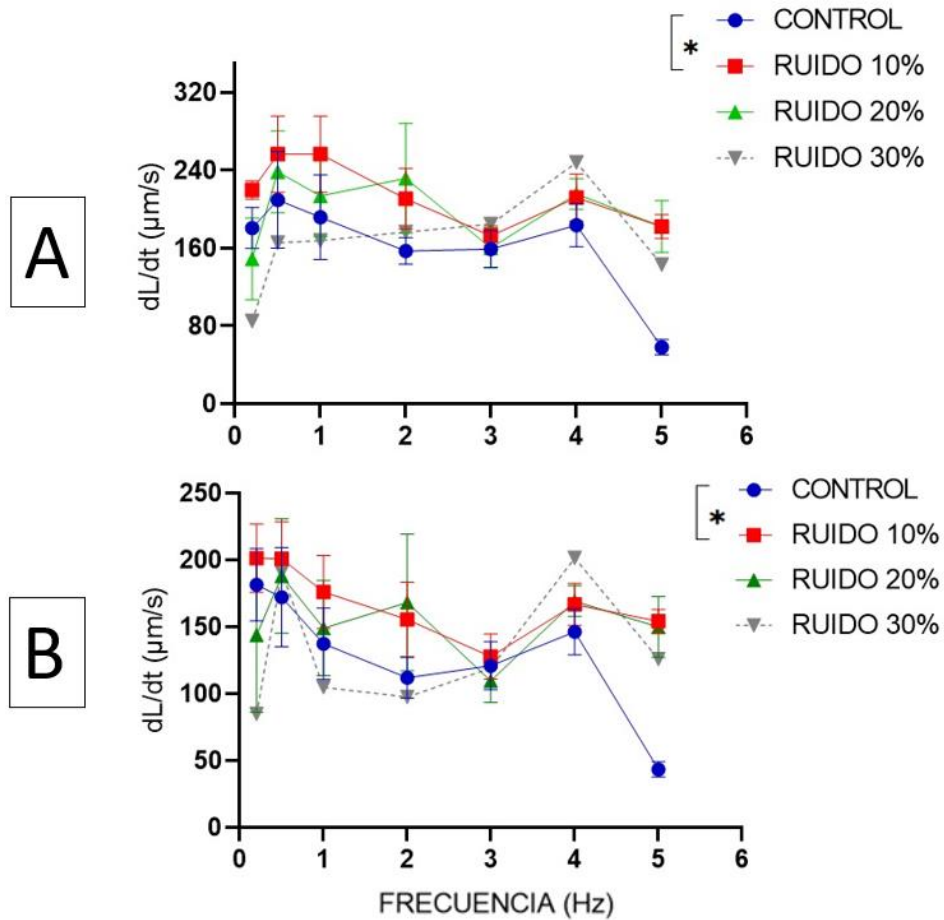


Figura 5.5 Efecto del ruido en las velocidades máximas de contracción y relajación. Los resultados se muestran como valor promedio \pm Error estándar ($n=5$). El análisis estadístico se llevó mediante ANOVA 1 vía, seguido de una prueba Tukey.

Cabe resaltar que, analizando la Figura 5.4 y 5.5, particularmente en la frecuencia de estimulación de 5 Hz y un ruido del 10 %, se observa una recuperación de las características de las tres variables analizadas, fenómeno no observado en frecuencias inferiores. Realizando un análisis puntual en 5 Hz, encontramos una mayor recuperación de las propiedades de la contracción con el nivel de ruido al 10 % comprado con el control, mostrado en la Figura 5.6.

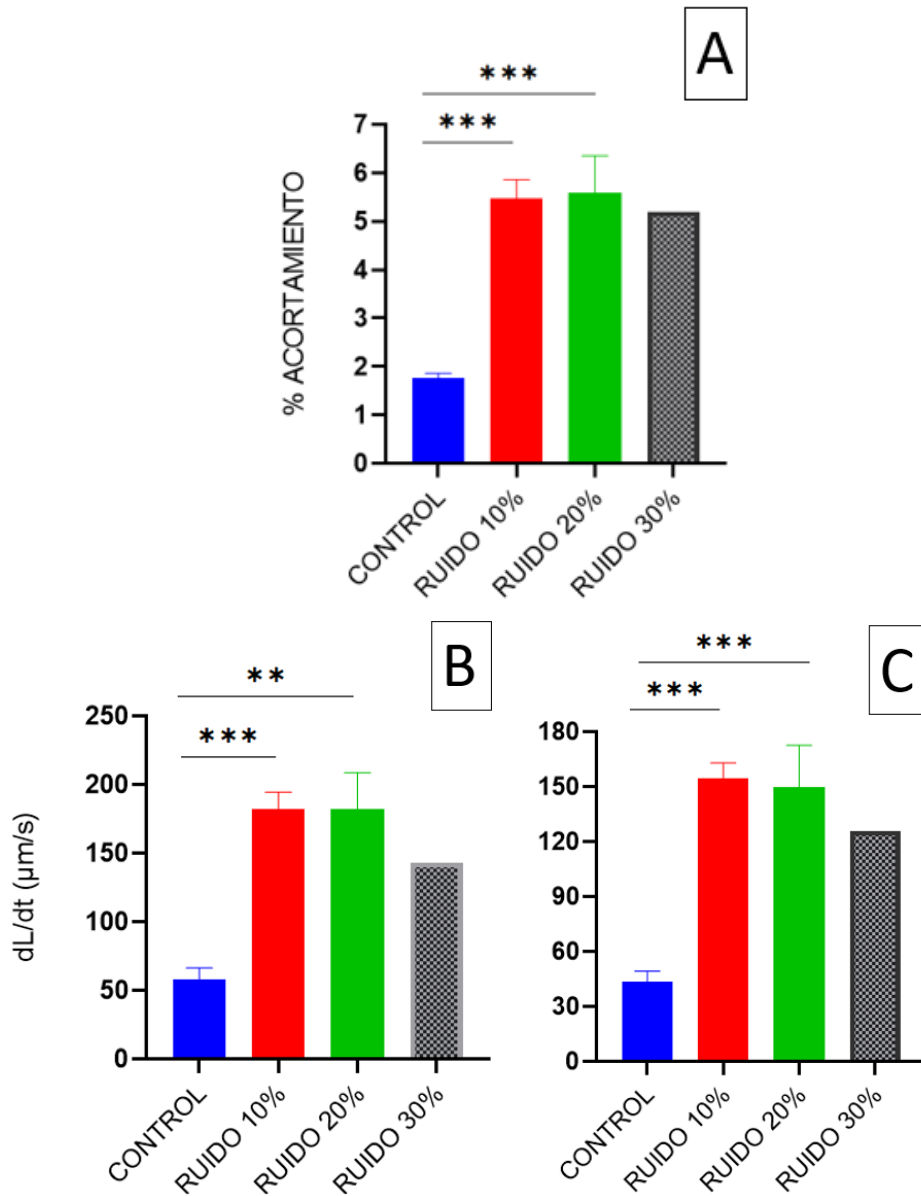


Figura 5.6 Efecto del ruido en el porcentaje de acortamiento (Figura A), velocidades máximas de contracción (Figura B) y relajación (Figura C) a una frecuencia de estimulación de 5 Hz. (%A = porcentaje de acortamiento; VMC = Velocidad máxima de contracción; VMR = Velocidad máxima de relajación: %A (CONTROL vs. RUIDO 10%) $P=0.0004$, %A (CONTROL vs. RUIDO 20%) $P=0.0005$, VMC (CONTROL vs. RUIDO 10%) $P=0.0006$, VMC (CONTROL vs. RUIDO 20%) $P=0.001$, VMR (CONTROL vs. RUIDO 10%) $P=0.0003$, VMR (CONTROL vs. RUIDO 20%) $P=0.0006$. Los resultados se muestran como valor promedio \pm desviación estándar ($n=5$). El análisis estadístico se llevó mediante ANOVA 1 vía, seguido de una prueba Tukey.

5.3 Correlación de la velocidad máxima de relajación en contra del porcentaje de acortamiento.

Para analizar todos los resultados anteriores, se realizó la construcción de una correlación entre el porcentaje de acortamiento y la velocidad máxima de relajación, en todas las frecuencias de estímulo a diferentes niveles de ruido inducido (Control - 0%, 10% y 20%). Los índices de acortamiento dependientes de la velocidad son sensibles no solo a la contractilidad sino también a las condiciones de carga elástica interna, por ejemplo, un aumento en la carga elástica interna sobre el miocito ralentizaría la contracción, pero tendería a acelerar la relajación. Por tanto, una alteración en la proporción de las tasas de acortamiento o relajamiento puede ayudar a diferenciar entre el cambio en la contractilidad y las propiedades viscoelásticas intrínsecas de los miocitos.

La Figura 5.7, el eje de las abscisas se ordenó de manera descendente, debido que los resultados están ordenados acorde el protocolo de estimulación, tomando como referencia el valor más alto del porcentaje de acortamiento con relación a la frecuencia de estímulo inicial (0.2 Hz), hasta llegar a los 5Hz.

En el eje de las abscisas se muestra el grado de acortamiento, mientras que en el eje de las ordenadas las velocidades máximas que obtuvo la célula. Los puntos dispersos representan los experimentos realizados, representados con un color específico para cada nivel de ruido (control, 10% y 20%), así mismo, las líneas sólidas simbolizan las regresiones lineales obtenidas para cada grupo experimental. El resultado indicó un aumento en la tasa de contracción y relajación de los cardiomiocitos, independientemente del porcentaje de acortamiento, cuando se añade el 10 % de ruido, obteniendo una diferencia significativa entre las pendientes de las 2 líneas (control y ruido 10%) de regresión ($P = 0.0076$).

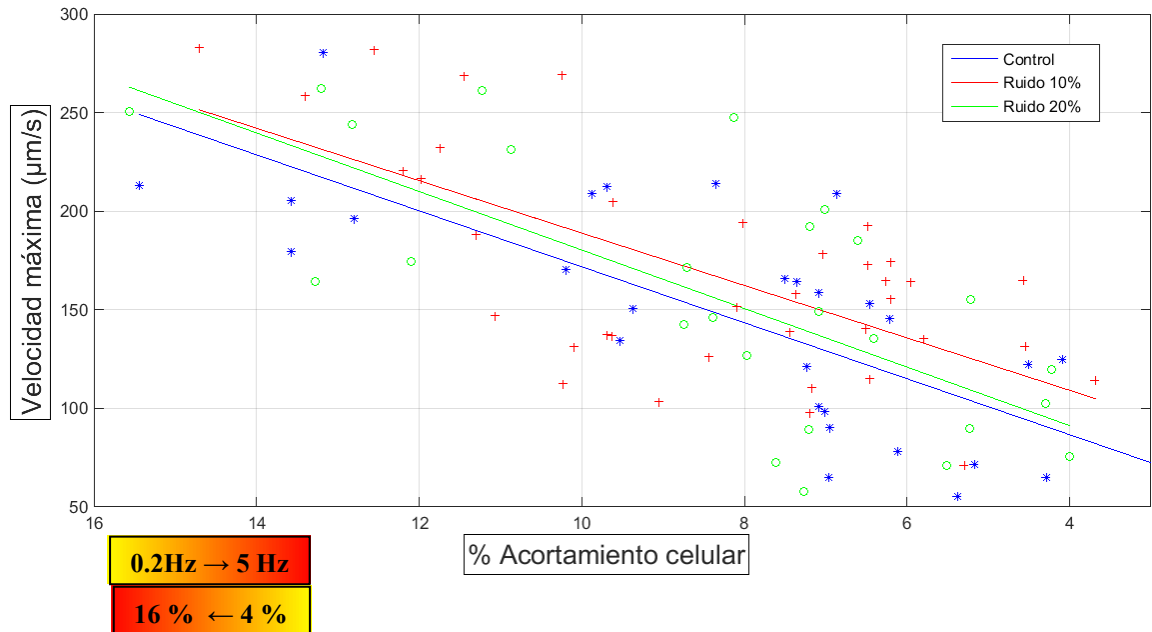


Figura 5.7 Correlación de la velocidad máxima de relajación en contra del porcentaje de acortamiento. Velocidad máxima de contracción Figura A, velocidad máxima de relajación Figura B. Las líneas continuas muestran la regresión lineal de los experimentos (puntos) control (azul), ruido 10% (rojo) y ruido 20% (verde). El análisis estadístico se llevó mediante ANOVA 1 vía, seguido de una prueba Tukey, con un intervalo de confianza del 95 % (CONTROL vs. RUIDO 10%; $P= 0.0076$).

6. DISCUSIÓN

Para que se lleve a cabo un evento contráctil en cardiomiocitos, es necesario un potencial de acción o una estimulación eléctrica externa, dada su naturaleza fisiológica (células excitables), dicho proceso también conocido como acoplamiento excitación-contracción [23]. La duración de los potenciales de acción ventricular tiene dos propósitos: primero, el periodo refractario el cual actúa como un mecanismo preventivo en el cual un segundo potencial de acción no puede llevarse a cabo, limitando la frecuencia de despolarización y así regular la frecuencia cardiaca; y por otro lado permite una adecuada relajación ventricular antes de la siguiente contracción [22].

La primera parte de esta tesis consistió en validar el montaje experimental, repitiendo los experimentos de proyectos llevados a cabo con anterioridad para el aislamiento exitoso de cardiomiocitos [19], posteriormente, estimular a dichas células con trenes de pulso eléctricos, generando un campo eléctrico uniforme de 30 V/cm, el necesario para activar los canales iónicos dependientes de voltaje, llevando a cabo la despolarización de la membrana celular, desencadenando la contracción del cardiomiocito [24][25][26], logrando estimular a más del 80% de las células situadas en la cámara de estimulación. La Figura 5.1 muestra cualitativamente cómo va cambiando la respuesta contráctil conforme aumenta la frecuencia de estimulación, en donde la amplitud de la señal de respuesta contráctil tiende a disminuir gradualmente [20]. Las Figuras 5.2 y 5.3 muestran la estadística de cinco experimentos de corazones diferentes para el porcentaje de acortamiento y las velocidades máximas (contracción y relajación) respectivamente, corroborando positivamente nuestros resultados con trabajos previos [19][20][21] y al mismo tiempo garantizando la efectividad del montaje experimental para responder a nuestra hipótesis.

Una vez obtenido los resultados control (respuesta contráctil ante estímulos sin variabilidad), se llevó a cabo el mismo protocolo experimental, pero con distintos valores de variabilidad inducida en el estímulo eléctrico, donde la gráfica de la Figura 5.4 expone una tendencia negativa del porcentaje de acortamiento a medida que aumenta la frecuencia de estímulo en todos los niveles de variabilidad, estos resultados coinciden con lo reportado en experimentos

de órgano completo, en donde aplican estimulaciones eléctricas con variabilidad, de igual forma se presenta el mismo comportamiento negativo de frecuencia-amplitud [12].

En la Figura 5.5, de igual forma, se observa una tendencia negativa sobre las velocidades máximas de contracción y relajación, además estos resultados indican que, en experimentos con el 10% de variabilidad, ambas velocidades se ven mayormente alteradas, exhibiendo un aumento significativo de la magnitud de ambas velocidades, así como una recuperación en valores altos de frecuencia con respecto al control, como se muestra cuantitativamente en la Figura 5.6, mostrando una mayor influencia del ruido cuando se añade el 10 % de variabilidad al estímulo eléctrico.

Finalmente, se realizó un análisis de regresión lineal de la relación entre el porcentaje de acortamiento y la tasa de relajación en todas las frecuencias de estímulo y niveles de variabilidad. Nuestros resultados van en orden diferente a lo reportados por otro autor que observa el comportamiento negativo, una disminución en la velocidad máxima de relajación [20], sin embargo, nosotros observamos un aumento en la velocidad de máxima de relajación, independiente del porcentaje de acortamiento cuando se añade variabilidad al estímulo eléctrico.

En la figura 5.7, se observa y se corrobora que la presencia del 10% de variabilidad en el estímulo eléctrico es la que mayor repercute en la respuesta contráctil de manera benéfica en comparación con los demás grupos experimentales, provocando una disminución en la pendiente negativa que existe entre la relación acortamiento-velocidad, concluyendo acerca de una recuperación en el porcentaje de acortamiento debido al aumento de la velocidad máxima de relajación causado por estímulos con variabilidad, concordando con el análisis individual por cada nivel de frecuencia (Figura 8.5) . Las características de la velocidad de relajación, está ligada con los procesos iónicos moleculares de la célula, los cuales reflejan cambios en variables físicas medibles, coincidiendo con trabajos previos [1][20]. Por lo tanto, Los cambios observados en las tasas de contracción y relajación dependientes de la velocidad, dan pauta a especular de una cinética alterada de los puentes cruzados.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren una alteración en la dinámica molecular de los iones involucrados, así como reacciones en cadena dentro de la célula, a causa de estímulos eléctricos con variabilidad, dejando abierta la pregunta: ¿cuál es el mecanismo

molecular alterado por la variabilidad?, principalmente, las moléculas que participan en el proceso de contracción. Un muy buen candidato a la especulación de los resultados vista desde el enfoque molecular es la alteración de la actividad del ATP en el proceso contráctil, ya que, se ha reconocido desde mucho tiempo que la tasa de hidrólisis de ATP por las cadenas pesadas de miosina es un determinante importante de la velocidad de acortamiento del músculo estriado [27][28]. Estudios previos descubrieron que disminuciones de la actividad enzimática ATPasa, reduce significativamente las velocidades máximas sin carga de acortamiento y relajamiento, pero sin detectar ningún cambio en el grado de acortamiento de los cardiomiocitos con respecto al grupo control [20]. Otro grupo de investigadores descubrió que estimulaciones eléctricas "ruidosas" favorecen la diferenciación de las células progenitoras del músculo FCD (Flexor de los dedos), muy probablemente a través de la liberación de ATP endógeno de las miofibras que se contraen [11]. Por otro lado, se sabe que la contractilidad miocárdica puede estar deprimida cuando disminuye el número de puentes cruzados actina-miosina que generan tensión, o una disminución de la tasa máxima de acoplamiento del puente cruzado, o ambas [29][30], entonces, de alguna manera esta aleatoriedad en el estímulo entra en resonancia con los procesos bioquímicos dentro de la célula, mejorando la dinámica del hidrolisis del ATP para aumentar la velocidad de contracción y relajación, sin alterar de manera significativa el porcentaje de acortamiento, ya que la cantidad de calcio se mantiene relativamente constante, presentando leves aumentos y por ende un aumento de la contracción, pero no de manera significativa para bajas frecuencias.

7. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

En conclusión, un nivel controlado de variabilidad inducido en el estímulo eléctrico repercute en la respuesta contráctil de cardiomiocitos, incrementando las velocidades máximas de contracción y de relajación.

Perspectivas:

Este trabajo sugiere la implementación de un modelo matemático que cuantitativamente ayudaría a dilucidar mejor el entendimiento de la variabilidad inherente a los potenciales de acción cardiacos externos y los iones involucrados. Otro modelo matemático para desarrollar sería un modelo fenomenológico que ayude con la interpretación de los resultados obtenidos a partir de perturbaciones con variabilidad.

Por otro lado, sugiere de la realización de experimentos de biología molecular, los cuales proporcione información certera de las moléculas afectadas por los estímulos con variabilidad, ampliando el entendimiento de la variabilidad en cardiomiocitos de ratón, para futuramente contrastar y discutir con los resultados previamente obtenidos en corazón aislado.

8. REFERENCIAS

- [1] Guyton and Hall. Tratado de fisiología Médica, volumen 1. Elsevier, 2011.
- [2] F Conti. FISILOGIA MEDICA. McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2010.
- [3] Greg Ikonnikov and Yelle Dominique. PHYSIOLOGY OF CARDIAC CONDUCTION AND CONTRACTILITY, 2016.
- [4] Ross. Histología: texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular, 7 ed. 2015.
- [5] Donald M. Bers. Cardiac excitation–contraction coupling. Department of Physiology, 2002.
- [6] Tortora, Derrickson. Principios de anatomía y fisiología, 13 Ed. 2013.
- [7] Hershel Raff, Michael Levitzky. Fisiología médica. Un enfoque por aparatos y sistemas, McGRAW-HILL INTERAMERICANA, 2013.
- [8] Rao, C. V., Wolf, D. M., and Arkin, A. P. (2002). Control, exploitation and tolerance of intracellular noise. *Nature* 420, 231–237.
- [9] Longtin, A. (2000). Effect of noise on the tuning properties of excitable systems. *Chaos, solitons and fractals* 11, 1835–1848. doi:10.1016/S0960-0779(99)00120-4.
- [10] FitzHugh, R. (1961). Impulses and Physiological States in Theoretical Models of Nerve Membrane. *Biophys. J.* 1, 445–466. doi:10.1016/S0006-3495(61)86902-6.
- [11] Alessandra Bosuttia , Annalisa Bernareggia , Gabriele Massariaa. (2019). A “noisy” electrical stimulation protocol favors muscle regeneration in vitro through release of endogenous ATP
- [12] Peña-Romo, A., Gámez-Méndez, A. M., Ríos, A., Escalante, B. A., and Rodríguez-González, J. (2016). Noise enhanced the electrical stimulation-contractile response

- coupling in isolated mouse heart. *Int. J. Cardiol.* 221, 155–160. doi:10.1016/j.ijcard.2016.06.130.
- [13] Carlos Diaz G. 2016. Estudio del efecto de la variabilidad en el acoplamiento eléctrico-iónico de calcio en células del nodo sinoauricular. 35-37
- [14] M Zaniboni, a E Pollard, L Yang, and K W Spitzer. Beat-to-beat repolarization variability in ventricular myocytes and its suppression by electrical coupling. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 278(3):H677–H687, 2000.
- [15] Monika Skrzypiec-Spring, Bartosz Grotthus, Adam Szelağ & Richard Schulz. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff. Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 55: 113- 126.
- [16] Fiona J. Sutherland and David J. Hearse. (2000). The Isolated Blood And Perfusion Fluid Perfused Heart. *Pharmacological Research*. 41: 613-627.
- [17] Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am Überlebenden saubethierhenzen. *Pflügers Arch.* 61:291-332.
- [18] Robert M. Bell, Mihaela M. Mocanu & Derek M. Yellon. (2011). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 50: 940-950.
- [19] Timothy D. O’Connell, Isolation and Culture of Adult Mouse Cardiac Myocytes, : *Methods in Molecular Biology*, vol. 357: Cardiovascular Proteomics: Methods and Protocols
- [20] BEATA M. WOLSKA AND R. JOHN SOLAR0, Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry, College of Medicine, Chicago, Illinois 60612-7342.
- [21] Dorn, Gerald W., II, Jeffrey Robbins, Nancy Ball, and Richard A. Walsh. Myosin heavy chain regulation and myocyte contractile depression after LV hypertrophy in aorticbanded mice. *Am. J. Physiol.* 267 (Heart Circ. Physiol. 36): H400-H405, 1994.

- [22] Janssen, P. M. L., and Periasamy, M. (2007). Determinants of frequency-dependent contraction and relaxation of mammalian myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43, 523–531. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.08.012.
- [23] Bers, DM. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415: 198-205.
- [24] Howlett SE and Ferrier GR. The voltage-sensitive release mechanism: a new trigger for cardiac contraction. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 1044–1057, 1997.
- [25] Levi AJ, Brooksby P, and Hancox JC. One hump or two? The triggering of calcium release from the sarcoplasmic reticulum and the voltage dependence of contraction in mammalian cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 27: 1743–1757, 1993
- [26] Ferrier, Gregory R., and Susan E. Howlett. Cardiac excitationcontraction coupling: role of membrane potential in regulation of contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1928–H1944, 2001
- [27] Barany, M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol* 50: 197-218, 1967.
- [28] Harrington, W. F., and M. E. Rodgers. Myosin. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 35-73, 1984.
- [29] Alpert, N. R., and L. A. Mulieri. Increased myothermal economy 1240-1247, 1988. of isometric force generation in compensated cardiac hypertrophy induced by pulmonary artery constriction in the rabbit: a characterization of heat liberation in normal and hypertrophied right ventricular papillary muscles. *Circ. Res.* 50: 491-500, 1982.
- [30] Goto, Y., B. K. Slinker, and M. M. LeWinter. Decreased contractile efficiency and increased nonmechanical energy cost in hyperthyroid rabbit heart. Relation between O₂ consumption and systolic pressure-volume area or force-time integral. *Circ. Res.* 66: 999-1011, 1990. 20. Grossman, W., D.

9. APENDICE

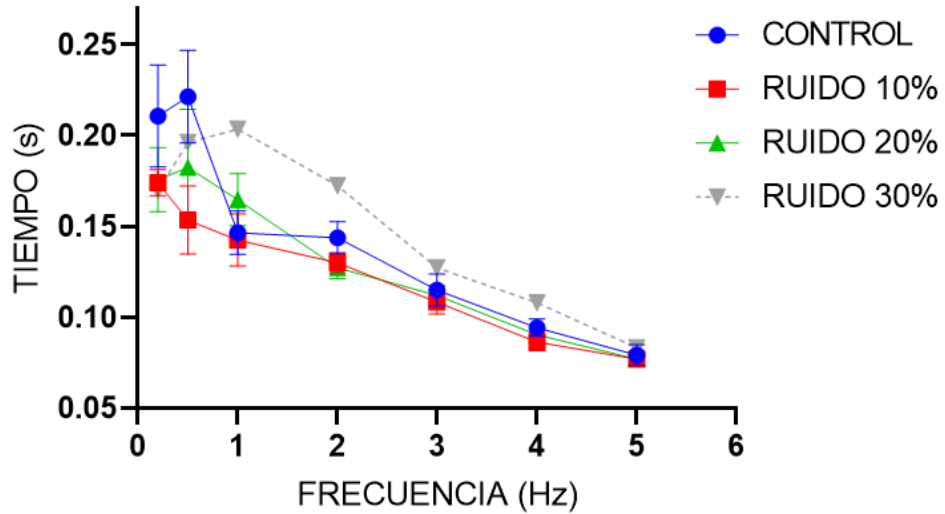


Figura 9.1 Tiempo de contracción. Tiempo desde el inicio de la contracción hasta la contracción máxima, Los resultados se muestran como valor promedio \pm Error estándar ($n=5$). 30% $n=1$

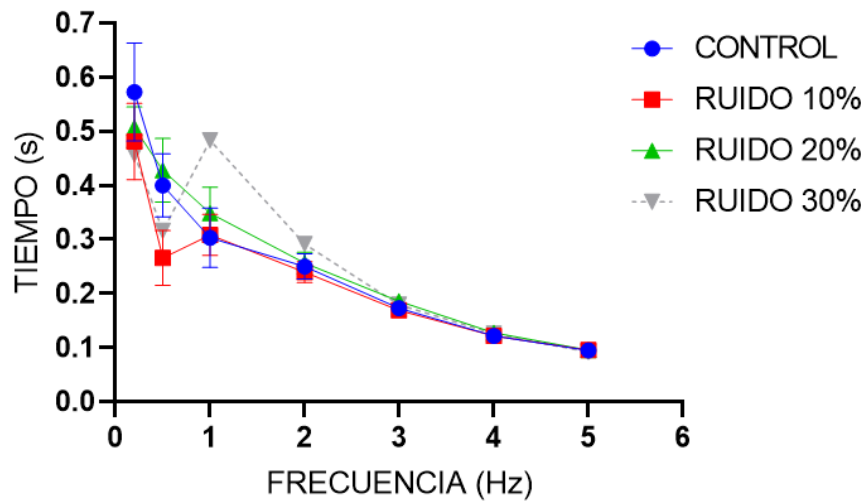


Figura 9.2 Tiempo de Relajación. Tiempo desde el punto máximo de la contracción hasta el 90% de tiempo antes de finalizar la contracción, Los resultados se muestran como valor promedio \pm Error estándar ($n=5$). 30% $n=1$

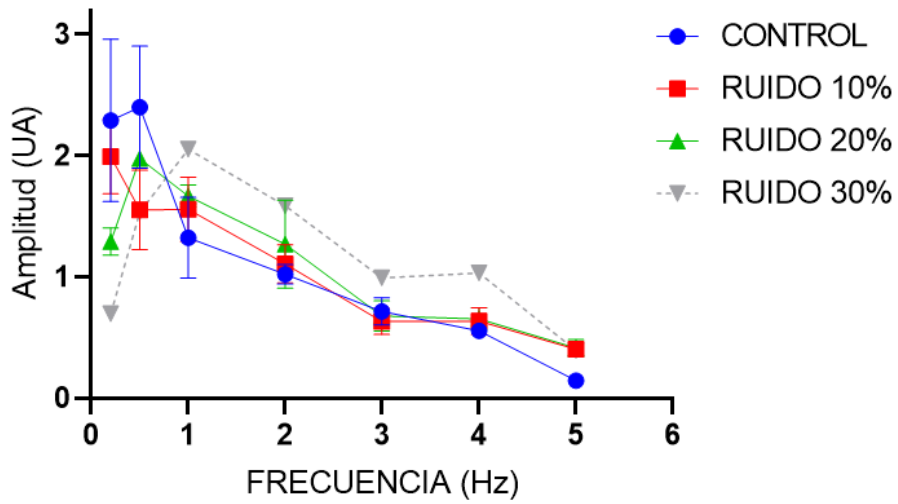


Figura 9.3 Áreas bajo la curva de la contracción celular. Los resultados se muestran como valor promedio \pm Error estándar ($n=5$). 30% $n=1$

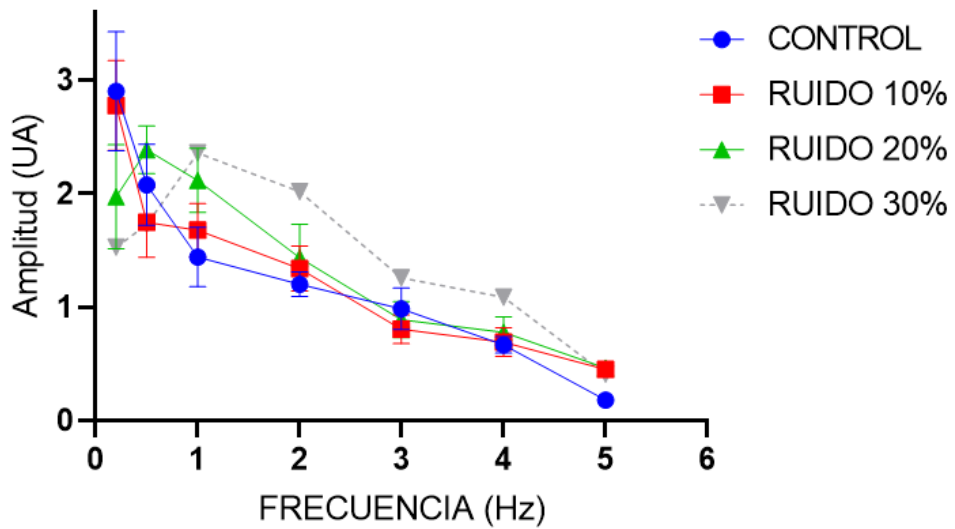
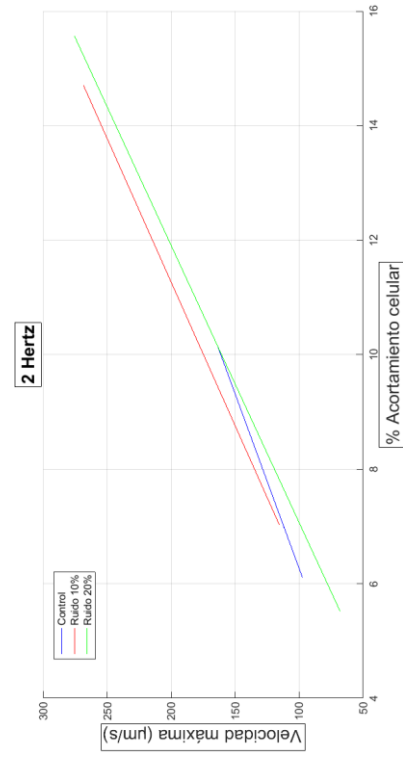
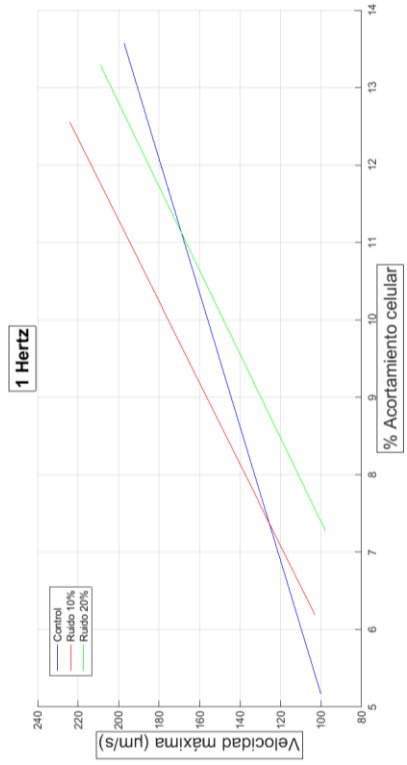
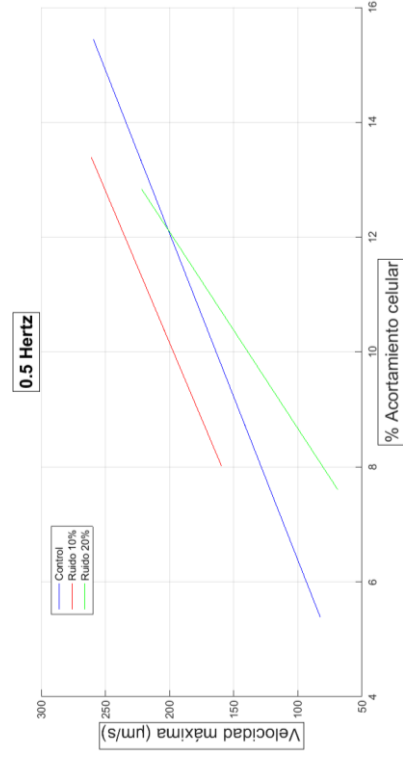
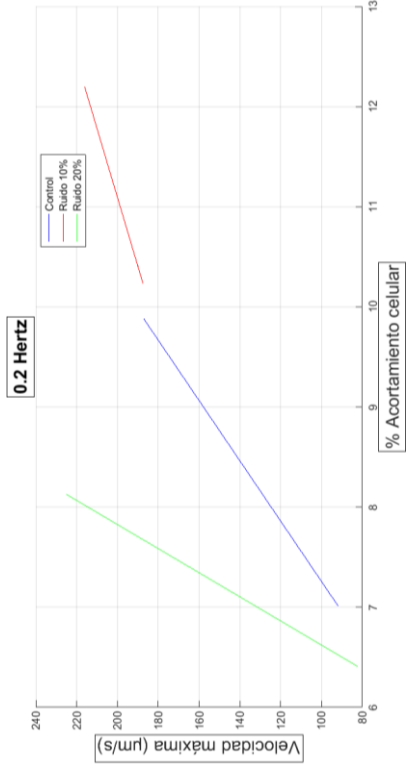


Figura 9.4 Áreas bajo la curva de la relajación celular. Los resultados se muestran como valor promedio \pm Error estándar ($n=5$). 30% $n=1$



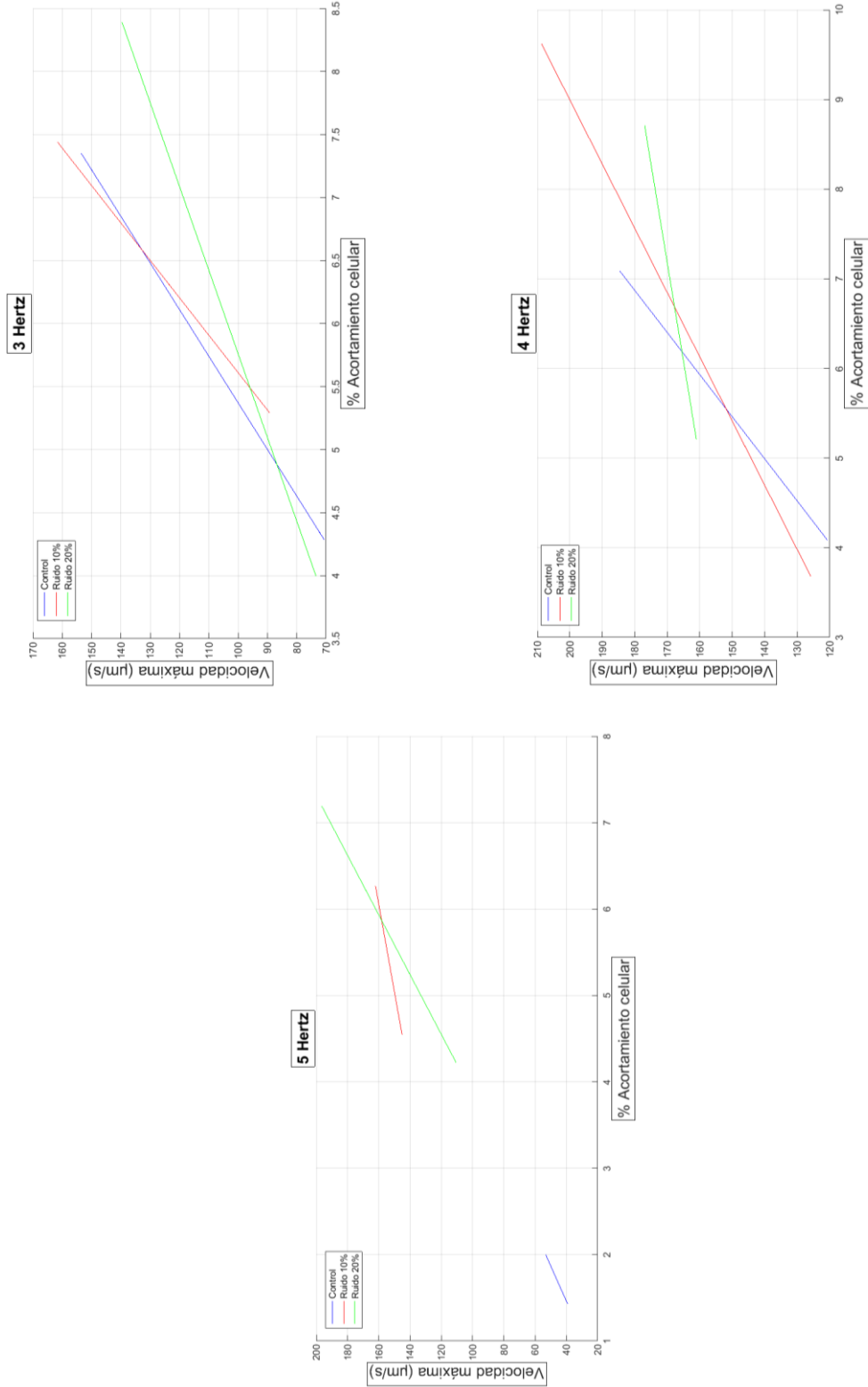


Figura 9.5 Regresión lineal por frecuencias. Representación de la relación del porcentaje de acortamiento contra la velocidad máxima de relajación por cada frecuencia del protocolo de estimulación.