



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

PAPEL DE LAS PROTEÍNAS DE TRANSPORTE EN EL
ACOPLAMIENTO ELÉCTRICO IÓNICO EN CARDIOMIOCITOS
ESTIMULADOS CON RUIDO

Tesis que presenta
Alberto Luis Ramírez Hurtado

para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias

con especialidad en
Ingeniería y Física Biomédicas

Director de la tesis:
Dr. Jesús Guadalupe Rodríguez González

Monterrey, Nuevo León.

Junio, 2023

AGRADECIMIENTOS

Después de tanto investigar, debatir, razonar e integrar el tema del ruido durante los últimos años, es inevitable trasladarlo a los pensamientos diarios, es inevitable no pensar en ello aun cuando se están realizando las actividades extracurriculares del día a día, yendo al supermercado, haciendo deporte, subiendo un cerro, mirando el entorno y la vida de cada individuo que nos cruzamos en el camino. Aun en las actividades más simples, el tema en el cual hemos trabajado durante tanto tiempo entra a meterle “ruido” a nuestros pensamientos y nos hace observar que incluso a nivel macro, estamos siendo afectados y viviendo inmersos dentro del mismo. Sin embargo, a este nivel entra una variable adicional que es nuestra consciencia la cual quizás es un mecanismo que tenemos para filtrar tanta variabilidad en nuestro entorno y nos permite intentar ir en la dirección correcta.

Mirando hacia atrás se nota que el tiempo sigue fluyendo sin descanso, ya habiendo transcurrido 6-7 años desde que se inició este camino, lo que quedan son recuerdos, lecciones, amistades pasajeras y otras tantas que se mantuvieron hasta el día de hoy. A todos ellos gracias porque de un modo u otro impactaron mi vida y fueron parte de quien soy y donde estoy y son un punto de partida para quien seré y donde estaré.

Entre todas las personas que han sido parte de todo este proceso hay que resaltar a mi familia y amigos, pues ellos son el soporte que me ha mantenido caminando todo este tiempo. También agradezco al Dr. Jesús Rodríguez por el apoyo, los consejos y sobre todo por la paciencia que me ha tenido en todo este camino.

Agradezco a mi comité tutorial, el Dr. Daniel Sánchez, el Dr. Moisés Santillán y el Dr. Bruno Escalante, pues también han sido de gran apoyo y han tenido la paciencia suficiente para llevar a cabo este proyecto.

Agradezco al Cinvestav Monterrey, pues ha sido mi tercer hogar por los últimos años, a los profesores, personal administrativo y en especial a mis amigos, los que están y los que estuvieron. Gracias a todos.

Y un agradecimiento también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) recién denominado CONAHCYT, por el apoyo económico otorgado de manera siempre puntual.

Como mención especial agradezco a María Lindelia Hurtado Martínez, mi adorada madre, que siempre ha estado ahí para aconsejarme, apoyarme, y quien amorosa e incondicionalmente me ha acompañado todo este tiempo.

Sinceramente,

Alberto Luis Ramírez Hurtado

Mayo 2023

Índice

Resumen.....	vi
Abstract.....	viii
1. Introducción.....	1
1.1. Ruido en biología.....	3
1.2. Corazón.....	7
1.2.1 Funcionamiento del corazón.....	7
1.2.1.1 Como bomba.....	7
1.2.1.1.1 Ciclo cardiaco.....	8
1.2.1.2 El potencial de acción.....	9
1.2.1.3 Acoplamiento excitación contracción.....	11
1.2.2 Estimulación eléctrica de las células.....	12
1.2.2.1 Efectos físicos fundamentales de estimular eléctricamente las células...14	
1.2.3 Modelos matemáticos de cardiomiocito.....	15
1.2.3.1 Modelo de Hodgkin y Huxley.....	16
1.2.3.1.1 Voltage clamp.....	16
1.2.3.1.2 Construcción del modelo de Hodgkin y Huxley.....	18
1.2.3.2 Modelo de acoplamiento eléctrico iónico de cardiomiocito de ratón.....	29
2. Antecedentes.....	32
2.1. En el sistema nervioso.....	32
2.2. En órganos efectores.....	34
2.2.1 Células de músculo esquelético.....	34
2.2.2 Corazón aislado de ratón.....	35
2.2.3 Cardiomiocitos.....	36
2.3. Justificación.....	38
3. Hipótesis.....	40
4. Objetivos.....	41
4.1. General.....	41
4.2. Específicos.....	41
5. Metodología.....	42

5.1.	Método 1. Donde se añade el ruido en la señal de estímulo externo que estimula el potencial de membrana y dispara el potencial de acción del modelo.	42
5.2.	Método 2. Donde se supone que el ruido se transmite y afecta a cada una de las conductancias de las 4 proteínas principales por donde fluye el calcio.	44
5.2.1	Descripción del experimento del método 2	47
5.3.	Estadística	48
6.	Resultados.....	50
6.1.	Validación del montaje experimental.....	50
6.2.	Exploración del efecto del ruido en la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ al ser añadido solo en el estímulo externo que perturba el potencial de membrana.	52
6.3.	Exploración del efecto del ruido en la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ cuando se añade en las conductancias de las principales vías de calcio intracelular.	53
7.	Discusión	59
8.	Conclusión.....	63
9.	Perspectivas	64
10.	Bibliografía	65
11.	Material suplementario	69
11.1.	Ecuaciones del modelo matemático	69
11.2.	Parámetros y constantes del modelo matemático	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Flujo sanguíneo a través de las cavidades y las válvulas del corazón.....	8
Figura 1.2. Acoplamiento excitación-contracción cardiaco.	12
Figura 1.3. Posibles formas de efectos físicos fundamentales de la estimulación eléctrica en las células.	14
Figura 1.4. Técnica de fijación de voltaje (Voltage Clamp).....	17
Figura 1.5. Corrientes de membrana en respuesta a diferentes niveles de voltaje fijado	18
Figura 1.6. Analogía entre el axón gigante de calamar y un circuito eléctrico.	19
Figura 1.7. Comportamiento de la conductancia de potasio a 25 mV de adición en el potencial de membrana.	22
Figura 1.8. Aumento de la conductancia de potasio asociada con diferentes despolarizaciones.	24
Figura 1.9. Valores de αn y βn obtenidos a partir de los experimentos en axón gigante de calamar en un ambiente donde se cambió el ion de Na^+ por colina.	26
Figura 1.10. Cambios de la conductancia del sodio asociados con diferentes despolarizaciones.	28
Figura 1.11. Circuito eléctrico equivalente de la interacción de las corrientes iónicas de cardiomiocito de rata.	30
Figura 1.12. Modelo de flujos entre compartimentos.	31
Figura 2.1. Montaje del experimento de cangrejo de río.	33
Figura 2.2. Resonancia estocástica medida del espectro de potencia.	33
Figura 2.3. Series de tiempo del voltaje de membrana obtenidos por el modelo estudiado por Longtin y colaboradores.	34
Figura 2.4. Respuesta del calcio intracelular ante estímulos con y sin ruido.	35
Figura 2.5. Resonancia estocástica observada en el NSA de corazón aislado de ratón.....	36
Figura 2.6. Efecto en la $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes intensidades de ruido en el estímulo eléctrico.	37
Figura 2.7. Respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a estímulos eléctricos externos con diferentes niveles de ruido en cardiomiocitos de tejido primario de corazón de ratón.	37
Figura 5.1. Señal de estimulación.	43
Figura 5.2. Diseño experimental usando el método 2.....	48
Figura 5.3. Respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ donde se ubican los parámetros para obtener los valores analizados en los resultados experimentales.	49
Figura 6.1. Comparación entre resultados experimentales versus resultados obtenidos con este modelo.	51
Figura 6.2. Resultados obtenidos con el método 1.	52
Figura 6.3. Velocidad de subida de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ debido al método 2 experimento 1.	54
Figura 6.4. Velocidad de subida de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ debido al método 2 experimento 2.	56

Figura 6.6. Amplitud máxima de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ debido al método 2
experimento 2.58

Resumen

El fenómeno conocido como acoplamiento excitación-contracción (AEC) se refiere a la transducción de una señal eléctrica que provoca la despolarización de la membrana plasmática, generando un potencial de acción y desencadenando una serie de eventos coordinados que resultan en la contracción mecánica de la célula. En este proceso, participan diversas vías de señalización, siendo el ion de calcio (Ca^{2+}) uno de los mensajeros más importantes para regular la contracción, junto con otros procesos intracelulares igualmente relevantes. Los defectos o fallos en la dinámica de la concentración de Ca^{2+} intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en los cardiomiocitos son una de las principales causas de problemas contráctiles y arritmias.

El estudio del efecto de las modificaciones en el potencial de membrana sobre la $[Ca^{2+}]_i$ se puede denominar acoplamiento eléctrico iónico (AEI). Se ha investigado el AEI mediante el uso de diferentes fármacos, así como mediante estímulos eléctricos de diversas intensidades y frecuencias. En los últimos años, también se ha explorado la respuesta de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ a estímulos eléctricos con ruido añadido. El estudio del ruido en este contexto se debe a la alta variabilidad de los sistemas fisiológicos y a los hallazgos en células del sistema nervioso y otros tipos de células, donde se ha observado una mejora en la respuesta de ciertos procesos al añadir ruido a las señales de estimulación. En el corazón, se han identificado efectos tanto a nivel del órgano aislado como a nivel de las células excitables del cardiomiocito. En este último modelo, se ha observado que pequeños aumentos en el porcentaje de ruido añadido al estímulo eléctrico provocan incrementos en la velocidad de aumento de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ y en su concentración máxima intracelular.

Después de observar los efectos del ruido en el AEI en los cardiomiocitos, surge la pregunta sobre el mecanismo mediante el cual el ruido genera los resultados experimentales observados, teniendo en cuenta los mecanismos involucrados en el proceso mencionado. Para abordar esta cuestión, se propone un modelo matemático que describe en detalle la generación y el mantenimiento del potencial de acción, así como la dinámica de los flujos de Ca^{2+} entre los diferentes compartimentos intracelulares. Se plantean dos conjuntos de experimentos: en el primero, se añade ruido al estímulo que desencadena el potencial de acción, y en el segundo, se añade ruido a las proteínas por donde viaja el Ca^{2+} entre compartimentos de forma individual y localizada.

Los resultados revelaron que añadir ruido solo al estímulo eléctrico que desencadena el potencial de acción no fue suficiente para obtener los efectos experimentales observados en el Ca^{2+} intracelular. No obstante, al considerar que el ruido afecta a la célula en su totalidad y dirigir esa perturbación hacia cada una de las vías de calcio a la vez, fue posible lograr un resultado comparable a los registros experimentales en términos de la velocidad de incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ al introducir variabilidad exclusivamente en la conductancia de los canales de calcio dependientes del voltaje de la membrana plasmática. Estos descubrimientos proporcionan una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes en el

acoplamiento excitación-contracción y pueden tener implicaciones importantes en el desarrollo de terapias para tratar problemas contráctiles y arritmias cardíacas.

Abstract

The phenomenon known as excitation-contraction coupling (ECC) refers to the transduction of an electrical signal that induces depolarization of the plasma membrane, generating an action potential and triggering a series of coordinated events that result in mechanical cell contraction. This process involves multiple signaling pathways, with calcium ion (Ca^{2+}) being one of the most important messengers for regulating contraction, along with other equally relevant intracellular processes. Defects or dysfunctions in the dynamics of intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in cardiomyocytes are among the leading causes of contractile problems and arrhythmias.

The study of the effect of membrane potential modifications on $[Ca^{2+}]_i$ can be referred to as ionic electrical coupling (IEC). IEC has been investigated using different drugs, as well as electrical stimuli of various intensities and frequencies. In recent years, the response of intracellular calcium to electrical stimuli with added noise has also been explored. The presence of noise in this context is due to the high variability of physiological systems and findings in nervous system cells and other cell types, where an improvement in the response of certain processes has been observed by adding noise to stimulation signals. In the heart, effects have been identified at both the isolated organ level and the level of excitable cardiomyocyte cells. In the latter model, it has been observed that small increases in the percentage of added noise to the electrical stimulus led to higher rates of calcium increase and its maximum intracellular concentration.

After observing the effects of noise on IEC in cardiomyocytes, the question arises regarding the mechanism through which noise generates the observed experimental results, considering the mechanisms involved in the process. To address this question, a detailed mathematical model is proposed, describing the generation and maintenance of action potentials, as well as the dynamics of calcium fluxes among different intracellular compartments. Two sets of experiments are proposed: in the first set, noise is added to the stimulus triggering the action potential, while in the second set, noise is added to calcium transport proteins between compartments individually and in a localized manner.

The results revealed that adding noise solely to the electrical stimulus triggering the action potential was not sufficient to achieve the observed experimental effects on intracellular calcium. However, considering that noise affects the cell as a whole and directing this perturbation towards a single calcium transport protein at a time, it was possible to obtain a result comparable to the experimental traces in terms of the rate of intracellular calcium increase by introducing variability exclusively in the conductance of voltage-dependent calcium channels. These findings provide a deeper understanding of the underlying mechanisms in excitation-contraction coupling and may have significant implications for the development of therapies to address contractile problems and cardiac arrhythmias.

1. Introducción

Desde los organismos unicelulares hasta los organismos pluricelulares como el ser humano, están compuestos por células que al agruparse forman sistemas y a su vez a un sistema más complejo. Todo el ambiente en el que ocurren tanto los procesos intracelulares, como la interacción célula a célula es un ambiente altamente variable debido a la naturaleza no determinista de todos estos sistemas; por ejemplo, procesos celulares como transcripción y traducción son fuentes estocásticas que dan como resultado variabilidad entre una célula y otra (Raj & van Oudenaarden, 2008). Sin embargo, a pesar de la variabilidad tanto interna como externa, todos los procesos funcionan de tal manera que la célula cumple su función en un órgano y un órgano cumple su función en un organismo y de este modo seguimos evolucionando inmersos en toda esta variabilidad. Es por esto por lo que surgió hace varios años la pregunta de si esta variabilidad era solo algo con lo que todos estos procesos viven o si por el contrario es usada por estos procesos en su funcionamiento. Se han hecho muchos estudios a muchos niveles tanto para demostrar la presencia de esta variabilidad, como para observar cómo la misma afecta a los sistemas, tanto intra como extracelulares. Además, debido a las amplias observaciones realizadas en la interacción entre el sistema nervioso y estímulos ruidosos y que a su vez el sistema nervioso inerva todos los otros sistemas de un organismo, se han empezado a ampliar estos estudios hacia la respuesta al ruido por parte de los órganos efectores.

En este trabajo se explora el efecto del ruido en la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ en cardiomiocitos de rata, debido a los hallazgos experimentales tanto en cardiomiocito de ratón, en cardiomiocitos de línea celular de rata (Ramírez Hurtado et al., 2020) e incluso en corazón aislado de ratón (Peña-Romo et al., 2016), donde se ha observado que el ruido genera ciertos efectos tanto mejoramiento en la sincronización en el corazón completo, como modificaciones en la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ en los cardiomiocitos, específicamente en la velocidad de ingreso de calcio al medio intracelular como en la concentración máxima de calcio. Por lo tanto, se plantea un modelo matemático que captura el detalle de la generación y mantenimiento del potencial de acción en un cardiomiocito en conjunto con la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$, con el fin de estudiar el efecto del ruido en AEI y de esta manera poder encontrar

si el ruido afecta solamente el potencial de membrana y que el efecto observado sea debido a la sensibilidad al potencial membranal por parte de las proteínas transmembranales o si el ruido directamente afecta una o varias proteínas responsables del flujo de calcio entre los diferentes compartimentos intracelulares.

En el capítulo 1 se realizan las definiciones necesarias de los temas que se abordan en este trabajo, desde el ruido en sistemas biológicos, el comportamiento cardíaco y algunos fenómenos que lo componen, hasta bases del modelado matemático de las células excitables. En el capítulo 2 se describen los trabajos que dieron razón de ser a este proyecto. Capítulos 3, 4 y 5 abordan la hipótesis, objetivos y metodología pertinente para responder a la pregunta de investigación. Y en los capítulos 6 y 7 se muestran los resultados y su respectiva discusión. Finalizando con conclusión y perspectivas en los capítulos 8 y 9 respectivamente.

1.1.Ruido en biología

El ruido es un fenómeno que está presente en diversos tipos de sistemas, desde los sistemas electrónicos, hasta la fisiología.

Por mucho tiempo se vio el ruido como algo indeseable que perturbaba las señales, tanto por parte de los instrumentos de medida a la hora de cuantificarlas, como en el comportamiento del sistema bajo estudio. Sin embargo, a finales del 1900 se empezó a observar un fenómeno conocido como resonancia estocástica la cual surge cuando el ruido, bajo ciertas circunstancias, mejora en lugar de obstaculizar el desempeño de algunos dispositivos (Kara et al., 2000).

La presencia de resonancia estocástica se puede detectar en sistemas no lineales, siendo comúnmente esencial en sistemas fisiológicos donde las no linealidades son comunes y con frecuencia son necesarias para abordar aspectos cruciales de la función fisiológica (Marmarelis, 1997). El efecto de la resonancia estocástica se ha investigado extensamente en el sistema nervioso. Se ha observado que la adición de ciertos niveles de ruido a la señal que estimula a una neurona mejora su respuesta al aumentar la capacidad de detectar señales de estimulación débiles. (Faisal et al., 2008; Shu et al., 2003). En otras palabras, cuando los niveles de ruido son bajos, la señal de estimulación no es lo suficientemente fuerte para hacer que las neuronas superen el umbral de activación y se genere un potencial de acción; para niveles de ruido mas altos, la respuesta es dominada por el mismo, sin haber sincronía entre el estímulo externo y la respuesta de la neurona; sin embargo, para niveles de ruido intermedios, el ruido le permite a la señal externa alcanzar el umbral de activación solo en los estados altos y de esta manera sincronizar la respuesta de la neurona con la frecuencia de la señal externa.

Se han llevado a cabo numerosos estudios, tanto teóricos como experimentales, sobre el efecto de la resonancia estocástica en el sistema nervioso (Kara et al., 2000; Shu et al., 2003; Warzecha & Egelhaaf, 1999). Además, dado que el sistema nervioso se encuentra conectado con los órganos efectores, también se han investigado los efectos del ruido en estos, incluyendo en las células de músculo esquelético (Bosutti et al., 2019) e incluso en el

corazón a diferentes niveles (órgano completo y cardiomiocito) (Peña-Romo et al., 2016; Ramírez Hurtado et al., 2020). Donde a nivel de corazón aislado de ratón se observó un aumento en la sincronización entre el estímulo externo y la frecuencia de contracción al añadir ruido en la señal de estimulación en alrededor de un 10% de su amplitud; mientras que en el caso de los cardiomiocitos, la adición de ciertos niveles de ruido en el campo eléctrico con el que se estimularon, generó modificaciones en algunos parámetros de la señal del ion de calcio intracelular.

Desde la perspectiva de modelado matemático el ruido se ha estudiado en los sistemas fisiológicos en un amplio rango de niveles, desde reacciones moleculares (donde una de las herramientas usadas ha sido el algoritmo de Gillespie (Gillespie, 1977)), pasando por vías de señalización (Ladbury & Arold, 2012); e incluso a nivel mesoscópico añadiendo el ruido en las conductancias de las proteínas usando modelos tipo hodking-huxley (Steinmetz et al., 2000); Desde una perspectiva experimental, se ha estudiado a nivel celular (Douglass et al., 1993; Ramírez Hurtado et al., 2020), y a nivel de órgano completo (Peña-Romo et al., 2016). En todos estos casos se han usado diferentes tipos de ruido, teniendo en cuenta diferentes análisis, por ejemplo, (Shahrezaei et al., 2008) asumen que el ruido sigue una distribución log-normal; sin embargo, es importante notar que se decantan por esta distribución debido a que están usando ruido extrínseco el cual particularmente a ese trabajo, relacionan con la tasa de transcripción de unas proteínas que afectan el proceso particular bajo estudio.

El ruido intrínseco y el ruido extrínseco son dos tipos de ruido que se encuentran en sistemas dinámicos. El ruido intrínseco se refiere al ruido que surge de los propios componentes del sistema y de su interacción, mientras que el ruido extrínseco se refiere al ruido que proviene de factores externos al sistema.

El ruido intrínseco es considerado una característica inherente al sistema, siendo generado por la variabilidad en los procesos bioquímicos y fisiológicos que ocurren en su interior. Además, el ruido intrínseco puede ser amplificado o atenuado por las interacciones entre los componentes internos y puede contribuir a la variabilidad y heterogeneidad observada en muchos sistemas biológicos. En contraste, el ruido extrínseco se origina por factores externos, como el ruido ambiental, la variación en las condiciones externas y otros factores que no están relacionados con su dinámica.

Además de la distinción entre los dos tipos de ruido, se puede considerar al ruido en sí mismo como una señal que se destaca por su carácter aleatorio, lo que significa que no sigue un patrón o estructura definida. Algunas de las propiedades del ruido incluyen:

- **Amplitud:** El ruido puede tener diferentes niveles de amplitud, que se miden en decibelios (dB) o en otras unidades de medida.
- **Frecuencia:** El ruido puede tener diferentes frecuencias, que se miden en Hertz (Hz). La frecuencia del ruido puede estar dentro de un rango de frecuencias determinado o puede ser de banda ancha.
- **Distribución:** El ruido puede tener diferentes distribuciones estadísticas, que se utilizan para describir la probabilidad de que la señal tenga un determinado valor. Las distribuciones más comunes para el ruido son la distribución normal y la distribución uniforme.
- **Correlación:** El ruido puede tener diferentes niveles de correlación, que se refieren a la relación entre los valores de la señal en diferentes momentos. El ruido no correlacionado o "blanco" tiene una correlación nula, mientras que el ruido correlacionado tiene una correlación no nula.
- **Espectro:** El espectro del ruido describe cómo se distribuyen las diferentes frecuencias en la señal. El espectro puede ser de banda ancha o de banda estrecha, y puede tener diferentes formas dependiendo del tipo de ruido.

Estas propiedades del ruido son importantes en muchos campos, incluyendo la electrónica, la ingeniería, la física y la biología. El ruido es una fuente común de variabilidad en muchas mediciones y puede ser importante para comprender la dinámica de los sistemas complejos. Así pues, a la hora de seleccionar el ruido a usar para el estudio tanto teórico como experimental hay que tener particular cuidado en el tipo de ruido a modelar y la fuente de este para así definir las propiedades va a tener.

Por otra parte, el ruido también puede agruparse como ruido aditivo y multiplicativo: y su principal diferencia radica en cómo afectan las fluctuaciones aleatorias a la señal o el proceso biológico en cuestión, el ruido aditivo afecta de manera constante e igual a la señal

en todos los niveles, mientras que el ruido multiplicativo introduce fluctuaciones aleatorias proporcionales a la señal o el proceso en sí (Muñoz, 2004).

1.2. Corazón

El corazón es el órgano principal del sistema cardiovascular y uno de los más importantes en el cuerpo humano y de otros seres vivos, el cual se encarga de bombear la sangre a través del aparato circulatorio. Está situado en la cavidad torácica, detrás del esternón y entre los pulmones. El corazón está formado por cuatro cavidades: dos aurículas y dos ventrículos. Las aurículas son las dos cámaras superiores del corazón, que reciben la sangre que llega desde las venas. Los ventrículos son las dos cámaras inferiores del corazón, que se encargan de bombear la sangre hacia las arterias. La pared del ventrículo izquierdo es más gruesa y musculosa que la del ventrículo derecho, ya que el ventrículo izquierdo tiene que bombear la sangre hacia todo el cuerpo, mientras que el ventrículo derecho solo la bombea hacia los pulmones (Hall & Guyton, 2021).

1.2.1 Funcionamiento del corazón

1.2.1.1 Como bomba.

La labor fundamental del corazón consiste en realizar contracciones coordinadas y regulares para elevar la presión en sus cámaras y, de esta manera, enviar una cantidad adecuada de sangre oxigenada que es esencial para el correcto funcionamiento metabólico de los tejidos. El corazón funciona como una bomba gracias a la coordinación de las contracciones y relajaciones de sus cámaras (aurículas y ventrículos) y el papel que desempeñan las válvulas auriculoventriculares (AV) y semilunares para regular el flujo de sangre en su interior. Esta regulación de la sangre se refleja en variaciones de la presión, el flujo y el volumen durante cada ciclo cardíaco (figura 1.1) (Hall & Guyton, 2021).

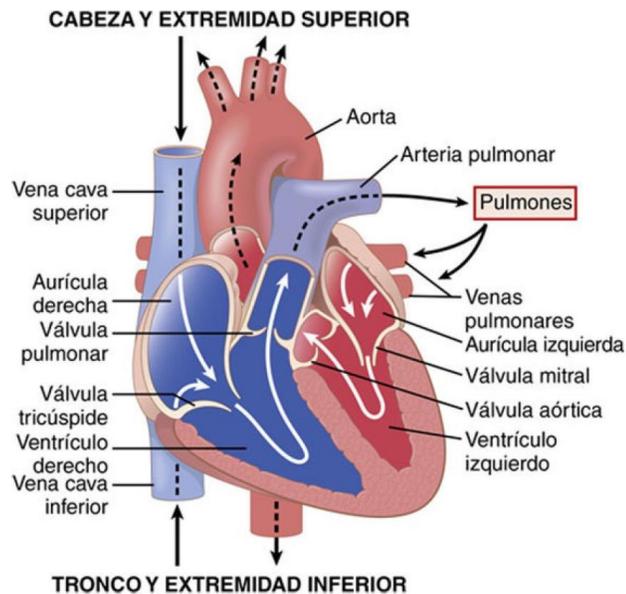


Figura 1.1. Flujo sanguíneo a través de las cavidades y las válvulas del corazón.
Tomado de (Hall & Guyton, 2021)

1.2.1.1.1 Ciclo cardiaco.

Durante cada latido cardíaco, ocurre una serie de eventos eléctricos y mecánicos en las cámaras auriculares y ventriculares del corazón, que se combinan para formar lo que se conoce como el ciclo cardíaco. Este ciclo se caracteriza por cambios en la presión, el flujo y el volumen de sangre en estas cavidades. El ciclo cardíaco consta de dos fases bien diferenciadas: la diástole, en la que las cavidades cardíacas se relajan y se llenan de sangre, y la sístole, en la que se produce la contracción de las aurículas y ventrículos del corazón, lo que permite la expulsión de la sangre hacia la circulación pulmonar y sistémica, respectivamente. De todas maneras, es importante tener presente que el movimiento de la sangre a través de las cavidades del corazón es dirigido por los cambios de presión, los cuales impulsan el flujo desde las áreas de alta presión hacia aquellas de menor presión.

Debido a lo anterior, es evidente que debe haber un control preciso que mantenga el comportamiento rítmico descrito y esto es logrado a través del sistema de conducción cardíaco, el cual está compuesto por células especializadas en mantener y conducir el potencial de acción iniciado en el Nodo Sinoauricular (NSA). El sistema de conducción cardíaco está constituido por diversas estructuras, tales como:

- NSA: es el principal marcapasos cardiaco, se encuentra situado en la aurícula derecha y es el responsable de iniciar el impulso eléctrico que genera el latido del corazón.
- Nodo auriculoventricular (NAV): se encuentra situado en la pared que separa las aurículas y los ventrículos, este nodo retrasa brevemente la propagación del impulso eléctrico antes de enviarlo a los ventrículos.
- Haz de His: es un conjunto de fibras musculares que se extienden desde el NAV hacia los ventrículos.
- Ramas de haz de His: estas ramas conducen el impulso eléctrico desde el haz de His hasta las fibras musculares de los ventrículos.
- Fibras de Purkinje: son las últimas células que reciben el impulso eléctrico y se encargan de coordinar la contracción del músculo de los ventrículos.

En conjunto, estos elementos forman un sistema de conducción eléctrica que permite que el corazón se contraiga de forma coordinada y eficiente, lo que asegura el bombeo adecuado de la sangre por todo el cuerpo. Cualquier disfunción en este sistema puede provocar arritmias y otros trastornos del ritmo cardiaco. Las células que conforman el sistema de conducción cardiaco son autoexcitables, mientras que las células que conforman el músculo auricular y ventricular son excitables y se encuentran en estado latente.

1.2.1.2 El potencial de acción.

Cuando una célula de músculo cardíaco es estimulada eléctricamente, se genera un potencial de acción. Este fenómeno se refiere a un cambio en el potencial eléctrico de la membrana celular, que ocurre como resultado del flujo de iones que entran y salen a través de los canales iónicos presentes en dicha membrana. El potencial de acción cardiaco es esencial para la contracción del músculo cardíaco y para el mantenimiento del ritmo cardíaco normal.

El potencial de acción cardíaco consta de varias fases, cada una de las cuales se corresponde con cambios específicos en el flujo de iones a través de la membrana celular. Estas fases incluyen:

- Fase 0: En esta fase, se produce una rápida entrada de iones de sodio (Na^+) a través de los canales iónicos de la membrana celular. Esto provoca una despolarización rápida y la generación de un potencial de acción rápido.
- Fase 1: En esta fase, hay una rápida repolarización causada por la salida de iones de potasio (K^+) y la inactivación de los canales de sodio.
- Fase 2: Esta fase se conoce como la meseta del potencial de acción, que es causada por una entrada de calcio (Ca^{2+}) a través de los canales iónicos de la membrana celular. Esta entrada de calcio es compensada por una salida de K^+ , lo que mantiene el potencial de acción en un nivel constante.
- Fase 3: En esta fase, hay una rápida repolarización causada por la salida de K^+ debido a la activación de canales iónicos de potasio.
- Fase 4: En esta fase, la célula se encuentra en reposo y el potencial de membrana se mantiene estable hasta que se produce el siguiente potencial de acción.

Además de las fases mencionadas anteriormente, el potencial de acción cardíaco también incluye un período refractario, durante el cual la célula no puede ser estimulada para generar otro potencial de acción. Este período refractario es importante para asegurar una contracción efectiva y coordinada del músculo cardíaco.

El proceso de generación del potencial de acción cardíaco está regulado por una serie de factores, como la actividad eléctrica de las células del sistema de conducción del corazón, la concentración de iones en el líquido extracelular y la actividad hormonal. Estos factores pueden influir en la frecuencia y la regularidad del ritmo cardíaco, lo que puede tener un impacto en la salud cardiovascular.

1.2.1.3 Acoplamiento excitación-contracción.

El acoplamiento excitación-contracción (AEC) es el proceso por el cual la estimulación eléctrica de las células musculares del corazón (excitación) se traduce en la contracción del músculo cardíaco. En otras palabras, es el proceso que convierte la señal eléctrica en una respuesta mecánica.

El AEC se produce en el retículo sarcoplásmico, una red de túbulos y vesículas membranosas que se encuentra dentro del músculo cardíaco. Cuando una célula muscular cardíaca es estimulada eléctricamente, se produce una liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma de la célula. La concentración elevada de Ca^{2+} en el citoplasma desencadena una serie de eventos bioquímicos que finalmente conducen a la contracción del músculo cardíaco (Bers, 2001). El AEC sucede de la siguiente forma:

- Inicia luego de que por un estímulo externo se dispara el potencial de acción (curva negra figura 1.2a).
- Este suceso genera una elevación en el potencial de membrana pasando por los niveles a los cuales los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L ($Ca^{2+}_{V,L}$) cambian su conformación, entrando en estado abierto y dejando fluir Ca^{2+} al medio intracelular. En este punto empieza a aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ (curva azul figura 1.2A).
- Este aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ sensibiliza los canales de receptor de rianodina (RyR) los cuales ante el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ se activan dejando salir grandes cantidades de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (este fenómeno se conoce como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} CICR por sus siglas en inglés). De este modo aumenta al máximo la $[Ca^{2+}]_i$.
- Este aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ promueve la interacción entre la actina y la miosina debido a la interacción del Ca^{2+} con la troponina C; y esta interacción entre actina y miosina genera la contracción del cardiomiocito (curva roja figura 1.2A).
- Posteriormente, el Ca^{2+} es removido del citoplasma a través de la bomba SERCA que lo recaptura hacia el retículo y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX) que lo saca al medio extracelular.

Cabe aclarar, que existen más vías de remoción de Ca^{2+} del citoplasma, como lo son la bomba de Ca^{2+} de la membrana y la bomba de Ca^{2+} de la mitocondria, sin embargo, debido a su poca participación en la remoción total de Ca^{2+} (Rosana Bassani et al., 1992) se tienen como vías principales de salida solo a SERCA y a NCX. Así pues, podemos decir que las vías principales por las que entra y sale Ca^{2+} en todo este proceso son $Ca^{2+}_{v,L}$ y RyR como vías de ingreso y SERCA y NCX como vías de remoción.

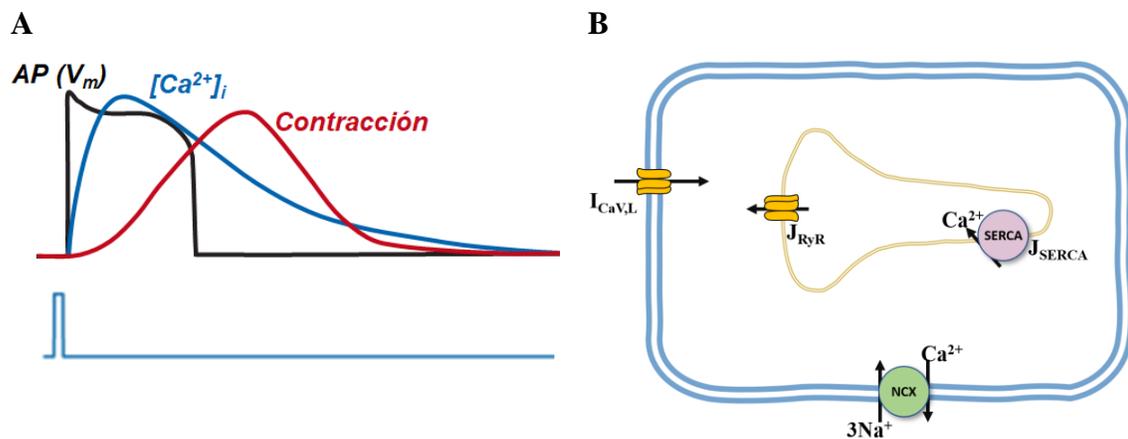


Figura 1.2. Acoplamiento excitación-contracción cardiaco. A. relación entre el potencial de acción debido a un estímulo externo (curva negra), dinámica de Ca^{2+} intracelular (curva azul) y contracción del cardiomiocito (curva roja); B. representación de los flujos principales de Ca^{2+} en un cardiomiocito.

1.2.2 Estimulación eléctrica de las células

La estimulación eléctrica en cultivos celulares es una técnica que se utiliza para estudiar la respuesta de las células a la estimulación eléctrica en un entorno controlado. Esta técnica puede ser útil en una amplia variedad de áreas, incluyendo la neurociencia, la ingeniería tisular y la medicina regenerativa. Para llevar a cabo la estimulación eléctrica en cultivos celulares, se utiliza un dispositivo llamado estimulador eléctrico. Este dispositivo aplica un campo eléctrico a las células en el cultivo, lo que puede activar o desactivar ciertas vías de señalización celular y provocar cambios en la actividad de las células. La estimulación

eléctrica puede utilizarse para estudiar cómo las células responden a diferentes tipos de estímulos eléctricos, como pulsos eléctricos cortos o largos, corrientes eléctricas continuas o intermitentes, o campos eléctricos alternantes.

Además de estudiar la respuesta de las células a la estimulación eléctrica, esta técnica también se puede utilizar para promover el crecimiento y la diferenciación celular en la ingeniería tisular y la medicina regenerativa. Por ejemplo, la estimulación eléctrica puede ayudar a orientar el crecimiento de las células y los tejidos en la dirección deseada, lo que puede mejorar la funcionalidad de los tejidos regenerados.

La aplicación de corriente eléctrica es una modalidad de estimulación física que no implica la necesidad de procedimientos invasivos o el uso de sustancias farmacológicas. Se ha comprobado que su impacto en la biomedicina es amplio, tal como se ilustra en la figura 1.3. (Zhao et al., 2020). En el ámbito molecular, la aplicación de corriente eléctrica puede facilitar el transporte de biomoléculas con carga y sin ella a través de membranas biológicas, mediante procesos conocidos como electroforesis y electroósmosis, los cuales se denominan colectivamente como iontoforesis (Gratieri et al., 2017). A nivel celular, la aplicación de esta técnica de estimulación puede interactuar con diversos elementos celulares, tales como los canales iónicos, proteínas asociadas a la membrana, estructuras del citoesqueleto y organelos intracelulares (Balint et al., 2013). Tales interacciones pueden modificar las actividades y funciones celulares, como la contracción, la migración, la orientación y la proliferación, entre otros.

Aún hay mucha investigación alrededor de los mecanismos fundamentales responsables de las respuestas celulares mencionadas debido a estimulación eléctrica. Entre los posibles efectos físicos se encuentra:

- Ruptura del agua estructural.
- Flujo de fluido electroosmótico.
- Flujo iónico asimétrico y apertura de canales dependientes de voltaje.
- Mecanosensación.
- Redistribución de componentes de membrana y balsas lipídicas.

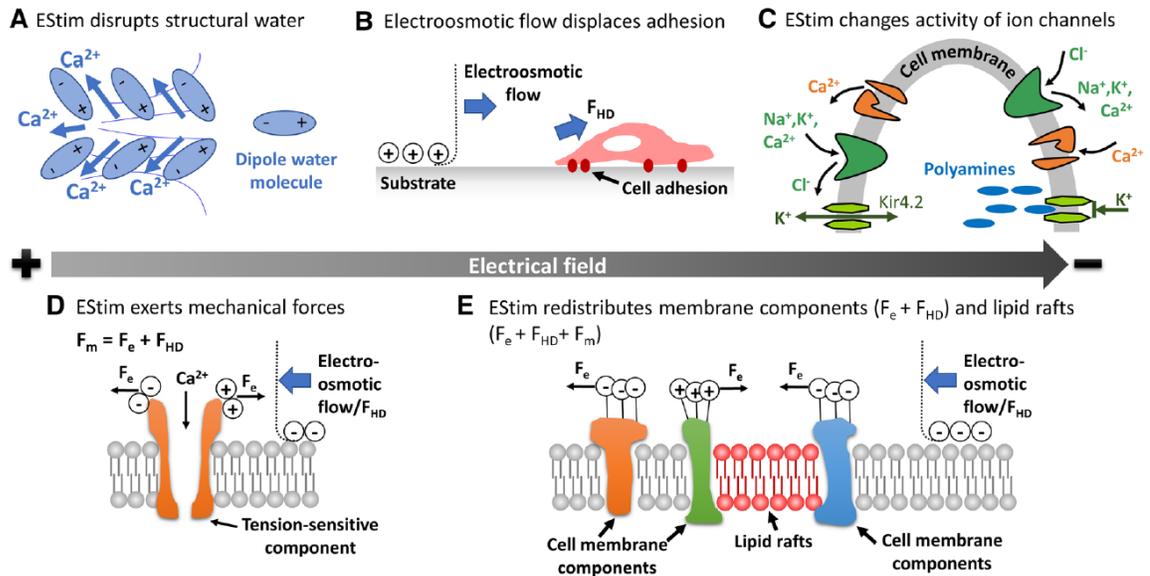


Figura 1.3. Posibles formas de efectos físicos fundamentales de la estimulación eléctrica en las células. **A.** Un campo eléctrico puede romper la capa de agua estructurada y de este modo generar una onda de calcio. **B.** Puede inducir electroósmosis lo cual también puede producir fuerzas que actúan sobre la superficie de la membrana generando desplazamiento de las adhesiones lateralmente. **C.** La polarización de la célula por un campo eléctrico puede reordenar los iones en las caras intra y extracelulares de la membrana modulando el potencial de acción en diferentes zonas y de esta manera puede cambiar la apertura/cierre de los canales iónicos dependientes del voltaje. **D.** Las fuerzas electroosmóticas (F_{HD}) pueden combinarse con las fuerzas electrostáticas (F_e) en macromoléculas cargadas y componentes de membrana y producir fuerzas mecánicas (F_m) y de este modo activar proteínas mecano sensibles. **E.** Las fuerzas electroosmóticas locales (F_{HD}) y electrostáticas (F_e) en la membrana celular también pueden empujar otros componentes de la membrana. Los componentes cargados negativamente se moverán hacia el ánodo, y los componentes cargados positivamente migrarán hacia el cátodo. Dependiendo de la carga superficial neta que posean las proteínas de la célula, serán empujadas hacia un lado de la célula u otro por las fuerzas electroosmóticas en la membrana. De manera similar, las tres fuerzas, electroosmótica (F_{HD}), electrostática (F_e) y trabajo mecánico (F_m) se suman para arrastrar las balsas lipídicas hacia el cátodo. Tomado de (Zhao et al., 2020).

1.2.2.1 Efectos físicos fundamentales de estimular eléctricamente las células.

El campo eléctrico es una propiedad física asociada a la presencia de cargas eléctricas en el espacio. Se define como la fuerza eléctrica por unidad de carga que actúa sobre una carga de prueba en un punto determinado del espacio. Matemáticamente, se expresa como $E = F/Q$, donde E es el campo eléctrico, F es la fuerza eléctrica y Q es la carga de prueba. El campo eléctrico se mide en unidades de newton por culombio (N/C) o voltios por metro

(V/m) en el sistema internacional de unidades (SI). El campo eléctrico es un vector, lo que significa que tiene magnitud y dirección. La dirección del campo eléctrico en un punto dado está determinada por la dirección de la fuerza eléctrica sobre una carga de prueba positiva colocada en ese punto.

El efecto del campo eléctrico en las células depende de la intensidad, duración y frecuencia del campo eléctrico aplicado. A bajas intensidades, los campos eléctricos pueden tener efectos mínimos o nulos en las células, mientras que, a intensidades más altas pueden causar cambios en la estructura y función celular.

En general, los campos eléctricos pueden afectar la polarización de las membranas celulares, la permeabilidad iónica, la migración celular, la división celular y la expresión génica. Por ejemplo, los campos eléctricos pueden inducir una migración direccional de células, un fenómeno conocido como galvanotaxis o electrotaxis (Babona-Pilipos et al., 2015), que es importante en procesos de cicatrización de heridas y regeneración tisular. Los campos eléctricos también pueden afectar la proliferación celular (Love et al., 2018), lo que puede ser útil en aplicaciones terapéuticas para controlar el crecimiento de células cancerosas.

1.2.3 Modelos matemáticos de cardiomiocito

Un modelo matemático es una representación abstracta de un sistema o fenómeno real utilizando herramientas matemáticas para describir, analizar o predecir su comportamiento. En otras palabras, un modelo matemático es una expresión matemática que representa las relaciones entre las variables que caracterizan el sistema o fenómeno en cuestión. Puede ser utilizado para estudiar y comprender el comportamiento de sistemas complejos en diferentes áreas, como la física, la biología, la ingeniería, la economía, entre otras. Por ejemplo, en la física, los modelos matemáticos se utilizan para describir el movimiento de objetos en el espacio, la propagación de ondas electromagnéticas y acústicas, entre otros fenómenos.

La construcción de un modelo matemático implica la identificación de las variables importantes del sistema o fenómeno, su relación matemática y la validación del modelo

mediante la comparación de los resultados obtenidos a través del modelo con los datos experimentales o de observación del fenómeno real. Un modelo matemático puede ser utilizado para hacer predicciones y tomar decisiones basadas en el conocimiento que proporciona el modelo; Y la especificidad y complejidad del modelo depende del tipo de pregunta de investigación que se tenga; así pues, para modelos de sistemas biológicos se puede representar desde el comportamiento molecular de un proceso, hasta la interacción entre poblaciones.

Durante los años 60, el aumento de los datos experimentales disponibles permitió que el número de modelos matemáticos de cardiomiocitos creciera significativamente y se volviera más complejo. Sin embargo, los registros de modelos matemáticos se remontan a 1929, cuando Van der Pol y Van der Mark construyeron el primer modelo matemático del latido cardiaco a partir de osciladores de relajación (Van der Pol & Van der Mark, 1929). Se utilizó este estudio como base para desarrollar modelos de células con pocas ecuaciones y variables. Estos modelos consideraron umbrales de activación, periodos refractarios, excitabilidad y otros factores. Uno de los modelos más comunes es el modelo de FitzHugh-Nagumo (FitzHugh, 1961; Nagumo et al., 1962), que se originó a partir de la observación de Richard FitzHugh sobre la relación entre el modelo de Hodgkin y Huxley de 1952 (Hodgkin & Huxley, 1952) y el modelo de Van der Pol de 1926 (van der Pol, 1926).

1.2.3.1 Modelo de Hodgkin y Huxley.

Alan Hodgkin y Andrew Huxley desarrollaron el modelo de Hodgkin-Huxley (Hodgkin & Huxley, 1952) a partir de los experimentos en axones gigantes de calamar. Utilizando la técnica de fijación de voltaje (voltage clamp) (Hodgkin et al., 1952) y analizando la célula como un circuito RC, propusieron un sistema de ecuaciones diferenciales no lineales que consideran las corrientes iónicas de los canales de Na^+ y K^+ , y su dependencia del potencial de membrana.

1.2.3.1.1 Voltage clamp.

En términos generales, este método posibilita la medición del flujo de iones a través de una membrana celular en forma de corriente eléctrica, al mismo tiempo que se mantiene

el voltaje de la membrana bajo control experimental mediante un amplificador de retroalimentación. Para lograrlo, se sigue la configuración que se describe en la figura 1.4.

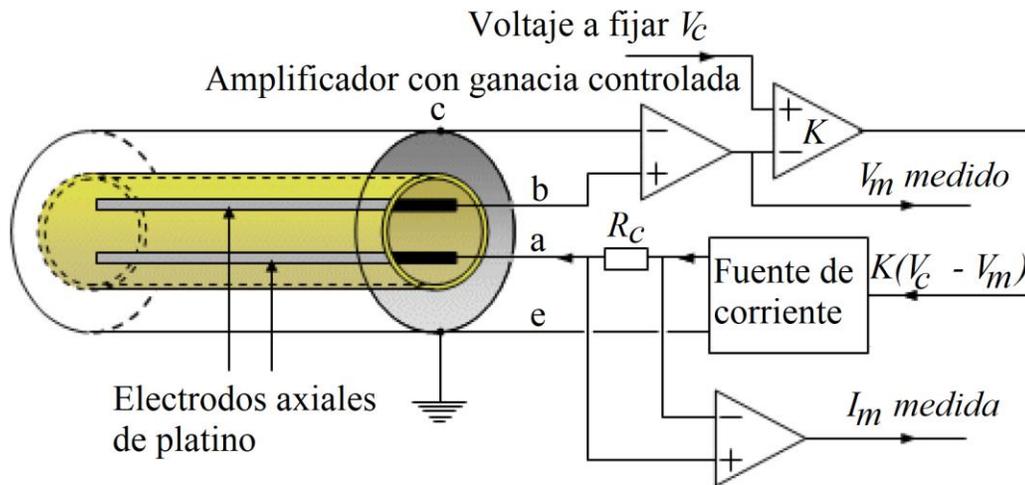


Figura 1.4. Técnica de fijación de voltaje (Voltage Clamp). La corriente se aplica a través de los electrodos a y b y a su vez el potencial de membrana es medido mediante los electrodos b y c. La fuente de corriente es controlada para mantener el potencial de membrana en el valor deseado V_c . Traducido de (Malmivuo & Plonsey, 1995).

La técnica de voltage clamp es útil por dos motivos: en primer lugar, permite separar las corrientes iónicas y capacitivas de la membrana; en segundo lugar, resulta más sencillo obtener información sobre el comportamiento del canal al medir las corrientes en una región de la membrana con un voltaje uniforme y controlado, en comparación con situaciones donde el voltaje varía libremente en el tiempo y entre distintas zonas de la membrana. Esta ventaja es especialmente relevante para el estudio de la apertura y cierre de los canales iónicos dependientes de voltaje, ya que estos procesos están influenciados por el potencial de membrana.

La técnica mencionada se utiliza para medir corrientes en células completas o áreas amplias de membrana que contienen al menos unos pocos cientos de canales. Estas corrientes suelen denominarse corrientes macroscópicas. Como se muestra en la Figura 1.4, se utiliza un electrodo para medir la diferencia de potencial entre el medio intracelular y extracelular. Luego, esta señal se amplifica y se somete a un amplificador operacional en modo

comparador que compara la señal de potencial de membrana medida con un voltaje de referencia externo ajustable. La corriente de salida del amplificador comparador se mide y se inyecta en la célula a través de un segundo electrodo.

Al aumentar el voltaje de referencia de la membrana, se inyecta una corriente que es proporcional a la diferencia entre el voltaje de referencia y el voltaje de membrana. Esta corriente se mide y se analiza su comportamiento temporal para cada incremento en el voltaje de referencia, lo que produce gráficos como los que se muestran en la Figura 1.5.

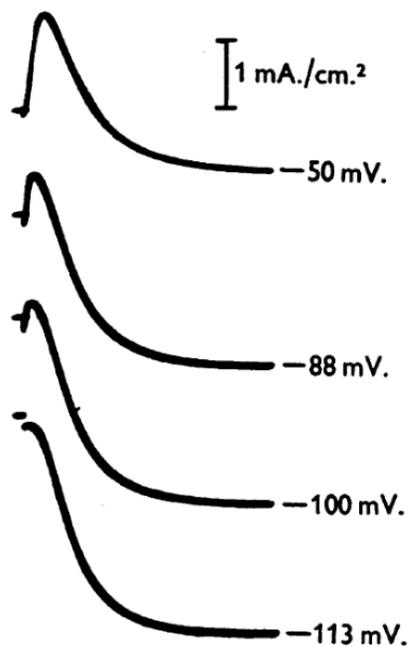


Figura 1.5. Corrientes de membrana en respuesta a diferentes niveles de voltaje fijado. (Hodgkin et al., 1952)

1.2.3.1.2 Construcción del modelo de Hodgkin y Huxley

El trabajo experimental de Hodgkin y Huxley sugirió que el comportamiento eléctrico de la membrana celular podría ser representado por el circuito que se muestra en la Figura 1.6. La corriente puede ser transportada a través de la membrana mediante la carga de la capacitancia de la membrana o mediante el movimiento de iones a través de las resistencias que se encuentran en paralelo con la capacitancia. La corriente iónica se divide en dos componentes: la generada por los iones de sodio y la generada por los iones de potasio (I_{Na}

e I_K), y una pequeña corriente de fuga (I_l) compuesta por iones de cloro y otros. Cada componente de la corriente iónica es definido por una fuerza impulsora, que puede ser medida como una diferencia de potencial eléctrico, y un coeficiente de permeabilidad que se expresa en términos de conductancia.

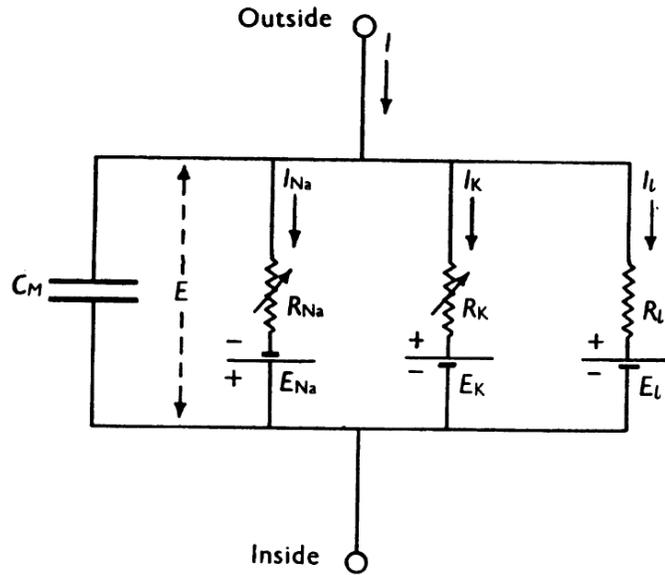


Figura 1.6. Analogía entre el axón gigante de calamar y un circuito eléctrico. Donde $R_{Na} = 1/g_{Na}$, $R_K = 1/g_K$ y $R_l = 1/\bar{g}_l$. Las resistencias R_{Na} y R_K son variables en el tiempo y dependientes del potencial de membrana y los otros elementos del circuito son constantes. (Hodgkin & Huxley, 1952)

Así, la corriente de sodio (I_{Na}) es igual a la conductancia del sodio (g_{Na}) multiplicada por la diferencia entre el potencial de membrana (E_m) y el potencial de equilibrio para el ion de sodio (E_{Na}) (ecuación 1.1). Ecuaciones similares aplican para la corriente de potasio (I_K) y la corriente de fuga (I_l) (ecuaciones 1.2 y 1.3).

$$I_{Na} = g_{Na} (E_m - E_{Na}) \quad (1.1)$$

$$I_K = g_K (E_m - E_K) \quad (1.2)$$

$$I_l = \bar{g}_l (E_m - E_l) \quad (1.3)$$

Los experimentos realizados sugieren que g_{Na} y g_K varían en función del tiempo y el potencial de membrana, mientras que E_{Na} , E_K , E_l , C_m y \bar{g}_l pueden considerarse constantes. La influencia del potencial de membrana en la permeabilidad se puede resumir en dos aspectos: en primer lugar, la despolarización produce un aumento transitorio en la conductancia del sodio y un aumento sostenido pero menor en la conductancia del potasio; en segundo lugar, estos cambios son graduales y pueden revertirse al repolarizar la membrana. Para determinar si estos efectos son suficientes para explicar fenómenos complejos como el potencial de acción y el periodo refractario, es necesario obtener ecuaciones que relacionen las conductancias de sodio y potasio con el tiempo y el potencial de membrana.

El primer paso en el análisis es dividir la corriente membranal total entre la corriente que pasa por el capacitor y las corrientes iónicas (ecuación 1.4).

$$I = C_m \frac{dV}{dt} + I_i \quad (1.4)$$

Donde, I es la densidad de corriente de membrana total, I_i es la densidad de corriente iónica, V es el desplazamiento del potencial de membrana desde su valor de reposo, C_m es la capacidad de la membrana por unidad de área (este valor se asume constante). La razón detrás de esta ecuación es que es la más sencilla que se puede utilizar y que proporciona valores para la capacidad de la membrana que no dependen de la magnitud o el signo de V , y que son mínimamente afectados por el comportamiento de V en el tiempo. La similitud entre las corrientes iónicas medidas con la ecuación 1.5 y las calculadas a partir de la ecuación 1.6 sirve como evidencia de que la corriente capacitiva y la corriente iónica están en paralelo.

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (1.5)$$

$$-C_m \frac{dV}{dt} \text{ con } I = 0 \quad (1.6)$$

Una posterior subdivisión de la corriente de membrana puede ser hecha al separar la corriente iónica en las corrientes que la componen I_{Na} , I_K e I_l :

$$I_i = I_{Na} + I_K + I_l \quad (1.7)$$

Hodgkin y Huxley mostraron que la permeabilidad iónica de la membrana podría ser satisfactoriamente expresada en términos de conductancias iónicas (g_{Na} , g_K y g_l). Las corrientes iónicas individuales son obtenidas de estas por las ecuaciones 1.1 – 1.3; donde, E_{Na} y E_K son los potenciales de equilibrio para los iones de sodio y potasio respectivamente. E_l es el potencial al cual la “corriente de fuga” debido a los iones de cloro y otros iones es cero. Para la aplicación práctica es conveniente escribir estas ecuaciones de la siguiente forma:

$$I_{Na} = g_{Na} (V - V_{Na}) \quad (1.8)$$

$$I_K = g_K (V - V_K) \quad (1.9)$$

$$I_l = \bar{g}_l (V - V_l) \quad (1.10)$$

Donde,

$$V = E_m - E_r \quad (1.11)$$

$$V_{Na} = E_{Na} - E_r \quad (1.12)$$

$$V_K = E_K - E_r \quad (1.13)$$

$$V_l = E_l - E_r \quad (1.14)$$

Y E_r es el valor absoluto del potencial de reposo. V , V_{Na} , V_K y V_l pueden entonces ser medidos directamente como desplazamientos desde el potencial de reposo.

Aquí se exponen las ecuaciones que describen las conductancias con un nivel de precisión aceptable y que son lo suficientemente simples para realizar cálculos teóricos del potencial de acción y el período refractario. Al principio, se enfrenta la dificultad de que tanto

la conductancia de sodio como la de potasio aumenten con cierto retraso al despolarizar el axón, pero disminuyen sin una inflexión notable al repolarizarlo. Esto se ilustra mediante los círculos en la figura 1.7, que muestra el cambio en la conductancia del potasio asociado con una despolarización de 25 mV que dura de 4 a 9 ms. Si g_K se usa como variable, el final del registro puede ajustarse mediante una ecuación de primer orden, pero se necesita una ecuación de tercer o cuarto orden para describir el comienzo.

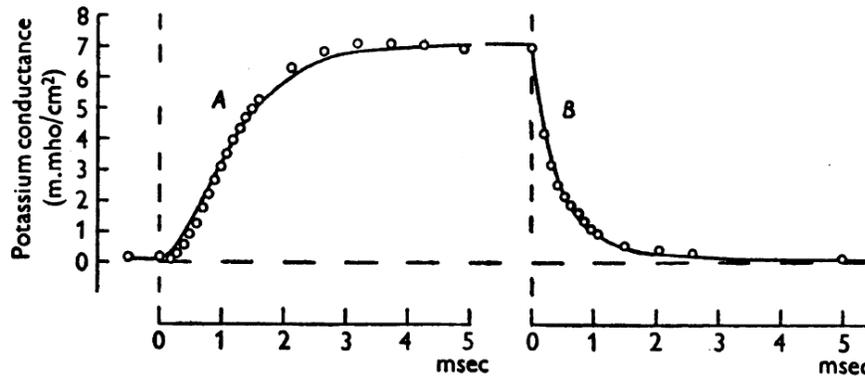


Figura 1.7. Comportamiento de la conductancia de potasio a 25 mV de adición en el potencial de membrana. A, una elevación de la conductancia de potasio asociada con una despolarización de 25 mV; **B,** caída de la conductancia de potasio asociada con repolarización al potencial de reposo. Círculos: puntos experimentales. El último punto de A es el mismo punto en B. (Hodgkin & Huxley, 1952)

Se logra una simplificación útil suponiendo que g_K es proporcional a la cuarta potencia de una variable que obedece a una ecuación de primer orden. En este caso, el aumento de la conductancia del potasio desde cero hasta un valor finito viene descrito por $(1 - e^{-t})^4$, mientras que la caída viene dada por e^{-4t} . El aumento de la conductancia, por lo tanto, muestra una marcada inflexión, mientras que la caída es un exponencial simple. Una suposición similar que usa un cubo en lugar de una cuarta potencia describe el aumento inicial de la conductancia del sodio, pero se debe incluir un término que represente la inactivación para cubrir el comportamiento en tiempos prolongados.

Las suposiciones formales usadas para describir la conductancia de potasio son:

$$g_K = \bar{g}_K n^4 \quad (1.15)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n (1 - n) - \beta_n n \quad (1.16)$$

Donde \bar{g}_K es una constante con las dimensiones de *conductancia/cm²*, α_n y β_n son tasas constantes las cuales varían con el voltaje, pero no con el tiempo y tienen dimensiones de *tiempo⁻¹*, n es una variable adimensional la cual puede variar entre 0 y 1. Estas ecuaciones pueden tener una base física si asumimos que los iones de potasio solo pueden atravesar la membrana cuando cuatro partículas similares ocupan una cierta región de la membrana. n representa la proporción de las partículas en una determinada posición (por ejemplo, en el interior de la membrana) y $1 - n$ representa la proporción que están en otro lugar (por ejemplo, en el exterior de la membrana). α_n determina la tasa de transferencia de afuera hacia adentro, mientras que β_n determina la transferencia en la dirección opuesta. Si la partícula tiene una carga negativa, α_n debería aumentar y β_n debería disminuir cuando la membrana se despolariza. (Hodgkin & Huxley, 1952)

En la familia de curvas de la figura 1.8. los círculos son observaciones experimentales del aumento de la conductancia del potasio asociado con la despolarización, mientras que las curvas suaves son soluciones teóricas de las ecuaciones 1.15 y 1.16.

En el estado de reposo, que se define por $V = 0$, n tiene un valor de reposo dado por:

$$n_0 = \frac{\alpha_{n0}}{\alpha_{n0} + \beta_{n0}} \quad (1.17)$$

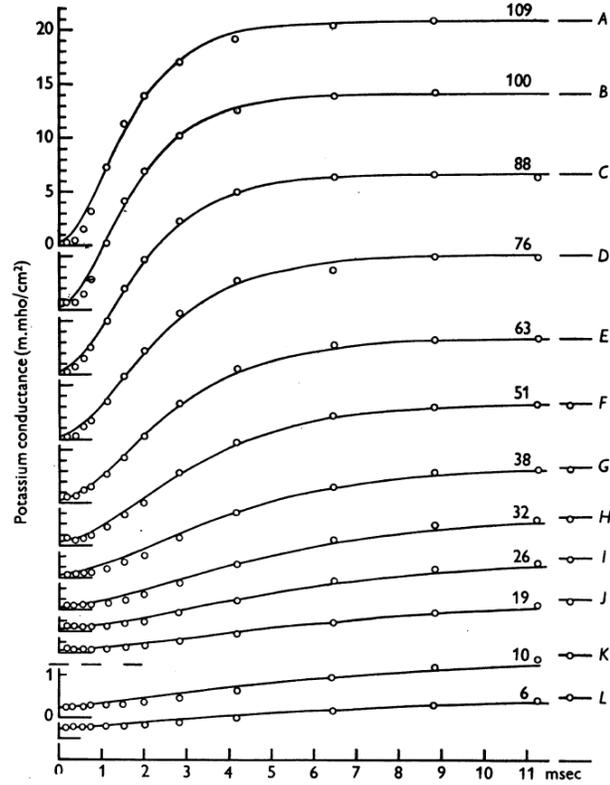


Figura 1.8. Aumento de la conductancia de potasio asociada con diferentes despolarizaciones. Los círculos corresponden a resultados experimentales realizados en un axón gigante de calamar en agua de mar y agua de mar con colina; las curvas de ajuste fueron obtenidas a partir de la ecuación 1.21 con $g_{K_0} = 0.24 \text{ m.mho/cm}^2$. (Hodgkin & Huxley, 1952)

Si V es cambiada repentinamente α_n y β_n instantáneamente toman valores apropiados para el nuevo voltaje. La solución de 1.16 la cual satisface la condición frontera que $n = n_0$ cuando $t = 0$ es:

$$n = n_\infty - (n_\infty - n_0)e^{-t/\tau_n} \quad (1.18)$$

donde,

$$n_\infty = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n} \quad (1.19)$$

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \quad (1.20)$$

La ecuación 1.15 puede ser transformada en una forma más adecuada para la comparación contra los resultados experimentales de la siguiente manera:

$$g_K = [g_{K_\infty}^{1/4} - (g_{K_\infty}^{1/4} - g_{K_0}^{1/4})e^{-t/\tau_n}]^4 \quad (1.21)$$

Donde g_{K_∞} es el valor que finalmente alcanza la conductancia y g_{K_0} es la conductancia en $t = 0$. Las curvas que se ajustan a los datos experimentales en la figura 1.8 se calcularon a partir de la ecuación 1.21 con un valor de τ_n seleccionado para obtener el mejor ajuste. La comparación entre las curvas teóricas y experimentales mostró una concordancia aceptable, aunque observaron un ligero retraso inicial en las últimas. Aunque se podría haber logrado una mejor concordancia utilizando una función de quinta o sexta potencia, sin embargo, decidieron no hacerlo debido a la complejidad adicional que esto implicaría.

De este modo, hicieron experimentos variando los voltajes desde los -109 hasta los -6 mV con $\Delta V \approx 10$ mV y en cada condición midieron la corriente de modo tal que pudieran obtener la conductancia como se observó en la figura 1.8; y para cada curva midieron τ_n y n_∞ . Posteriormente calcularon α_n y β_n con las siguientes expresiones obtenidas al despejar y relacionar las ecuaciones 1.19 y 1.20 permitiéndoles así obtener un estimado de los valores de reposo de α_n y β_n para voltaje de membrana fijado.

$$\alpha_n = \frac{n_\infty}{\tau_n} \quad (1.22)$$

$$\beta_n = \frac{1 - n_\infty}{\tau_n} \quad (1.23)$$

Para encontrar funciones que conectaran α_n y β_n con el potencial de membrana, cada una de sus medidas para cada voltaje fue graficada versus el V , obteniendo las curvas mostradas en la figura 1.9 cuyas funciones de ajuste son las ecuaciones para α_n y β_n que muestran la dependencia de la conductancia al potencial de membrana (ecuaciones 1.24 y 1.25).

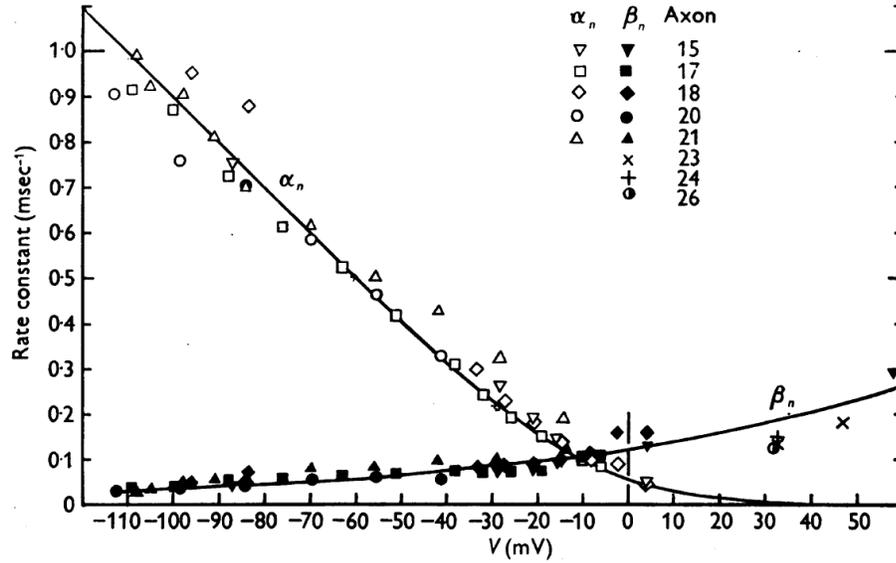


Figura 1.9. Valores de α_n y β_n obtenidos a partir de los experimentos en axón gigante de calamar en un ambiente donde se cambió el ion de Na^+ por colina. El eje de las “x” corresponde al potencial de membrana, símbolos rellenos corresponden a β_n y símbolos sin relleno a α_n . (Hodgkin & Huxley, 1952)

$$\alpha_n = \frac{0.01(V + 10)}{e^{\frac{V+10}{10}} - 1} \quad (1.24)$$

$$\beta_n = 0.125 e^{\frac{V}{80}} \quad (1.25)$$

Desde la perspectiva del sodio, las suposiciones formales realizadas se observan en las ecuaciones 1.26, 1.27 y 1.28, donde \bar{g}_{Na} es constante y $\alpha_{m,h}$ y $\beta_{m,h}$ similar al caso de potasio, son funciones dependientes del voltaje de membrana. Los autores en (Hodgkin & Huxley, 1952) supusieron que la conductancia del Na^+ estaba determinada por 2 variables debido a sus observaciones de la inactivación de la corriente de Na^+ , y que cada una de ellas obedecía a una ecuación de primer orden.

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h \quad (1.26)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m \quad (1.27)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h \quad (1.28)$$

Ellos en su momento asumieron que la conductancia era proporcional al número de unos sitios de unión dentro de la membrana los cuales eran ocupados simultáneamente por 3 moléculas activadoras, pero no estaban bloqueadas por ninguna molécula inactivadora. m representa la proporción de moléculas activadoras dentro de la célula y $1 - m$ la proporción fuera de la célula; por su parte h sería la proporción de moléculas inactivadoras afuera de la célula y $1 - h$ la proporción adentro. Por su parte α_m , β_m , α_h o β_h representan las tasas de transferencia en ambas direcciones.

La forma de calcular estos parámetros es similar a lo realizado con la conductancia del K^+ (ecuación 1.21) debido a que son el mismo tipo de ecuación y la solución en el tiempo es igual para todos los parámetros, solo hay que tener en cuenta que el Na^+ tiene la multiplicación de la activación elevado al cubo por la inactivación, por lo que se obtiene la expresión temporal mostrada en la ecuación 1.29 y que es con la que realizaron el ajuste de los resultados experimentales figura 1.10.

$$g_{Na} = g'_{Na} (1 - e^{-t/\tau_m})^3 e^{-t/\tau_h} \quad (1.28)$$

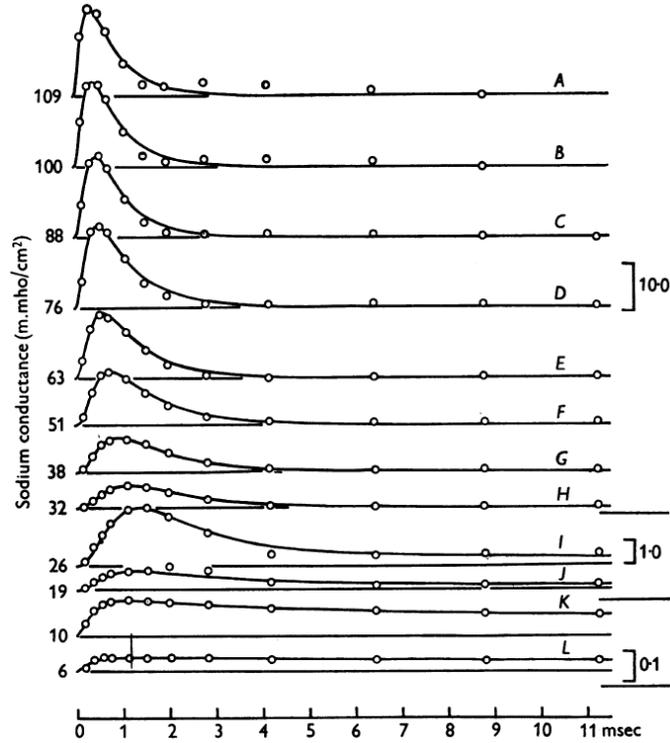


Figura 1.10. Cambios de la conductancia del sodio asociados con diferentes despolarizaciones. Los círculos corresponden a resultados experimentales de la conductancia del sodio en axón gigante de calamar; las curvas de ajuste fueron obtenidas teóricamente a partir de la ecuación 1.28. Los números de la derecha tienen unidades de mV. (Hodgkin & Huxley, 1952)

Siguieron el procedimiento descrito con la conductancia del K^+ y obtuvieron las siguientes expresiones para la activación e inactivación de la conductancia del Na^+ .

$$\alpha_m = \frac{0.1(V + 25)}{e^{\frac{V+25}{10}} - 1} \quad (1.29)$$

$$\beta_m = 4 e^{\frac{V}{18}} \quad (1.30)$$

$$\alpha_h = 0.07 e^{\frac{V}{20}} \quad (1.31)$$

$$\beta_h = \frac{1}{e^{\frac{V+30}{10}} + 1} \quad (1.32)$$

Teniendo en cuenta entonces lo mencionado hasta aquí y reemplazando lo pertinente en la ecuación 1.4, se obtiene una expresión del comportamiento del potencial de membrana debido a la corriente de capacitancia de membrana y las corrientes iónicas de Na^+ , K^+ y de fuga; la ecuación 1.33 muestra este reemplazo y junto con las ecuaciones 1.16, 1.27 y 1.28 constituyen el famoso modelo HyH.

$$I = C_m \frac{dV}{dt} + \bar{g}_K n^4 (V - V_{Na}) + \bar{g}_{Na} m^3 h (V - V_K) + \bar{g}_l (V - V_l) \quad (1.33)$$

1.2.3.2 Modelo de acoplamiento eléctrico iónico de cardiomiocito de ratón.

El modelo de HyH ha sido utilizado como punto de partida para el desarrollo de diferentes modelos matemáticos de células, incluyendo células cardiacas. En 1962, Noble presentó el primer modelo matemático de potenciales de acción cardiacos y ritmo de marcapasos basado en medidas de corrientes iónicas obtenidas mediante la técnica experimental de current clamp (Noble, 1962). A partir de este modelo y gracias a la evolución de las técnicas experimentales, como el patch clamp, se han desarrollado numerosos modelos matemáticos de células cardiacas. Uno de ellos es el modelo de (Pandit et al., 2001).

Ellos desarrollaron un modelo matemático que reconstruyó potenciales de acción medidos en cardiomiocitos aislados de ventrículo izquierdo de rata adulta. El enfoque principal de este estudio fue el desarrollo de modelos computacionales que pudieran utilizarse como base para investigar los mecanismos iónicos de la heterogeneidad transmural de la dispersión en la repolarización y el acoplamiento excitación-contracción entre miocitos de rata de origen epicárdico y endocárdico. Esto se logró formulando ecuaciones para las principales corrientes iónicas responsables de la génesis del potencial de acción y adoptando la descripción de la dinámica intracelular y de Ca^{2+} del SR del trabajo reciente de (Winslow et al., 1999).

El modelo está compuesto por las corrientes iónicas de cardiomiocito que han sido encontradas a lo largo de los años, basados (como se mencionó en párrafos anteriores) en resultados arrojados por experimentos con la técnica de patch clamp. En la figura 1.11 se

observa, el circuito eléctrico equivalente de la membrana plasmática de cardiomiocito de rata; la ecuación diferencial del potencial de membrana se muestra en la ecuación 1.34.

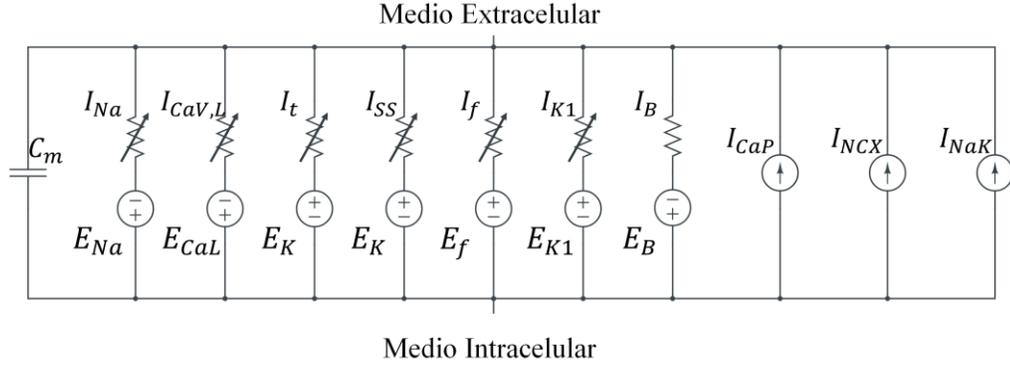


Figura 1.11. Circuito eléctrico equivalente de la interacción de las corrientes iónicas de cardiomiocito de rata. Extraído de (Pandit et al., 2001)

$$\frac{dV}{dt} = \frac{-(I_{Na} + I_{CaV,L} + I_t + I_{SS} + I_f + I_{K1} + I_B + I_{NaK} + I_{NCX} + I_{CaP})}{C_m} \quad (1.34)$$

Donde, I_{Na} es la corriente de Na^+ dependiente de voltaje; $I_{CaV,L}$ es la corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L (de larga duración); I_t es la corriente transitoria de K^+ de salida independiente de Ca^+ ; I_{SS} es la corriente de K^+ de salida de estado estacionario; I_f es la corriente activada por hiperpolarización; I_{K1} es la corriente de K^+ de entrada rectificadora; I_B es la corriente de fondo la cual está compuesta por la suma de las corriente de fondo de Na^+ , K^+ y Ca^+ ; I_{NaK} es la corriente de la bomba de Na^+/K^+ ; I_{NCX} es la corriente del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX); I_{CaP} es la corriente de la bomba de Ca^{2+} de la membrana; C_m es la capacitancia de la célula completa cuyo valor tiene unidades de pF. Estas corrientes modelan la generación y mantenimiento del potencial de acción de cardiomiocito de ventrículo izquierdo de rata.

Como fue mencionado previamente, este modelo contempla la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$, la cual fue adaptada (desde los experimentos de (Winslow et al., 1999) de

cardiomiocitos caninos) a este tipo de célula. En la figura 1.12 se observa el modelo de flujos entre compartimentos, que describe la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$. Se aprecian 4 compartimentos, el citoplasma, el espacio submembranal (SS), la red del retículo sarcoplasmático (NSR) y la unión del retículo sarcoplasmático (JSR). Con $I_{CaV,L}$ como flujo de entrada desde el medio extracelular hacia SS, J_{lib} como flujo desde SS hacia el citoplasma, J_{RyR} es el flujo desde JSR hacia SS, J_{trfer} flujo de transferencia desde NSR hacia JSR y J_{SERCA} es el flujo desde el citoplasma hacia el NSR.

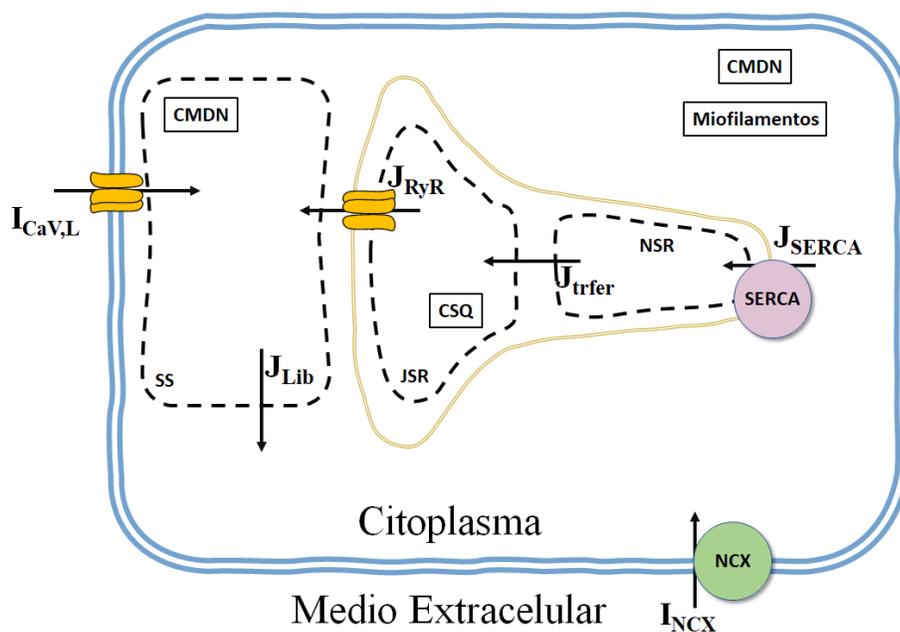


Figura 1.12. Modelo de flujos entre compartimentos. Se observan 4 compartimentos entre los cuales fluye el Ca^{2+} .

Tanto las ecuaciones, como los valores de los parámetros se muestran en la sección 10, material suplementario.

2. Antecedentes

Ha habido hallazgos del efecto del ruido en los sistemas fisiológicos, desde el sistema nervioso, donde se ha hecho gran cantidad de investigaciones, hasta los órganos efectores, en particular las células de músculo esquelético y también en el corazón a diferentes niveles.

2.1. En el sistema nervioso

Douglas y colaboradores en 1993 estudiaron el efecto del ruido en el cangrejo de río. Sus experimentos fueron en los mecanorreceptores de campo cercano, ubicados en la cola del cangrejo de río, en donde los pequeños movimientos de los pelos cuticulares son transducidos en picos por sus neuronas sensoriales asociadas y estas señales se propagan esencialmente a lo largo de los nervios sensoriales (Douglass et al., 1993).

Ellos aislaron estos mecanorreceptores y los ubicaron en un tanque con solución fisiológica. Midieron el potencial de acción en la neurona debido a ondas generadas en el agua con un generador de señales. Figura 2.1. Observaron que, al añadir ruido a la señal del generador de señales, había un rango de los niveles de la perturbación añadida en donde aumentaba la relación señal a ruido de la señal de potencial de acción medida figura 2.2, donde concluyeron que el ruido mejora la detección de señales de estimulación débiles.

La conclusión se basa en el trabajo teórico de (Longtin, 2000), quien utilizó el modelo de FHN para investigar la respuesta de un sistema excitable a un estímulo periódico de baja amplitud. La figura 2.3 muestra que en cada estado alto de la señal senoidal se genera un potencial de acción, y que la adición de ruido a la señal externa aumenta la cantidad de potenciales de acción generados en un estado alto de la señal de estimulación. Sin embargo, cuando la amplitud del ruido es mayor que la de la señal de entrada, se pierde la sincronía. Estos hallazgos ilustran cómo el ruido puede mejorar la detección de señales de estimulación débiles, es decir, señales con amplitudes iguales o menores al umbral de activación.

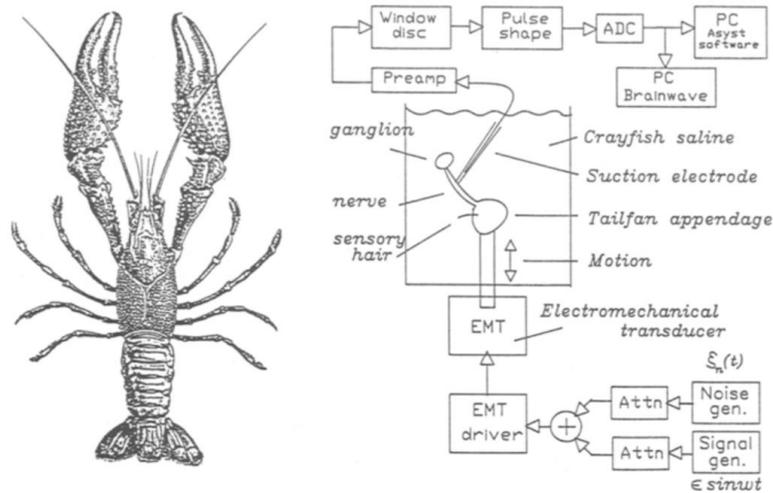


Figura 2.1. Montaje del experimento de cangrejo de río. Se generan las ondas que estimulan mecánicamente los pelos cuticulares a través de un generador de señales conectado a un transductor electromecánico. El ruido es sumado a la señal del generador de señales. A través de patch clamp es medida la actividad eléctrica del nervio producto de la estimulación mecánica de los pelos cuticulares. (Douglass et al., 1993)

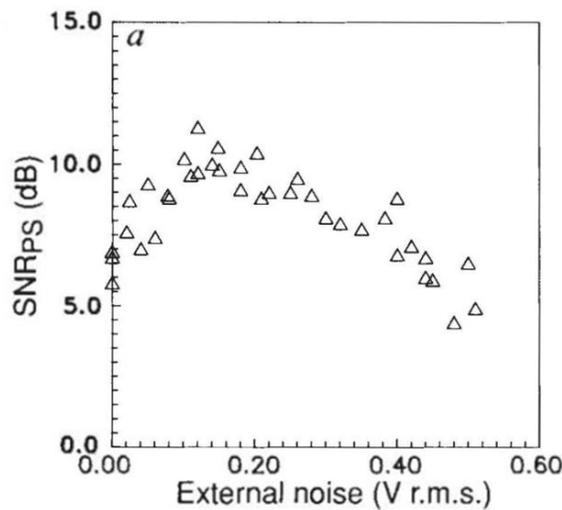


Figura 2.2. Resonancia estocástica medida del espectro de potencia. En este gráfico se muestra cómo aumenta la relación señal a ruido (SNR) de la medición de la actividad eléctrica del mecanorreceptor de la cola del cangrejo de río. Se observa un aumento de la SNR al ser añadido alrededor de 0.2 Vrms de ruido externo en la señal de estimulación. (Douglass et al., 1993)

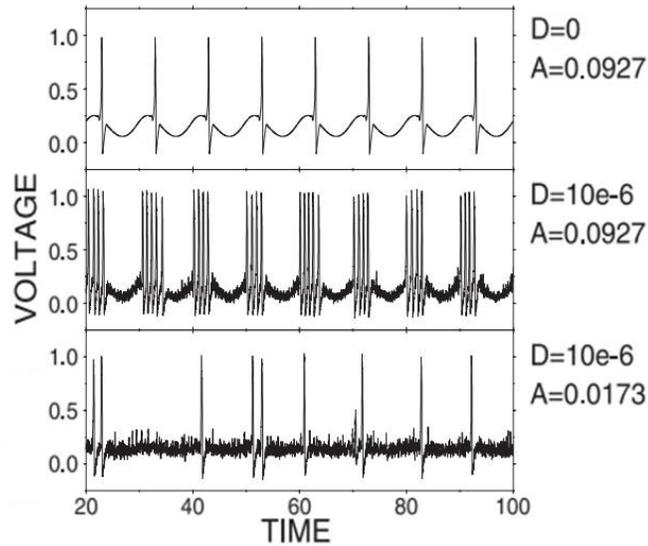


Figura 2.3. Series de tiempo del voltaje de membrana obtenidos por el modelo estudiado por Longtin y colaboradores. La gráfica superior corresponde a la intensidad de ruido $D = 0$ y amplitud del estímulo A en un valor apenas cercano al umbral de activación. La gráfica media corresponde a $D > 0$ y A igual que la superior. La gráfica inferior corresponde a D igual a la gráfica media, pero con A disminuido. (Longtin, 2000)

2.2. En órganos efectores

2.2.1 Células de músculo esquelético

Aparte del sistema nervioso, también se ha investigado el impacto de agregar variabilidad a un estímulo eléctrico en órganos efectores. En un estudio realizado en 2019, Bosutti y colaboradores examinaron la respuesta de las fibras del músculo flexor corto de los dedos del pie a estímulos eléctricos de 1 Hz con y sin ruido añadido (Bosutti et al., 2019). La señal "ruidosa" se generó a partir de la medición de una señal EMG del músculo gastrocnemio medial, la cual se utilizó para crear una señal similar denominada EMGstim. Se midió la curva de la concentración de calcio intracelular en respuesta a una señal de pulsos de frecuencia 1 Hz y a la señal EMGstim. Se observó que, al comparar los parámetros de la curva del calcio, tanto la amplitud máxima como la velocidad de subida del calcio aumentaron debido a los estímulos ruidosos figura 2.4.

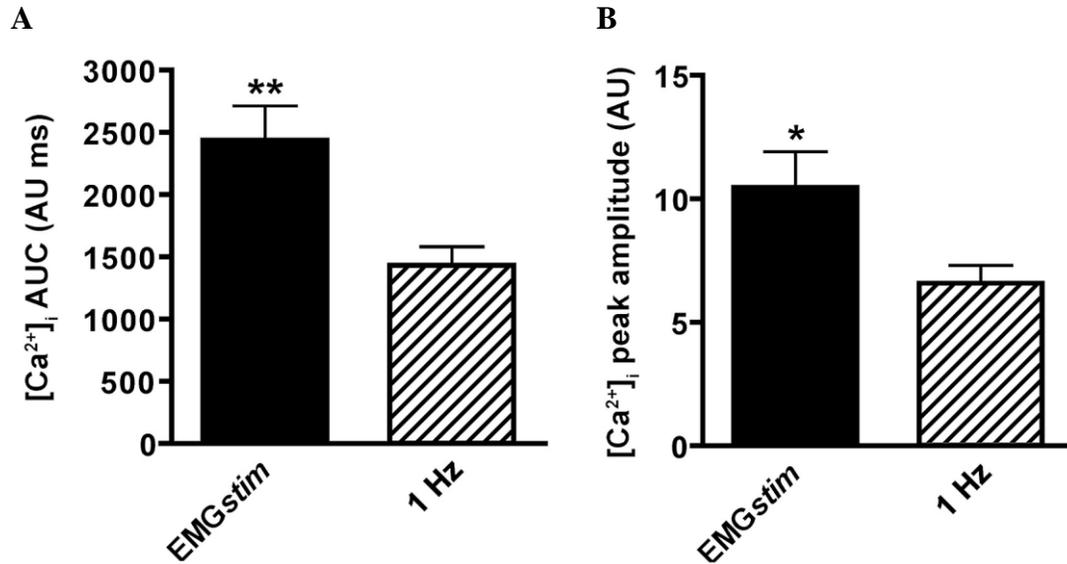


Figura 2.4. Respuesta del calcio intracelular ante estímulos con y sin ruido. A. área bajo la curva de $[Ca^{2+}]_i$. B. amplitud del pico de $[Ca^{2+}]_i$. (Bosutti et al., 2019)

2.2.2 Corazón aislado de ratón

En 2016, Peña-Romo y su equipo midieron la respuesta mecánica del corazón aislado de ratón ante una señal periódica externa con diferentes niveles de ruido añadido (0 % - 40 %) (Peña-Romo et al., 2016). Este estudio examinó la sincronización entre la frecuencia de contracción, medida mediante un tensiómetro conectado al ápice del corazón, y la frecuencia de estimulación, la cual se aplicó mediante dos electrodos ubicados en la superficie del NSA. Entre otros resultados, se descubrió que el ruido aumentaba la sincronización 1:1 entre ambos osciladores (como se puede observar en la figura 2.5), lo que sugiere la presencia de resonancia estocástica en el corazón aislado del ratón.

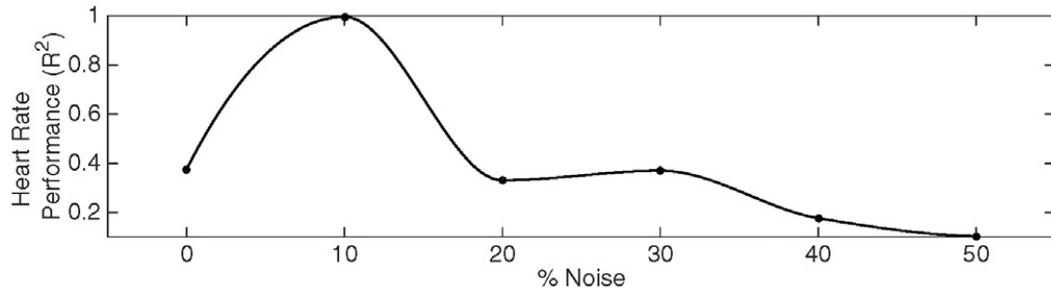


Figura 2.5. Resonancia estocástica observada en el NSA de corazón aislado de ratón. (extraído de Peña-Romo et al., 2016)

2.2.3 *Cardiomiocitos*

En nuestro laboratorio, se llevó a cabo un estudio sobre el efecto que distintos niveles de ruido tienen en la curva de calcio intracelular, tanto en células autoexcitables como en células excitables (Ramírez Hurtado et al., 2020). Desde el punto de vista de las células autoexcitables, se examinaron los cardiomiocitos del nodo sinoauricular del corazón embrionario de pollo, que mostraban oscilaciones espontáneas en la concentración de calcio intracelular. Los resultados revelaron que la estimulación con señales eléctricas periódicas ruidosas no afectaba la dinámica de la respuesta del calcio. Por otro lado, se exploró el efecto en células excitables utilizando la línea celular H9c2(2:1) la cual es línea celular de corazón embrionario de rata. En este caso, se encontró que la adición de cierto porcentaje de ruido a la señal eléctrica de estimulación afectaba la dinámica de la respuesta del calcio, ya que tanto la amplitud como la velocidad de aumento de la concentración de calcio intracelular eran mayores en presencia de ruido, en comparación con las respuestas control sin ruido añadido figura 2.6.

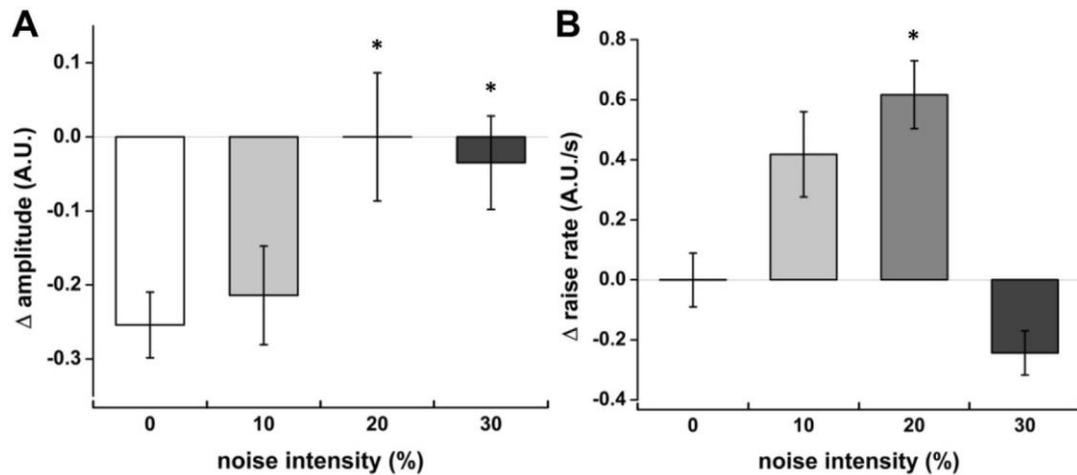


Figura 2.6. Efecto en la $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes intensidades de ruido en el estímulo eléctrico. A. Velocidad de subida de $[Ca^{2+}]_i$; **B.** Amplitud máxima de $[Ca^{2+}]_i$. (Ramírez Hurtado et al., 2020)

En concordancia con los resultados obtenidos en línea celular de corazón embrionario de rata, recientemente se realizaron experimentos similares en cardiomiocitos de tejido primario de corazón de ratón, en donde se estudió la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a un estímulo eléctrico externo con ruido añadido; en este estudio se observó que también en cardiomiocitos de ratón, la adición de ciertos porcentajes de ruido aumentaba tanto la velocidad de aumento del $[Ca^{2+}]_i$, como la amplitud máxima del mismo (datos no publicados) figura 2.7.

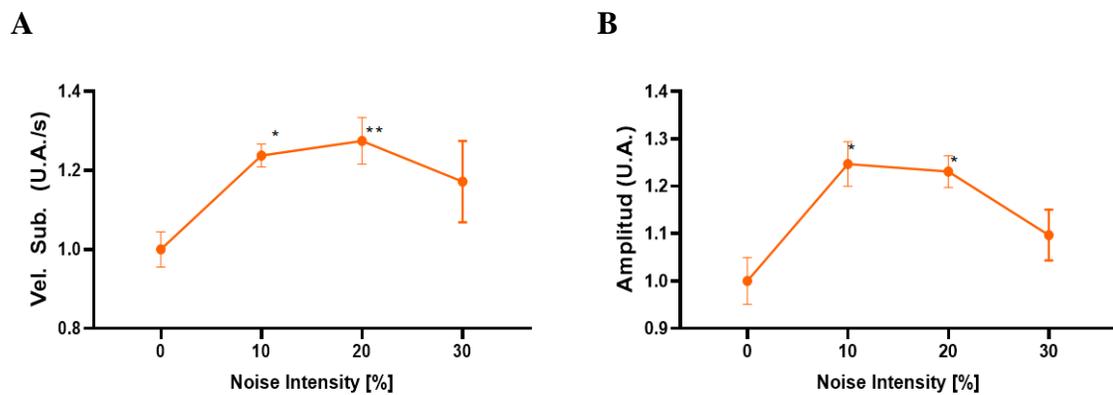


Figura 2.7. Respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a estímulos eléctricos externos con diferentes niveles de ruido en cardiomiocitos de tejido primario de corazón de ratón. A. Velocidad de subida de $[Ca^{2+}]_i$; **B.** Amplitud máxima de $[Ca^{2+}]_i$. (resultados no publicados)

2.3. Justificación

Se ha descrito hasta aquí que el ruido, más allá de ser un factor dañino para un sistema, puede llegar a ser algo benéfico si se llega a usar en los rangos y con las condiciones adecuadas. Para ello surge la necesidad de ahondar en cómo el ruido afecta los sistemas y si hay uno o varios de sus componentes que sean más sensibles al mismo. En el caso que compete a este trabajo, se ha ido profundizando en el estudio del ruido en el corazón, pasando desde órgano completo hasta llegar a célula única. Como se observó en la sección de antecedentes, quienes son más sensibles a esta adición de ruido son las células excitables, además de que se puede ver que independiente de si fueron células de rata o de ratón, los resultados tendieron a ser similares. Se abre entonces la pregunta de cuál pueda ser la forma en que el ruido está afectando la señal de Ca^{2+} .

Para estudiar esto hay que recordar cómo un estímulo eléctrico genera una respuesta de Ca^{2+} intracelular; en la sección 1.2.1.3 se describe el acoplamiento excitación-contracción, el cual detalla el proceso desde que el estímulo eléctrico afecta al potencial de membrana y el mismo desencadena un potencial de acción y posteriormente la respuesta del Ca^{2+} intracelular hasta, donde posteriormente debido a la interacción entre el calcio y la troponina c se facilita la contracción de los cardiomiocitos (para este trabajo acotaremos este acoplamiento hasta la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$, el cual denominaremos acoplamiento eléctrico-iónico).

Desde el estímulo eléctrico hasta la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ tenemos entonces 3 elementos que hay que mencionar antes de arrojar una hipótesis de cómo afecta el ruido esta vía. El primer elemento y más importante, es la forma en la que el estímulo eléctrico genera la despolarización de la membrana y yendo más allá, cómo afecta el estímulo eléctrico a la célula completa; esto se aborda en la sección 1.2.2. El segundo elemento es el potencial de acción, el cual está gobernado por la interacción entre las corrientes iónicas de membrana. Y el tercer elemento es la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$.

En la sección 1.2.2, se detallaron algunas de las formas posibles en las que un campo eléctrico interactúa con las células. En términos generales, se puede decir que el campo eléctrico influye en cualquier elemento con carga positiva o negativa, incluyendo los iones intra y extracelulares, que pueden ordenarse alrededor de la membrana o generar flujos a

favor o en contra del gradiente. Además, el campo eléctrico también puede afectar las partes cargadas de las proteínas, tanto de la membrana externa como posiblemente internas. Conjuntamente, si se tiene en cuenta la adición de ruido al campo eléctrico, el efecto en la célula se vuelve más impredecible. El impacto del estímulo eléctrico ruidoso en el acoplamiento eléctrico-iónico podría no solo estar generando la despolarización de la membrana, sino que también podría estar impactando en los flujos intracelulares de los principales iones entre ellos el de Ca^{2+} , y a su vez generando una perturbación en el flujo de calcio por alguna de sus vías principales.

Así pues, se tiene experimentalmente que se expone el cardiomiocito a un campo eléctrico y al medir el comportamiento de la $[Ca^{2+}]_i$ se observa que el ruido genera ciertos efectos. Tales efectos pueden ser debido a la interacción en el estímulo externo y la membrana plasmática o debido a que el ruido afecte una o varios flujos de Ca^{2+} de manera puntual. Para estudiar cual mecanismo pueda ser el responsable de lo observado habría que diseñar experimentos para ambos casos y generar bloqueos farmacológicos estudiando la respuesta de la célula ante tales cambios. Sin embargo, una alternativa es el uso de modelos matemáticos antes de proponer diversos experimentos que conllevan gastos en insumos de laboratorio, equipo y material humano. Estos modelos matemáticos permitirían acotar la búsqueda y podrían reducir gastos.

Teniendo en cuenta entonces lo mencionado en esta sección, se tienen por un lado las observaciones experimentales, por otro lado, el o los tipos de afectaciones que tiene el estímulo en la célula, además de los posibles blancos en el acoplamiento eléctrico-iónico, lo cual nos lleva a plantear la hipótesis escrita en la siguiente sección.

3. Hipótesis

Los aumentos tanto en la velocidad de subida como en amplitud máxima de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ observados experimentalmente en cardiomiocitos debido a la adición de ruido al estímulo eléctrico pueden deberse a que la variabilidad se transmite a las proteínas por las que viajan los principales flujos de calcio intracelular.

4. Objetivos

4.1.General

Estudiar el efecto del ruido en el acoplamiento eléctrico-iónico de un cardiomiocito.

4.2.Específicos

- Seleccionar y validar un modelo matemático que permita estudiar el acoplamiento eléctrico iónico.
- Examinar la respuesta del calcio intracelular al añadir el ruido en el estímulo eléctrico que dispara la respuesta todo o nada del potencial de membrana.
- Explorar el efecto del ruido en los movimientos de calcio intracelular al aplicarlo en las proteínas transportadoras del mismo.

5. Metodología

A continuación, se describe la metodología con la que se indagarán los posibles mecanismos que puedan ser afectados por el ruido y por ende generan los resultados observados experimentalmente en la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ en cardiomiocitos.

Primero se parte de la justificación (sección 2.3) y de la sección 1.2.1.3 donde se mencionó que los movimientos de calcio en el medio intracelular están conectados con el estímulo externo a través del acoplamiento eléctrico iónico; y que a su vez, este acoplamiento está compuesto por 2 procesos principales; donde en primer lugar se encuentran los cambios en el potencial de membrana debido al potencial de acción generado por la exposición a un campo eléctrico externo, y en segundo lugar participan las proteínas por las que fluye el calcio dentro de la célula.

Debido a lo anterior, y de acuerdo con los objetivos específicos, se realiza el estudio del comportamiento de la $[Ca^{2+}]_i$ desde las dos perspectivas, donde el ruido solo afecta al potencial de membrana (método 1) y la perspectiva donde afecta a las vías de calcio intracelulares (método 2). Para ello se plantea una modificación específica a cada perspectiva del modelo descrito en la sección 1.2.3.2.

5.1.Método 1. Donde se añade el ruido en la señal de estímulo externo que estimula el potencial de membrana y dispara el potencial de acción del modelo.

Se parte de la ecuación (1.33) (correspondiente al potencial de membrana) a la cual se le añadirá una señal de corriente externa con el fin de generar una despolarización de la membrana (ecuación 5.1), para volver estocástico el modelo basta con añadirle una señal de ruido aditivo en la señal de estímulo (ecuación 5.2).

$$I_{Ext} = A f(t) \quad (5.1)$$

$$I_{Ext_noisy} = A (f(t) + \eta(t)) \quad (5.2)$$

Donde, A es la amplitud del estímulo externo, $f(t)$ corresponde a una función cuadrada, con ciclo útil diseñado para que la duración del estado alto siempre sea de 5 ms independientemente de la frecuencia de la señal y $\eta(t)$ corresponde al ruido añadido a la amplitud de la señal. Figura 5.1.

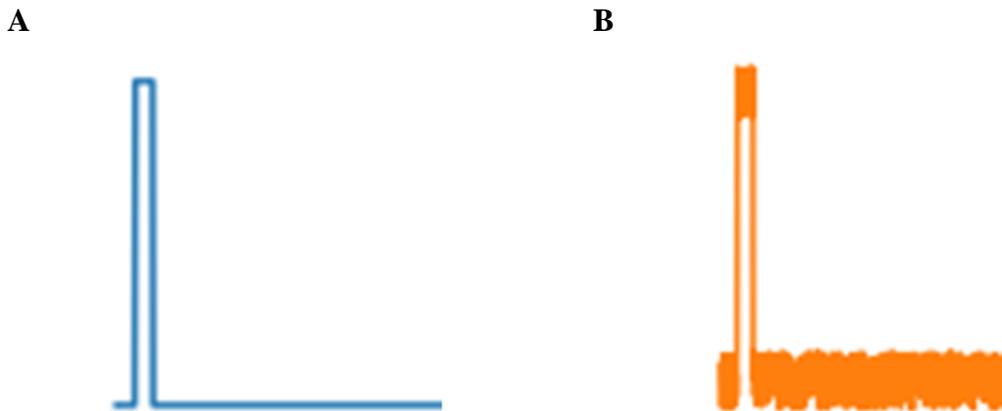


Figura 5.1. Señal de estimulación. A. sin ruido, **B.** con ruido añadido a un valor del 10% del estado alto del estímulo.

Como se mencionó en la sección 1.1, hay varios tipos de ruido, en este caso se seleccionó su distribución siguiendo el tipo de ruido usado experimentalmente (Peña-Romo et al., 2016; Ramírez Hurtado et al., 2020) el cual sigue una distribución de probabilidad uniforme.

5.1.1. Descripción del experimento del método 1

En este método, el cual se usa para cumplir el objetivo específico 2, se realizaron 5 experimentos con 3 repeticiones por cada uno, donde cada experimento corresponde a un nivel de ruido diferente $\{0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4\}$. En la sección 5.3 se amplía el detalle de lo que se mide en cada experimento.

5.2.Método 2. Donde se supone que el ruido se transmite y afecta a cada una de las conductancias de las 4 proteínas principales por donde fluye el calcio.

Para este método, se parte de las ecuaciones que modelan el flujo de calcio por las proteínas principales (material suplementario); en las ecuaciones (5.3 – 5.6) se tienen tales expresiones. En esta ocasión, se excita con I_{Ext} sin ruido, y el ruido se aplica en cada una de estas vías de la $[Ca^{2+}]_i$. Antes de explicar cómo se aplica este ruido se describen las componentes de las ecuaciones:

$$I_{CaV,L} = g_{CaV,L} d \left[\begin{array}{l} \left(0.9 + \frac{Ca_{inact|}}{10}\right) f_{11} \\ + \left(0.1 + \frac{Ca_{inact|}}{10}\right) f_{12} \end{array} \right] (V - E_{CaL}) \quad (5.3)$$

$I_{CaV,L}$ modela la corriente de calcio que fluye por $Ca^{2+}_{V,L}$ siguiendo la lógica del modelo HyH (sección 1.2.3.1.) cuyo parámetro de conductancia máxima está dado por $g_{CaV,L}$.

$$J_{RyR} = v_1(P_{o1} + P_{o2})([Ca^{2+}]_{JSR} - [Ca^{2+}]_{SS}) \quad (5.4)$$

Por su parte J_{RyR} modela el flujo a través de los canales RyR siguiendo la lógica de (Keizer & Levine, 1996), quienes describen su comportamiento mediante la transición entre 4 estados, 2 abiertos ($P_{o1} + P_{o2}$) y 2 cerrados ($P_{c1} + P_{c2}$), con v_1 como flujo de Ca^{2+} máximo.

$$J_{SERCA} = K_{SR} \frac{v_{maxf} f_b - v_{maxr} r_b}{1 + f_b + r_b} \quad (5.5)$$

J_{SERCA} modela el flujo a través de la bomba SERCA siguiendo la lógica de (Winslow et al., 1999) quienes tienen en cuenta un comportamiento tanto directo (flujo desde el citoplasma hacia el retículo sarcoplasmático) como en reversa, cada uno con sus constantes de afinidad; ellos muestran a través de comparación con datos experimentales que el factor de escala K_{SR} permite modular el flujo por esta proteína y a su vez mostrar resultados comparativos con modelos in-vitro de fallo cardiaco.

$$I_{NCX} = k_{NCX} \left[\frac{[Na^+]_i^3 [Ca^{2+}]_o e^{(0.03743\gamma_{NCX} - V)} - [Na^+]_o^3 [Ca^{2+}]_i e^{(0.03743(\gamma_{NCX} - 1)V)}}{1 + d_{NCX}([Na^+]_o^3 [Ca^{2+}]_i + [Na^+]_i^3 [Ca^{2+}]_o)} \right] \quad (5.6)$$

Y finalmente para I_{NCX} se tiene en cuenta el comportamiento en reversa que existe al inicio del potencial de acción. Además, en el mismo reporte (Winslow et al., 1999) muestra un ajuste para el factor de escala k_{NCX} el cual también permite obtener resultados similares a modelos in-vitro de fallo cardiaco.

De las ecuaciones 5.3 a 5.6 destacan los parámetros $g_{CaV,L}$, v_1 , K_{SR} y k_{NCX} , cuyo comportamiento regula la conductancia de los flujos de Ca^{2+} a través de las proteínas transportadoras del mismo. Es en estos parámetros en donde se añadirá el ruido, en este caso multiplicativo, con el fin de que se vean afectados cada uno proporcionalmente a su valor estándar (ecuaciones 5.7 – 5.10)

$$g_{cav} = \eta(t) g_{CaV,L} \quad (5.7)$$

$$g_{RyR} = \eta(t) v_1 \quad (5.8)$$

$$g_{SERCA} = \eta(t) K_{SR} \quad (5.9)$$

$$g_{NCX} = \eta(t) k_{NCX} \quad (5.10)$$

obteniendo 4 expresiones nuevas para los flujos de Ca^{2+} por las 4 vías principales de transporte de este ion. (ecuaciones 5.11. – 5.14.)

$$I_{CaV,L} = g_{cav} d \left[\begin{array}{c} \left(0.9 + \frac{Ca_{inactl}}{10}\right) f_{11} \\ + \left(0.1 + \frac{Ca_{inactl}}{10}\right) f_{12} \end{array} \right] (V - E_{CaL}) \quad (5.11)$$

$$J_{RyR} = g_{RyR} (P_{o1} + P_{o2}) ([Ca^{2+}]_{JSR} - [Ca^{2+}]_{SS}) \quad (5.12)$$

$$J_{SERCA} = g_{SERCA} \frac{v_{maxf} f_b - v_{maxr} r_b}{1 + f_b + r_b} \quad (5.13)$$

$$I_{NCX} = g_{NCX} \left[\frac{\begin{array}{c} [Na^+]_i^3 [Ca^{2+}]_o e^{(0.03743\gamma_{NCX}-V)} - \\ [Na^+]_o^3 [Ca^{2+}]_i e^{(0.03743(\gamma_{NCX}-1)V)} \end{array}}{1 + d_{NCX} ([Na^+]_o^3 [Ca^{2+}]_i + [Na^+]_i^3 [Ca^{2+}]_o)} \right] \quad (5.14)$$

En las ecuaciones (5.7 – 5.10), $\eta(t)$ representa el ruido cuyos detalles se describen en la sección 5.2.1.

Las propiedades de la variable aleatoria con la que se genera el ruido que afecta a las vías por donde fluye el Ca^{2+} entre los compartimentos mencionados, se seleccionaron teniendo en cuenta varios factores. Uno de ellos es directamente la conductancia iónica de cada vía, la cual depende de diversas condiciones, como concentración de iones intra y extracelulares, temperatura, pH, neurotransmisores (Sakmann & Neher, 1995). Otro factor no menos importante se relaciona con el teorema del límite central el cual postula que un proceso que involucra variables con diferentes distribuciones de probabilidad convergerá en una distribución normal.

Con base en esto, la distribución de probabilidad con que se generaron los números aleatorios es la distribución normal. Y los valores de media y desviación estándar se explican en la siguiente sección (5.2.1).

5.2.1 Descripción del experimento del método 2

En cada experimento se estimula con la ecuación 5.1 y se analiza el resultado de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$. Para corroborar la hipótesis planteada se estudia el efecto de añadir el ruido en la conductancia de cada una de las 4 vías de $[Ca^{2+}]_i$.

El grupo control corresponde al ruido con ($\bar{x} = 1$; $\sigma = 0$). Este resultado se compara con 2 grupos experimentales (figura 5.2):

- Grupo 1: se añade ruido a las 4 conductancias simultáneamente.
- Grupo 2: se añade ruido a las 4 conductancias individualmente, de tal modo que se tienen 4 resultados en este grupo, correspondientes a la adición de ruido en cada una de las conductancias.

Se repitieron ambos grupos experimentales con 3 formas diferentes de añadir el ruido:

- En la primera, se usa ruido con $\bar{x} = 1$ y $\sigma = \{0.1, 0.2, 0.3, 0.4\}$. de tal modo que el valor de conductancia en cada aumento de la desviación estándar aumenta su desviación, pero su valor medio se mantiene en su valor inicial.
- En la segunda forma, la σ aumenta con cada experimento ($\sigma = \{0.1, 0.2, 0.3, 0.4\}$), pero en este caso la \bar{x} también aumenta con cada experimento ($\bar{x} = \{1.1, 1.2, 1.3, 1.4\}$). De esta manera la conductancia variable aumentará su variabilidad hacia valores mayores de su valor inicial.
- En la tercera forma, se sigue la misma lógica que el ítem anterior, sin embargo, la \bar{x} disminuye con cada experimento ($\bar{x} = \{0.9, 0.8, 0.7, 0.6\}$). De esta manera la conductancia variable disminuirá su variabilidad hacia valores menores de su valor inicial.

A

Grupo 1	
g_{cav}	
g_{RyR}	
g_{SERCA}	
g_{NCX}	

B

Grupo 2				
g_{cav}				
g_{RyR}				
g_{SERCA}				
g_{NCX}				

Figura 5.2. Diseño experimental usando el método 2. **A.** Grupo 1 donde se añade ruido a las 4 vías al mismo tiempo. **B.** Grupo 2 donde se estudia la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ al añadir el ruido en las vías de manera individual.

5.3. Estadística

Como se pretende buscar las condiciones en donde se observen resultados similares a los experimentales (figuras 2.6 y 2.7) en donde se reporta efecto del aumento del ruido parámetros de la curva de calcio intracelular, entonces se mide tanto la velocidad de subida como la amplitud máxima de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$. (Figura 5.3 y ecuaciones 5.15 – 5.17).

$$Amplitud = \frac{F0 - Basal}{Max(F0) - Basal} \quad (5.15)$$

$$t_{sub} = t_2 - t_1 \quad (5.16)$$

$$Vel_{sub} = \frac{Amplitud}{t_{sub}} \quad (5.17)$$

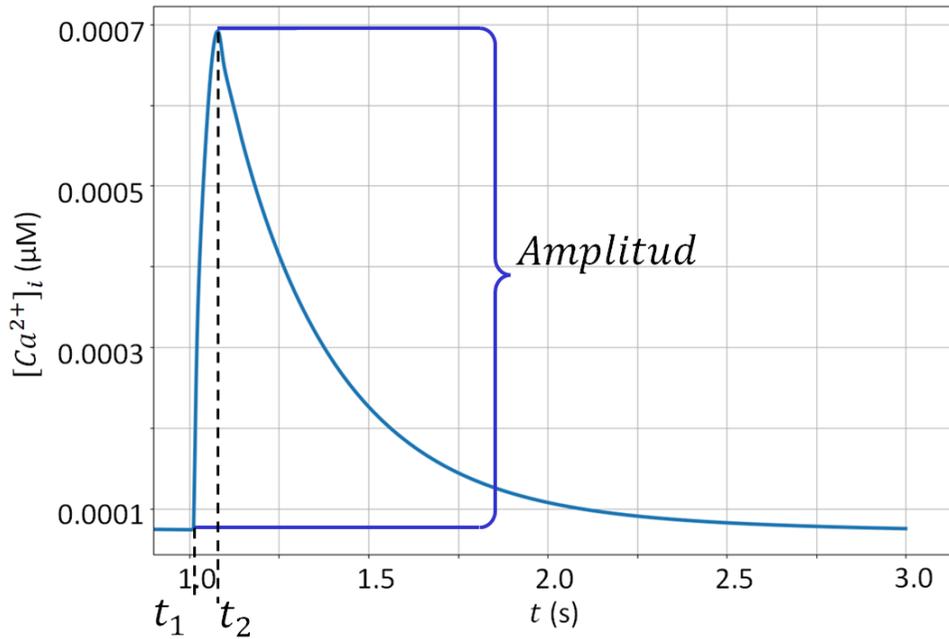


Figura 5.3. Respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ donde se ubican los parámetros para obtener los valores analizados en los resultados experimentales.

Cada experimento se repite 3 veces y de los parámetros obtenidos en las ecuaciones 5.15 y 5.17 se promedian y se reporta su valor medio, donde las barras de error de los resultados mostrados en las figuras 6.2 – 6.6 corresponden a la desviación estándar de la medida. Para comparar la media entre cada grupo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, tomando como hipótesis nula la igualdad entre la media de cada grupo respecto al control (en este caso el control es el grupo correspondiente a los resultados de los estímulos sin variabilidad); posterior a la ANOVA se realizó una prueba de múltiple comparación entre grupos (Tukey-Kramer). En todas las gráficas el símbolo * se relaciona con una $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1. Validación del montaje experimental

Antes de llevar a cabo los experimentos mencionados en la metodología, es esencial demostrar cómo el modelo es capaz de proporcionar una respuesta adecuada a la pregunta de investigación.

En la metodología (sección 5) se indica que se utilizó el modelo propuesto en la sección 1.2.3.2. (Pandit et al., 2001), el cual describe el comportamiento de las corrientes iónicas presentes en el potencial de acción de la membrana de un cardiomiocito de rata. Este modelo se basa en la lógica de HyH (Hodgkin & Huxley, 1952), el cual es complementado en el mismo trabajo con un modelo de los flujos de calcio intracelular propuesto por Winslow y colaboradores en 1999 (Winslow et al., 1999). Ellos desarrollaron un modelo de potencial de acción de membrana para cardiomiocitos de regiones epicárdicas y endocárdicas de ventrículo izquierdo de rata adulta. Este modelo matemático se basó en descriptores biofísicos derivados experimentalmente de corrientes iónicas y antiportadores, y pudieron reproducir con precisión una amplia variedad de propiedades intrínsecamente heterogéneas asociadas con la excitación, la repolarización y el proceso de excitación-contracción en miocitos de origen epicárdico y endocárdico.

Se dio a la tarea inicialmente de corroborar el comportamiento del modelo previamente mencionado, pudiendo reproducir los resultados mostrados por ellos en su artículo. En la figura 6.1. se muestran algunos resultados que corroboran lo mencionado. Donde vemos que tanto el potencial de acción, como la corriente de calcio de los $Ca^{2+}_{V,L}$, fueron reproducidos a lo mostrado por ellos. Además, la curva de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ obtenida por el modelo simulado en este proyecto se comparó con curvas obtenidas experimentalmente de cardiomiocito de rata por (Curl et al., 2001), donde se observa similitud en su morfología, tanto en velocidad de subida como de decaimiento (comparación realizada de manera cualitativa).

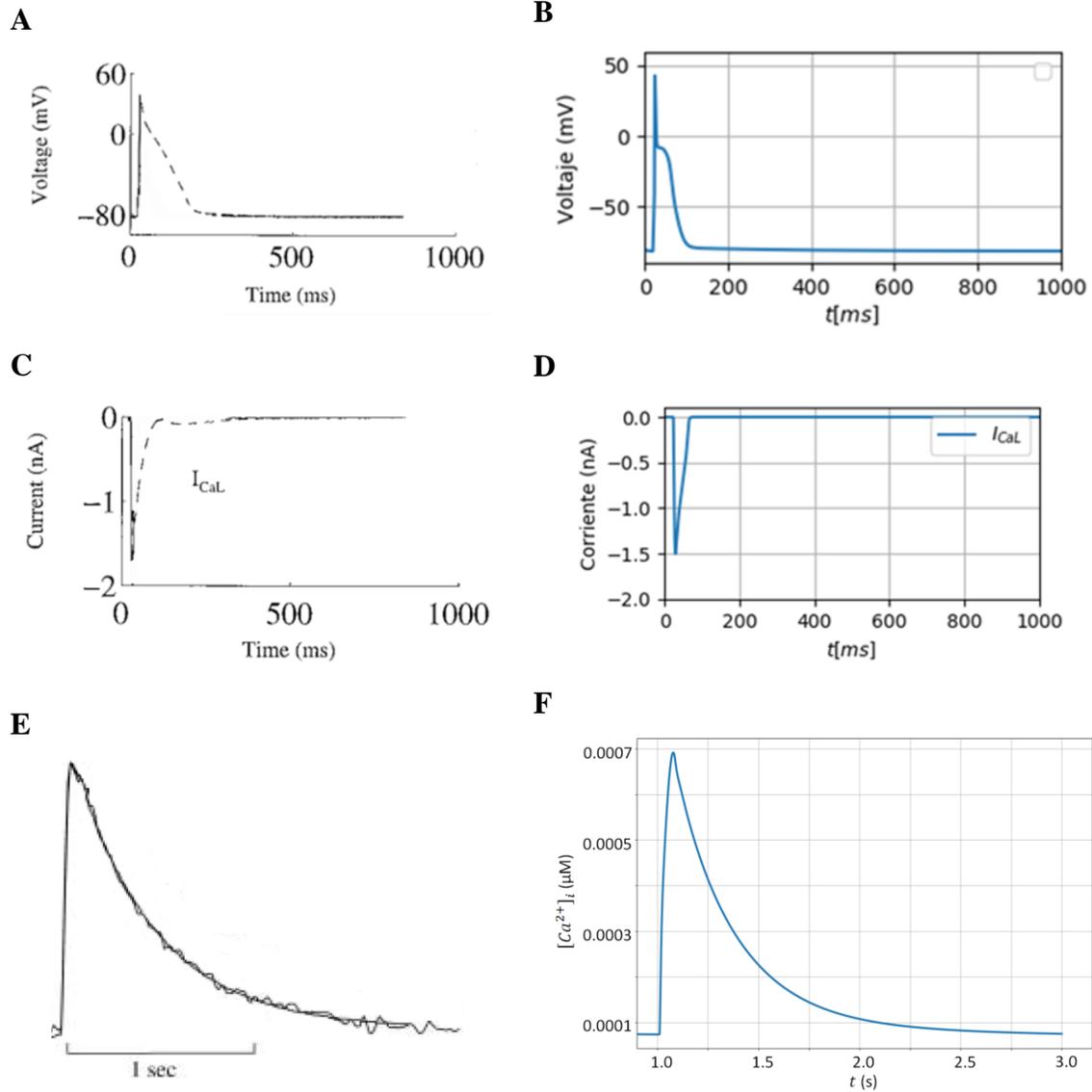


Figura 6.1. Comparación entre resultados experimentales versus resultados obtenidos con este modelo. A. y C resultados experimentales de potencial de acción y corriente I_{CaL} en cardiomiocito de ratón (Pandit et al., 2001), B y D corresponde a resultados simulados por el modelo reproducido en este trabajo; E. corresponde a la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ en rata (Curl et al., 2001) y F. corresponde a la curva de $[Ca^{2+}]_i$ obtenida en las simulaciones de este trabajo.

6.2. Exploración del efecto del ruido en la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ al ser añadido solo en el estímulo externo que perturba el potencial de membrana.

Para atender el objetivo específico 2, se hizo uso del método 1, mencionado en la sección 5.1. Recordemos que en este caso se quiso explorar si el efecto del ruido en la velocidad de subida y/o la amplitud de la $[Ca^{2+}]_i$ se debía a perturbaciones en el potencial de membrana que se transmitían a las corrientes iónicas del mismo y a su vez a los flujos de calcio intracelular, debido a que hay muchas corrientes que son dependientes de voltaje.

Para ello se realizó el experimento siguiendo la metodología descrita en la sección anterior y los resultados se muestran en la figura 6.2., donde se tiene en el eje de las abscisas el nivel de ruido el cual va desde 0 hasta 0.4 y en el eje de las ordenadas se tiene para la figura 6.2.a, la velocidad de subida de la concentración de calcio intracelular y para la figura 6.2.b, la amplitud máxima del calcio intracelular.

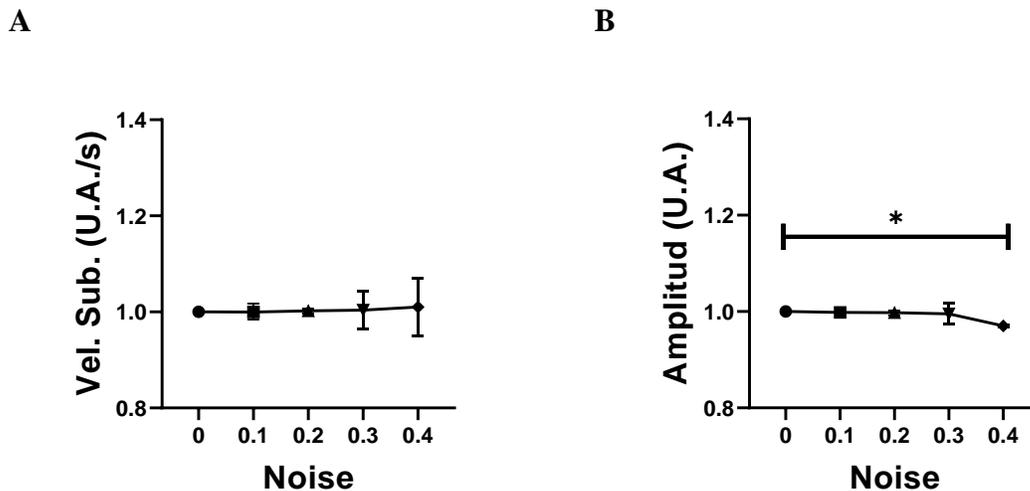


Figura 6.2. Resultados obtenidos con el método 1. A. velocidad de aumento de $[Ca^{2+}]_i$; **B.** amplitud máxima de $[Ca^{2+}]_i$.

Se observa que tanto para la velocidad de subida, cómo para la amplitud máxima, el aumento del ruido no muestra diferencias estadísticamente significativas, caso contrario a lo obtenido experimentalmente (sección 2.2.3., figuras 2.6. y 2.7.). Este resultado era de esperarse, ya que la perturbación fue aplicada solo al estímulo que está directamente

afectando la generación del potencial de acción el cual tiene un comportamiento todo o nada luego de que se alcanza su umbral de activación, momento en el cual entra en un periodo refractario absoluto; además que el estímulo ya sin ruido tiene un valor sobre el umbral de activación.

Por lo anterior se puede concluir preliminarmente que el añadir el ruido solamente al potencial de membrana al parecer no es lo que genera los efectos observados en el laboratorio. Por lo tanto, se continúa con el objetivo específico 3.

6.3.Exploración del efecto del ruido en la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ cuando se añade en las conductancias de las principales vías de calcio intracelular.

Después de notar que el efecto de la adición de ruido al campo eléctrico que estimula las células no se limita solo a afectar el potencial de membrana, se llevó a cabo un estudio sobre el impacto de la perturbación en los flujos principales de calcio intracelular.

Se utilizó el método 2 para este propósito, el cual consiste en agregar ruido de manera individual en los flujos de las 4 vías principales de calcio y se siguió la metodología descrita en la sección 5.2.1. Es importante señalar que los resultados presentados a continuación corresponden a los experimentos llevados a cabo utilizando una distribución normal del ruido con $\bar{x} = -\{0.1, 0.2, 0.3, 0.4\}$; $\sigma = \{0.1, 0.2, 0.3, 0.4\}$ es decir, que se aplicaron disminuciones aleatorias de entre el 10% y el 40% en los valores de cada uno de los flujos de calcio intracelulares a la par que el aumento de la desviación estándar a medida que aumenta el porcentaje de ruido.

Cada resultado muestra en el eje de las abscisas la desviación estándar del ruido, que va desde 0 hasta 0.4, mientras que en el eje de las ordenadas se presentan tanto la velocidad de aumento como la amplitud máxima de la concentración de calcio. A continuación, se presentará el efecto del ruido en la velocidad de aumento de calcio en los experimentos 1 y 2.

La figura 6.3 muestra el resultado de agregar ruido simultáneamente a las cuatro principales vías de calcio intracelular. Se observa que, al aumentar la varianza del ruido en

0.1 y 0.2, también aumenta la velocidad de subida. Sin embargo, este aumento se pierde al aumentar la varianza un 0.1 adicional e incluso disminuye a valores más bajos que el control al aumentar la varianza hasta 0.4.

Este resultado parece explicar lo que se observa experimentalmente en términos de la velocidad de subida (figura 2.6.B y figura 2.7.A), pero aún queda la pregunta de cuál de las cuatro vías es la más sensible a la adición de ruido, o si el efecto se debe a la presencia de ruido en todas las vías al mismo tiempo. Para abordar esta pregunta, se lleva a cabo el experimento número 2.

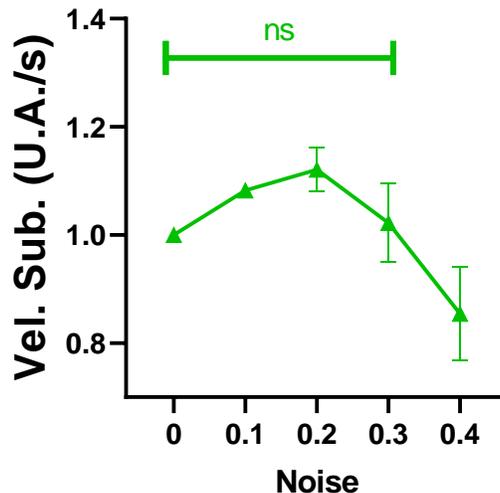


Figura 6.3. Velocidad de subida de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ debido al método 2 experimento 1. Donde se añade ruido a las 4 vías de $[Ca^{2+}]_i$ al mismo tiempo.

En la figura 6.4 se presentan los resultados obtenidos en el experimento 2, en el que se añadió ruido individualmente a cada una de las vías. La curva azul representa los resultados al añadir ruido a la conductancia de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L. Se observa que, al aumentar el ruido en 0.1 y 0.2, la velocidad de aumento de calcio también aumenta en comparación con el valor de control sin ruido añadido. Sin embargo, a medida que se aumenta el valor del ruido, la velocidad comienza a disminuir hasta alcanzar un valor similar al valor de control cuando el ruido tiene un valor de 0.4. Esto sugiere que el

flujo a través de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L es especialmente sensible a la presencia de ruido.

La curva en color naranja corresponde al resultado de añadir el ruido a la conductancia de los canales de receptor de rianodina, donde se nota que el aumento del ruido genera una disminución en la velocidad de subida de calcio. En la curva en color verde se muestran los resultados debido a la adición de ruido en la conductancia de la bomba SERCA, en donde se observa que no hay cambios en la velocidad de subida del calcio intracelular al ir aumentando el nivel de ruido. Por su parte, en la curva roja se aprecia el efecto de añadir el ruido en la conductancia del intercambiador sodio calcio, donde este aumento genera un aumento en la velocidad de subida de calcio.

Recordemos que las perturbaciones en cada conductancia corresponden a disminuciones aleatorias de cada una de ellas; además que para este caso particular en donde se analiza la velocidad de subida del calcio intracelular, los flujos de entrada deberían ser más sensibles a variabilidad que los flujos de salida. Se puede notar entonces, que interesantemente la adición de ruido en g_{cav} muestra un comportamiento similar a lo encontrado tanto en línea celular de cardiomiocito de rata, como en cardiomiocitos de tejido primario de ratón, mientras que en g_{RyR} genera una disminución, lo cual podría estar relacionado con la dependencia que tienen los canales RyR para activarse, activación que llevan a cabo debido al aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Bers, 2002). Por su parte, g_{SERCA} no se ve afectada al añadir variabilidad, mientras que al perturbar g_{NCX} se observa un aumento gradual de la velocidad, lo cual puede deberse al comportamiento en reversa que tiene el NCX al inicio del potencial de acción (Bers, 2002).

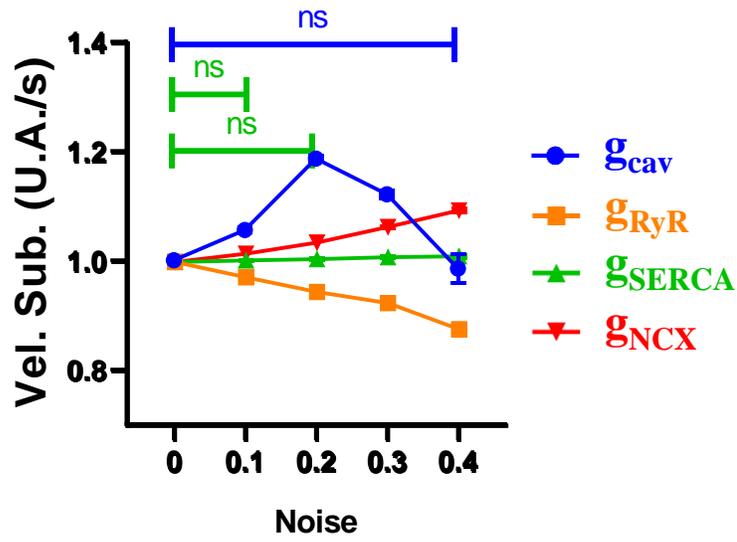


Figura 6.4. Velocidad de subida de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ debido al método 2 experimento 2. Donde se añade ruido individualmente a cada una de las 4 vías de $[Ca^{2+}]_i$.

Luego de ubicar el posible blanco del ruido en los efectos observados experimentalmente en la velocidad de aumento del $[Ca^{2+}]_i$ (figura 2.6.B y figura 2.7.A), se muestran los resultados de amplitud máxima. En la figura 6.5. vemos el comportamiento de la amplitud máxima de $[Ca^{2+}]_i$ al añadir la perturbación “ruidosa” a las 4 conductancias de las vías de Ca^{2+}_i al mismo tiempo.

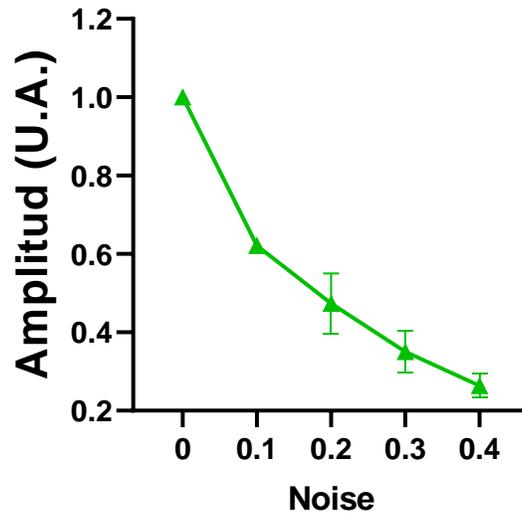


Figura 6.5. Amplitud máxima de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ debido al método 2 experimento 1. Donde se añade ruido a las 4 vías de $[Ca^{2+}]_i$ al mismo tiempo.

Al aumentar el nivel de ruido, se nota que la amplitud disminuye significativamente, incluso llegando a ser solo un 30% de su valor máximo. Ante esto, se decide realizar experimentos individuales para determinar si el ruido afecta a cada parámetro de forma individual y si esto podría mostrar resultados similares a los experimentos realizados previamente en cuanto a la amplitud máxima del $[Ca^{2+}]_i$.

En la figura 6.6 se muestran los resultados de la amplitud al afectar con ruido cada conductancia individualmente. Se puede apreciar en azul el impacto de añadir ruido en g_{cav} en la amplitud máxima de $[Ca^{2+}]_i$, donde al ir aumentando el ruido va disminuyendo hasta un 30% del valor máximo de la amplitud; en naranja se observa que al ir aumentando el ruido en g_{RyR} la amplitud disminuye también, sin embargo esta vez solo hasta un 80% de su valor control (sin ruido); la curva verde corresponde al efecto de añadir ruido en g_{SERCA} , donde no se nota una diferencia respecto al control; por su parte la curva roja que representa al g_{NCX} se ve que aumenta hasta un 15% de su valor control al ir aumentando el ruido.

Podemos notar que el resultado de añadir ruido solo en g_{cav} es muy parecido a cuando el ruido se añade en las 4 conductancias al mismo tiempo, mostrando (similar a los resultados de velocidad de subida) que al parecer g_{cav} es la conductancia más sensible al ruido; sin

embargo, no se observa ningún comportamiento similar a lo experimental (figura 2.6.A y figura 2.7.B) por parte de la amplitud máxima.

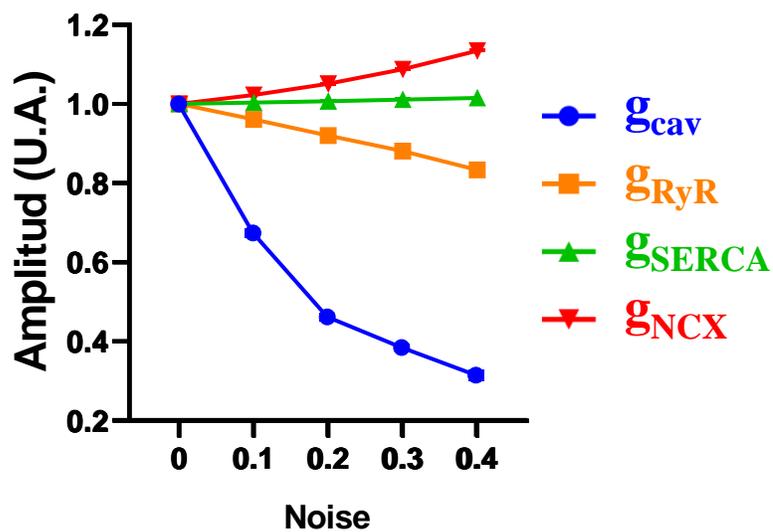


Figura 6.6. Amplitud máxima de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ debido al método 2 experimento 2. Donde se añade ruido individualmente a cada una de las 4 vías de $[Ca^{2+}]_i$.

7. Discusión

Una de las líneas de investigación principales en nuestro grupo ha sido el estudio del ruido y su efecto en la función del corazón a diferentes niveles de complejidad. Desde Peña-Romo y sus estudios en corazón aislado de ratón (Peña-Romo et al., 2016), hasta Ramírez-Hurtado y el estudio en línea celular de cardiomiocito de rata (Ramírez Hurtado et al., 2020), se ha observado que el ruido genera diferentes efectos, como el aumento en la sincronización entre la frecuencia de contracción y la frecuencia de estimulación, hasta el aumento tanto en la velocidad de subida como en la amplitud máxima de la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$.

Se plantean varias preguntas de investigación a partir de estas observaciones, entre ellas destaca la interrogante sobre cuál podría ser el mecanismo que explique cómo la adición de ruido en el estímulo eléctrico afecta a la célula y produce los efectos observados. Existen diversas formas de abordar esta pregunta, una de ellas podría ser llevar a cabo experimentos que involucren bloqueos farmacológicos en las moléculas implicadas en el acoplamiento eléctrico-iónico, es decir, en la conexión entre el estímulo eléctrico y la respuesta de calcio; sin embargo, en este acoplamiento como se mencionó en la sección 1.2.1.3., está involucrado tanto el potencial de acción, como diferentes vías por las que fluye el ion de calcio desde y hacia el medio intracelular. Con el fin de acotar la búsqueda, surge la utilidad del modelado matemático, el cual permite estudiar el acoplamiento eléctrico-iónico involucrando la vía de calcio intracelular.

Se estudió pues el efecto del ruido añadido al estímulo en el acoplamiento eléctrico-iónico con un modelo matemático de cardiomiocito de rata propuesto por Pandit y colaboradores en el 2001. El modelo planteado por ellos ya tenía una validación inicial contra resultados obtenidos por su mismo laboratorio. Además, En nuestro laboratorio se observó que el ruido generaba un impacto similar tanto en línea celular de cardiomiocito de rata, como en cardiomiocito de tejido primario de ratón; estos hallazgos sugieren que el modelo puede ser utilizado como una herramienta para confirmar la hipótesis propuesta.

La primera observación que se hizo es que el ruido interactúa con la célula de una manera más amplia que simplemente afectar su potencial de membrana, además, el

comportamiento inducido por el ruido no es solamente una respuesta a la variabilidad añadida en el estímulo externo. Se descubrió que la adición de ruido solamente en el estímulo no generó ningún efecto en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$, lo cual fue soportado por pruebas adicionales en donde se estudió el AEI antes porcentajes de ruido más amplios y amplitudes del estímulo externo mayores. Esta observación podría estar relacionada con el comportamiento "todo o nada" del potencial de acción, el cual es contemplado por el método 1. Cuando se supera el umbral de activación, la célula entra en un periodo refractario, que es el intervalo que transcurre desde el inicio del potencial de acción hasta que la fibra es capaz de conducir otro potencial de acción nuevo. (Pappano & Wier, 2018). Esta etapa abarca desde el comienzo de la fase 0 hasta un momento en la fase 3 en el que la repolarización alcanza aproximadamente -50 mV .

Debido a lo anterior, inicialmente se puede argumentar que el ruido afecta mucho más allá que al potencial de membrana y al parecer permea a algunos mecanismos internos; comportamiento que se estudió mediante el método 2.

A lo largo de este estudio se ha mencionado que la adición de ruido al campo eléctrico tuvo efectos experimentales en la velocidad de ascenso y en la amplitud máxima de $[Ca^{2+}]_i$ en línea celular de cardiomiocito de rata y en cardiomiocito de tejido primario de ratón. Mediante este trabajo, se puede inicialmente demostrar que el ruido afecta a la célula en su conjunto y no solo a la membrana, pues al añadir ruido a las vías por donde fluye el calcio entre los diferentes compartimentos, arrojó modificaciones en la curva de calcio intracelular más significativos que cuando solo se añadió ruido en el estímulo externo. Se encontró que, el añadir ruido en los 4 flujos al mismo tiempo generó un comportamiento similar al experimental por parte de la velocidad de aumento de calcio, caso contrario a la amplitud que se disminuyó alrededor de un 70% (figuras 6.3. y 6.5. respectivamente).

Los resultados obtenidos al añadir ruido en los 4 flujos de $[Ca^{2+}]_i$ al mismo tiempo fueron muy similares que el caso donde se añadió el ruido solo en los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje (curva azul de la figura 6.4); esto nos dice inicialmente que perturbaciones en esta vía pueden afectar el comportamiento de las subsiguientes, debido a que es la vía de entrada inicial del calcio al citoplasma, donde el calcio mismo es la señal que dispara toda esta dinámica (Bers, 2002); y se corrobora esta observación con los resultados

en la amplitud, donde adiciones de variabilidad en tal vía generan una disminución considerable de la concentración citoplasmática máxima del ion bajo estudio.

Aunque este estudio in-silico no logró replicar los efectos observados experimentalmente en la amplitud máxima de $[Ca^{2+}]_i$, se encontró un efecto similar al experimento en la velocidad de ascenso de $[Ca^{2+}]_i$. Por lo tanto, se puede inferir que el efecto del ruido en la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$, tanto en la velocidad de ascenso como en la amplitud máxima, puede deberse a respuestas a esta perturbación "ruidosa" por dos mecanismos diferentes, uno que genera el efecto en la amplitud y otro en la velocidad de ascenso. Parece que los canales de calcio tipo L dependientes del voltaje son responsables de lo observado en la velocidad de ascenso.

En cuanto al mecanismo que podría explicar las observaciones experimentales sobre la amplitud máxima de $[Ca^{2+}]_i$, A partir de los resultados de este estudio, podemos deducir que el mecanismo que subyace a las observaciones experimentales sobre la amplitud máxima del calcio intracelular parece tener una complejidad mayor que el simple análisis de los flujos de este ion dentro de la célula con variabilidad en una o varias de sus rutas. El modelo matemático usado se seleccionó debido al nivel de detalle que tiene sobre el acoplamiento eléctrico-iónico de un cardiomiocito de rata, el cual a la hora de modelar la dinámica de calcio intracelular usa la lógica "common-pool" en donde la entrada total a través de la membrana celular y la liberación total de $[Ca^{2+}]_i$ del retículo sarcoplasmático se producen en el mismo compartimento. En modelos de este tipo, tan pronto como el Ca^{2+} en el espacio submembranal se eleva lo suficiente como para causar CICR, se produce una liberación completamente saturada, por lo que la respuesta se denomina "todo o nada" en lugar de graduada (Rice & Jafri, 2001). Asimismo, se han encontrado reportes que mencionan que el acoplamiento entre los canales $Ca^{2+}_{V,L}$ y los canales RyR podría estar afectado en fallo cardiaco y de este modo generar una reducción en la amplitud del transitorio de Ca^{2+} (Gómez et al., 1997). Debido a esto, todo apunta a que el mecanismo responsable del efecto reportado en la amplitud máxima de calcio va más allá que solo un efecto en alguno de los flujos principales.

Con todo esto lo que podemos proponer es que la adición de ruido en el flujo de calcio a través de los canales de calcio de membrana es probablemente la causa del efecto observado

experimentalmente en la velocidad de ascenso del calcio intracelular. Respecto al efecto en la amplitud máxima de calcio, mediante este trabajo solo podemos decir que aparentemente es un fenómeno debido a otra vía u otro mecanismo que no se está teniendo en cuenta en el modelo o que quizás se está simplificando. Sin embargo, no hay que descartar la relación entre ambos fenómenos, teniendo en cuenta que el canal de receptor de rianodina junto con los canales de calcio dependientes de voltaje y otras moléculas (como calmodulina en el espacio submembranal y calsecuestrina en el retículo sarcoplasmático) forman un complejo macromolecular que regula la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (Lanner et al., 2010), el cual es el responsable de la mayor liberación de calcio al citoplasma. Teniendo en cuenta que la calmodulina modula tanto el flujo de entrada de calcio, como la liberación y recaptura de calcio del retículo (Balshaw et al., 2001; Yamaguchi et al., 2003; Yang et al., 2003); se podría especular entonces que una de las adiciones a este modelo (con el fin de indagar en el efecto del ruido en la amplitud máxima de calcio intracelular) podría ser la interacción que tienen RyR y $Ca^{2+}_{V,L}$ con calmodulina.

8. Conclusión

Nuestros resultados sugieren que lo observado en el transitorio de calcio, específicamente en la velocidad de aumento de la concentración de este ion en el citoplasma, podría deberse a perturbaciones del ruido en las proteínas por las que fluye el calcio entre los diferentes compartimentos de la célula modificando así su conductancia de manera variable; destacando al canal de calcio voltaje dependiente tipo L, como la proteína más sensible a esta variabilidad.

9. Perspectivas

Inicialmente debido a la observación realizada de la sensibilidad de los canales de calcio tipo L a la adición de variabilidad en su conductancia, nos da pie para plantear un experimento in vitro con el fin de corroborar su sensibilidad, al realizar estímulos con ruido y bloqueos farmacológicos del mismo.

Otro trabajo a futuro que se abre a través de los resultados de este proyecto es el de estudiar el efecto del ruido teniendo en cuenta un modelo matemático que involucre a más detalle la dinámica de calcio intracelular, teniendo en cuenta la interacción entre los $Ca^{2+}_{V,L}$, RyR y otras moléculas involucradas en el proceso de CICR, entre ellas la calmodulina.

10. Bibliografía

- Babona-Pilipos, R., Pritchard-Oh, A., Popovic, M. R., & Morshead, C. M. (2015). Biphasic monopolar electrical stimulation induces rapid and directed galvanotaxis in adult subependymal neural precursors. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0049-6>
- Balint, R., Cassidy, N. J., & Cartmell, S. H. (2013). Electrical stimulation: A novel tool for tissue engineering. In *Tissue Engineering - Part B: Reviews* (Vol. 19, Issue 1, pp. 48–57). <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0183>
- Balshaw, D. M., Xu, L., Yamaguchi, N., Pasek, D. A., & Meissner, G. (2001). Calmodulin Binding and Inhibition of Cardiac Muscle Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20144–20153. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010771200>
- Bers, D. M. (2001). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* (Vol. 237). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-010-0658-3>
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198–205. www.nature.com
- Bosutti, A., Bernareggi, A., Massaria, G., D’Andrea, P., Taccola, G., Lorenzon, P., & Sciancalepore, M. (2019). A “noisy” electrical stimulation protocol favors muscle regeneration in vitro through release of endogenous ATP. *Experimental Cell Research*, 381(1), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.012>
- Curl, C. L., Wendt, I. R., & Kotsanas, G. (2001). Effects of gender on intracellular [Ca²⁺] in rat cardiac myocytes. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 441(5), 709–716. <https://doi.org/10.1007/s004240000473>
- Douglass, J. K., Wilkens, L., Pantazelou, E., & Moss, F. (1993). Noise enhancement of information transfer in crayfish mechanoreceptors by stochastic resonance. *Nature*, 365(6444), 337–340.
- Faisal, A. A., Selen, L. P. J., & Wolpert, D. M. (2008). Noise in the nervous system. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 9, Issue 4, pp. 292–303). <https://doi.org/10.1038/nrn2258>
- FitzHugh, R. (1961). Impulses and Physiological States in Theoretical Models of Nerve Membrane. *Biophysical Journal*, 1(6), 445–466. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(61\)86902-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(61)86902-6)
- Gillespie, D. T. (1977). Exact Stochastic Simulation of Coupled Chemical Reactions. *The Journal of Physical Chemistry*, 81(25), 2340–2361. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

- Gómez, A. M., Valdivia, H. H., Cheng, H., Lederer, M. R., Santana, L. F., Cannell, M. B., McCune, S. A., Altschuld, R. A., & Lederer, W. J. (1997). Defective excitation contraction coupling in experimental heart cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*, *276*(5313), 800–806.
- Gratieri, T., Santer, V., & Kalia, Y. N. (2017). Basic principles and current status of transcorneal and transscleral iontophoresis. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 14, Issue 9, pp. 1091–1102). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1266334>
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2021). *Repaso de fisiología médica* (12th ed.). Elsevier Health Sciences.
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve. *The Journal of Physiology*, *117*(4), 500–544.
- Hodgkin, A. L., Hux-Ley, A. F., & Ikatz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology*, *116*(4), 424–448.
- Kara, P., Reinagel, P., & Reid, R. C. (2000). Low Response Variability in Simultaneously Recorded Retinal, Thalamic, and Cortical Neurons Visual responses of retinal ganglion cells (RGCs) can be less variable than a Poisson process (FF 1) in isolated rabbit and salamander retinas (Berry et al. In *Neuron* (Vol. 27).
- Keizer, J., & Levine, L. (1996). Ryanodine receptor adaptation and Ca²⁺-induced Ca²⁺ release- dependent Ca²⁺ oscillations. *Biophysical Journal*, *71*(6), 3477–3487. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79543-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79543-7)
- Ladbury, J. E., & Arold, S. T. (2012). Noise in cellular signaling pathways: Causes and effects. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 37, Issue 5, pp. 173–178). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.01.001>
- Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., & Hamilton, S. L. (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003996>
- Longtin, A. (2000). Effect of noise on the tuning properties of excitable systems. *Chaos, Solitons & Fractals*, *11*(12), 1835–1848. www.elsevier.nl/locate/chaos
- Love, M. R., Palee, S., Chattipakorn, S. C., & Chattipakorn, N. (2018). Effects of electrical stimulation on cell proliferation and apoptosis. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 233, Issue 3, pp. 1860–1876). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.25975>
- Malmivuo, J., & Plonsey, R. (1995). Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields. In *Bioelectromagnetism: Principles and*

Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields. Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195058239.001.0001>

- Marmarelis, V. Z. (1997). Modeling Methodology for Nonlinear Physiological Systems. In *Annals of Biomedical Engineering* (Vol. 25).
- Muñoz, M. A. (2004). *Multiplicative Noise in Non-equilibrium Phase Transitions: A tutorial*.
- Nagumo, J., Arimoto, S., & Yoshizawa, S. (1962). An Active Pulse Transmission Line Simulating Nerve Axon. *Proceedings of the IRE*, 50(10), 2061–2070.
- Noble, D. (1962). A Modification Of The Hodgkin-Huxley Equations Applicable To Purkinje Fibre Action And Pacemaker Potentials. *The Journal of Physiology*, 160(2), 317–352.
- Pandit, S. V., Clark, R. B., Giles, W. R., & Demir, S. S. (2001). A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes. *Biophysical Journal*, 81(6), 3029–3051. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75943-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75943-7)
- Pappano, A. J., & Wier, W. G. (2018). *Cardiovascular Physiology*. Elsevier Health Sciences.
- Peña-Romo, A., Gámez-Méndez, A. M., Ríos, A., Escalante, B. A., & Rodríguez-González, J. (2016). Noise enhanced the electrical stimulation-contractile response coupling in isolated mouse heart. *International Journal of Cardiology*, 221, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.06.130>
- Raj, A., & van Oudenaarden, A. (2008). Nature, Nurture, or Chance: Stochastic Gene Expression and Its Consequences. In *Cell* (Vol. 135, Issue 2, pp. 216–226). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.050>
- Ramírez Hurtado, A. L., Martínez, F. V., Diaz Galindo, C. A., Cuellar, K. G., Villareal Reyna, S. Z., Sánchez Herrera, D. P., & Rodríguez González, J. (2020). Noisy stimulation effect in calcium dynamics on cardiac cells. *Experimental Cell Research*, 396(2). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112319>
- Rice, J. J., & Jafri, M. S. (2001). Modelling calcium handling in cardiac cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 359(1783), 1143–1157. <https://doi.org/10.1098/rsta.2001.0822>
- Rosana Bassani, B. A., M Bassani, J. W., Bers, D. M., Bassan, R. A., Itl BASSvANI, J. M., & Bers, D. M. (1992). MITOCHONDRIAL AND SARCOLEMMA Ca²⁺ TRANSPORT REDUCE [Ca²⁺]_i DURING CAFFEINE CONTRACTURES IN RABBIT CARDIAC MYOCYTES. In *Journal of Physiology* (Vol. 453).
- Sakmann, B., & Neher, E. (1995). Single-Channel Recording. In *Single-Channel Recording*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1229-9>

- Shahrezaei, V., Ollivier, J. F., & Swain, P. S. (2008). Colored extrinsic fluctuations and stochastic gene expression. *Molecular Systems Biology*, 4. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.31>
- Shu, Y., Hasenstaub, A., Badoual, M., Bal, T., & McCormick, D. A. (2003). *Cellular/Molecular Barrages of Synaptic Activity Control the Gain and Sensitivity of Cortical Neurons*.
- Steinmetz, P. N., Manwani, A., Koch, C., London, M., & Segev, I. (2000). Subthreshold Voltage Noise Due to Channel Fluctuations in Active Neuronal Membranes. In *Journal of Computational Neuroscience* (Vol. 9).
- Van der Pol, B., & Van der Mark, J. (1929). The heartbeat considered as a relaxation oscillation, and an electrical model of the heart. *Verlag Nicht Ermittelbar*, 763–775.
- van der Pol, Balth. (1926). LXXXVIII. On “relaxation-oscillations” . *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 2(11), 978–992. <https://doi.org/10.1080/14786442608564127>
- Warzecha, A.-K., & Egelhaaf, M. (1999). 1999 - Variability in spiketrains during constant and dynamic stimulation. *Science*, 283, 1927–1930.
- Winslow, R. L., Rice, J., Jafri, S., Marbán, E., & O’rourke, B. (1999). Mechanisms of Altered Excitation-Contraction Coupling in Canine Tachycardia-Induced Heart Failure, II Model Studies. *Circulation Research*, 84(5), 571–586. <http://www.circresaha.org>
- Yamaguchi, N., Xu, L., Pasek, D. A., Evans, K. E., & Meissner, G. (2003). Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23480–23486. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301125200>
- Yang, D., Song, L. S., Zhu, W. Z., Chakir, K., Wang, W., Wu, C., Wang, Y., Xiao, R. P., Chen, S. R. W., & Cheng, H. (2003). Calmodulin regulation of excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Circulation Research*, 92(6), 659–667. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000064566.91495.0C>
- Zhao, S., Mehta, A. S., & Zhao, M. (2020). Biomedical applications of electrical stimulation. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 77, Issue 14, pp. 2681–2699). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03446-1>

11. Material suplementario

11.1. Ecuaciones del modelo matemático

De las ecuaciones A.1 – A.26 se muestra el modelo el cual consta de 26 ecuaciones diferenciales. La ecuación A.1 corresponde a la interacción entre las corrientes iónicas que da lugar al inicio y mantenimiento del potencial de acción presente en la membrana. De la ecuación A.2 a la A.14 se tienen las expresiones de las variables de activación e inactivación de las conductancias por donde fluyen las corrientes iónicas. Las ecuaciones A.15 – A.18 corresponden al modelado del canal de receptor de rianodina. A.19 y A.20 modelan la interacción entre el Ca^{2+} y la troponina. A.21 y A.22 modelan la dinámica de $[Na^+]_i$ y $[K^+]_i$ respectivamente. Y en la ecuación A.23 hasta la A.26 se observa el modelado de la $[Ca^{2+}]$ en los 4 compartimentos. Las modificaciones que vuelven este modelo estocástico por los dos métodos realizados en este proyecto se describen en la sección 5.1 y 5.2, ecuaciones 5.2 – 5.8.

$$\frac{dV}{dt} = \frac{-(I_{Na} + I_{CaV,L} + I_t + I_{SS} + I_f + I_{K1} + I_B + I_{NaK} + I_{NCX} + I_{CaP})}{C_m} \quad (A.1)$$

$$\frac{dm}{dt} = \frac{\bar{m} - m}{\tau_m} \quad (A.2)$$

$$\frac{dh}{dt} = \frac{\bar{h} - h}{\tau_h} \quad (A.3)$$

$$\frac{dj}{dt} = \frac{\bar{j} - j}{\tau_j} \quad (A.4)$$

$$\frac{dd}{dt} = \frac{\bar{d} - d}{\tau_d} \quad (A.5)$$

$$\frac{df_{11}}{dt} = \frac{\bar{f}_{11} - f_{11}}{\tau_{f_{11}}} \quad (A.6)$$

$$\frac{df_{12}}{dt} = \frac{\bar{f}_{12} - f_{12}}{\tau_{f_{12}}} \quad (A.7)$$

$$\frac{dCa_{inact}}{dt} = \frac{\bar{Ca}_{inact} - Ca_{inact}}{\tau_{Ca_{inact}}} \quad (A.8)$$

$$\frac{dr}{dt} = \frac{\bar{r} - r}{\tau_r} \quad (A.9)$$

$$\frac{ds}{dt} = \frac{\bar{s} - s}{\tau_s} \quad (\text{A.10})$$

$$\frac{ds_{slow}}{dt} = \frac{\bar{s}_{slow} - s_{slow}}{\tau_{s_{slow}}} \quad (\text{A.11})$$

$$\frac{dr_{ss}}{dt} = \frac{\bar{r}_{ss} - r_{ss}}{\tau_{r_{ss}}} \quad (\text{A.12})$$

$$\frac{ds_{ss}}{dt} = \frac{\bar{s}_{ss} - s_{ss}}{\tau_{s_{ss}}} \quad (\text{A.13})$$

$$\frac{dy}{dt} = \frac{\bar{y} - y}{\tau_y} \quad (\text{A.14})$$

$$\frac{dP_{C1}}{dt} = -[k]_a^+ [Ca^{2+}]_{ss}^n + [k]_a^- P_{o1} \quad (\text{A.15})$$

$$\frac{dP_{o1}}{dt} = [k]_a^+ [Ca^{2+}]_{ss}^n P_{C1} - [k]_a^- P_{o1} - [k]_b^+ [Ca^{2+}]_{ss}^m P_{o1} + [k]_b^- P_{o2} - [k]_c^+ P_{o1} + [k]_c^- P_{C2} \quad (\text{A.16})$$

$$\frac{dP_{o2}}{dt} = [k]_b^+ [Ca^{2+}]_{ss}^m P_{o1} - [k]_b^- P_{o2} \quad (\text{A.17})$$

$$\frac{dP_{C2}}{dt} = [k]_c^+ P_{o1} - [k]_c^- P_{C2} \quad (\text{A.18})$$

$$\frac{d[HTRPNCa]}{dt} = \frac{[k]_{htrpn}^+ [Ca^{2+}]_i ([HTRPN]_{tot} - [HTRPNCa]) - [k]_{htrpn}^- [HTRPNCa]}{dt} \quad (\text{A.19})$$

$$\frac{d[LTRPNCa]}{dt} = \frac{[k]_{ltrpn}^+ [Ca^{2+}]_i ([LTRPN]_{tot} - [LTRPNCa]) - [k]_{ltrpn}^- [LTRPNCa]}{dt} \quad (\text{A.20})$$

$$\frac{d[Na^+]_i}{dt} = -(I_{Na} + I_{BNa} + 3I_{NaCa} + 3I_{NaK} + I_{f,Na}) \frac{1}{V_{myo}F} \quad (\text{A.21})$$

$$\frac{d[K^+]_i}{dt} = -(I_{SS} + I_{BK} + I_t + I_{K1} + I_{f,K} + 2I_{NaK}) \frac{1}{V_{myo}F} \quad (\text{A.22})$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = \beta_i \left[J_{xfer} - J_{up} - J_{trpn} - (I_{BCa} - 2I_{NaCa} + I_{CaP}) \frac{1}{2V_{myo}F} \right] \quad (\text{A.23})$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{SS}}{dt} = \beta_{SS} \left[J_{rel} \frac{V_{JSR}}{V_{SS}} - J_{xfer} \frac{V_{myo}}{V_{SS}} - \frac{I_{CaL}}{2V_{SS}F} \right] \quad (\text{A.24})$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{JSR}}{dt} = \beta_{JSR} [J_{tr} - J_{rel}] \quad (\text{A.25})$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{NSR}}{dt} = J_{up} \frac{V_{myo}}{V_{NSR}} - J_{tr} \frac{V_{JSR}}{V_{NSR}} \quad (\text{A.26})$$

$$I_{Na} = g_{Na} m^3 h j (V - E_{Na}) \quad (\text{A.27})$$

$$\bar{m} = \frac{1}{1 + e^{-(V+45)/6.5}} \quad (\text{A.28})$$

$$\bar{h} = \bar{j} = \frac{1}{1 + e^{(V+76.1)/6.07}} \quad (\text{A.29})$$

$$E_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i} \quad (\text{A.30})$$

$$\tau_m = \frac{0.00136}{\frac{0.32 (V + 47.13)}{1 - e^{-0.1 (V+47.13)}} + 0.08 e^{V/11}} \quad (\text{A.31})$$

if $V \geq -40 \text{ mV}$

$$\tau_j = 0.0004537 (1 + e^{(V+10.66)/11.1}) \quad (\text{A.32})$$

$$\tau_j = \frac{0.01163 (1 + e^{-0.1 (V+32)})}{e^{-2.535 \times 10^{-7} V}} \quad (\text{A.33})$$

else if $V \leq -40 \text{ mV}$

$$\tau_h = \frac{0.00349}{0.135 e^{(V+80)/6.8} + 3.56 e^{0.079} + 3.1 \times 10^5 e^{0.35 V}} \quad (\text{A.34})$$

$$\tau_j = \frac{0.00349}{\frac{V + 37.78}{1 + e^{0.311(V+79.23)}} (-127140 e^{0.2444 V} - 3.474 \times 10^{-5} e^{-0.04391 V}) + \frac{0.1212 e^{-0.01052}}{1 + e^{-0.1378 (V+40.14)}}} \quad (\text{A.35})$$

$$I_{CaV,L} = g_{CaV,L} d \left[\begin{aligned} & \left(0.9 + \frac{Ca_{inact|}}{10} \right) f_{11} \\ & + \left(0.1 + \frac{Ca_{inact|}}{10} \right) f_{12} \end{aligned} \right] (V - E_{CaL}) \quad (\text{A.38})$$

$$\bar{d} = \frac{1}{1 + e^{(V+15.3)/-5}} \quad (\text{A.39})$$

$$\bar{f}_{11} = \bar{f}_{12} = \frac{1}{1 + e^{(V+26.7)/5.4}} \quad (\text{A.40})$$

$$\tau_d = 0.00305 e^{-0.0045 (V+7)^2} + 0.00105 e^{-0.001 (V+18)^2} + 0.00025 \quad (\text{A.41})$$

$$\tau_{f_{11}} = \begin{aligned} & 0.105 e^{-((V+45)/12)^2} + \frac{0.04}{(1 + e^{(-V+25)/25})} \\ & + \frac{0.015}{(1 + e^{(V+75)/25})} + 0.017 \end{aligned} \quad (\text{A.42})$$

$$\tau_{f_{11}} = \begin{aligned} & 0.041 e^{-((V+47)/12)^2} + \frac{0.07}{(1 + e^{(V+55)/5})} \\ & + \frac{0.015}{(1 + e^{(V+75)/25})} + 0.017 \end{aligned} \quad (\text{A.43})$$

$$\bar{Ca}_{inact} = \frac{1}{1 + \frac{[Ca^{2+}]_{SS}}{0.01}} \quad (\text{A.44})$$

$$I_t = g_t r (as + bs_{slow}) (V - E_K) \quad (\text{A.45})$$

$$\bar{r} = \frac{1}{1 + e^{(V+10.6)/11.42}} \quad (\text{A.46})$$

$$\bar{s} = \bar{s}_{slow} = \frac{1}{1 + e^{(V+45.3)/6.8841}} \quad (\text{A.47})$$

$$\tau_r = \frac{1}{45.16 e^{0.03577 (V+50)} + 98.9 e^{-0.1 (V+38)}} \quad (\text{A.48})$$

$$\tau_s = 0.35 e^{-((V+70)/15)^2} + 0.035 \quad (\text{A.49})$$

$$\tau_{sslow} = 3.7 e^{-((V+70)/30)^2} + 0.035 \quad (\text{A.50})$$

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \quad (\text{A.51})$$

$$I_{ss} = g_{ss} r_{ss} s_{ss} (V - E_K) \quad (\text{A.52})$$

$$\bar{r}_{ss} = \frac{1}{1 + e^{(V+11.5)-11.82}} \quad (\text{A.53})$$

$$\bar{s}_{ss} = \frac{1}{1 + e^{(V+87.5)/10.3}} \quad (\text{A.54})$$

$$\tau_{r_{ss}} = \frac{10}{45.16 e^{0.03577(V+50)} + 98.9 e^{-0.1(V+38)}} \quad (\text{A.55})$$

$$I_f = g_f y [f_{Na}(V - E_{Na}) + f_K(V - E_K)] \quad (\text{A.56})$$

$$\bar{y} = \frac{1}{1 + e^{(V+138.6)/10.48}} \quad (\text{A.57})$$

$$f_K = 1 - f_{Na} \quad (\text{A.58})$$

$$\tau_y = \frac{1}{0.11885 e^{(V+80)/28.37} + 0.5623 e^{-(V+80)/14.19}} \quad (\text{A.59})$$

$$I_{K1} = \frac{\left[\frac{48}{e^{(V+37)/25} + e^{-(V+37)/25}} + 10 \right] \cdot \left[\frac{0.0001}{1 + e^{-(V - E_K - 1.73)/17}} \right] + \frac{g_{K1} (V - E_K - 1.73)}{(1 + e^{1.613 F ((V - E_K - 1.73)/RT)}) \cdot (1 + e^{-([K^+]_o - 0.9988)/0.124})} \quad (\text{A.60})$$

$$I_B = I_{BNa} + I_{BK} + I_{BCa} \quad (\text{A.61})$$

$$I_{BNa} = g_{BNa} (V - E_{Na}) \quad (\text{A.62})$$

$$I_{BK} = g_{BK} (V - E_K) \quad (\text{A.63})$$

$$I_{BCa} = g_{BCa} (V - E_{CaL}) \quad (\text{A.64})$$

$$I_{NaK} = \bar{I}_{NaK} \frac{\left[\frac{1}{1 + 0.1245 e^{0.1 VF/RT} + 0.0365 \sigma e^{VF/RT}} \right] \cdot \left[\frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + k_{m,K}} \right]}{1 + \left(\frac{k_{m,Na}}{[Na^+]_i} \right)^{1.5}} \quad (\text{A.65})$$

$$I_{NCX} = k_{NCX} \left[\frac{[Na^+]_i^3 [Ca^{2+}]_o e^{(0.03743 \gamma_{NCX} - V)} - [Na^+]_o^3 [Ca^{2+}]_i e^{(0.03743 (\gamma_{NCX} - 1) V)}}{1 + d_{NCX} ([Na^+]_o^3 [Ca^{2+}]_i + [Na^+]_i^3 [Ca^{2+}]_o)} \right] \quad (\text{A.66})$$

$$\sigma = \frac{e^{\frac{[Na^+]_o}{67.3}} - 1}{7} \quad (\text{A.67})$$

$$I_{CaP} = \bar{I}_{CaP} \left[\frac{[Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + 0.0004} \right] \quad (\text{A.68})$$

$$J_{RyR} = v_1(P_{o1} + P_{o2})([Ca^{2+}]_{JSR} - [Ca^{2+}]_{SS}) \quad (A.69)$$

$$J_{SERCA} = K_{SR} \frac{v_{maxf} f_b - v_{maxr} r_b}{1 + f_b + r_b} \quad (A.70)$$

$$J_{trfer} = \frac{[Ca^{2+}]_{NSR} - [Ca^{2+}]_{JSR}}{\tau_{trfer}} \quad (A.71)$$

$$J_{Lib} = \frac{[Ca^{2+}]_{SS} - [Ca^{2+}]_i}{\tau_{Lib}} \quad (A.72)$$

$$J_{trpn} = \frac{d[HTRPNCa]}{dt} + \frac{d[LTRPNCa]}{dt} \quad (A.73)$$

$$f_b = ([Ca^{2+}]_i / K_{fb})^{N_{fb}} \quad (A.74)$$

$$r_b = ([Ca^{2+}]_{NSR} / K_{rb})^{N_{rb}} \quad (A.75)$$

$$\beta_i = \left[1 + \frac{[CMDN]_{tot} K_m^{CMDN}}{(K_m^{CMDN} + [Ca^{2+}]_i)^2} + \frac{[EGTA]_{tot} K_m^{EGTA}}{(K_m^{EGTA} + [Ca^{2+}]_i)^2} \right]^{-1} \quad (A.76)$$

$$\beta_{SS} = \left[1 + \frac{[CMDN]_{tot} K_m^{CMDN}}{(K_m^{CMDN} + [Ca^{2+}]_{SS})^2} \right]^{-1} \quad (A.77)$$

$$\beta_{JSR} = \left[1 + \frac{[CSQN]_{tot} K_m^{CSQN}}{(K_m^{CSQN} + [Ca^{2+}]_{JSR})^2} \right]^{-1} \quad (A.78)$$

11.2. Parámetros y constantes del modelo matemático

Tabla 1. Parámetros de las ecuaciones que regulan el potencial de membrana.		
R	Constante de los gases ideales ($mJ/mol K$)	8314.5
T	Temperatura absoluta (K)	295
F	Constante de Faraday (C/mol)	96487
C_m	Capacitancia de membrana μF	1×10^{-4}
g_{Na}	Conductancia máxima para I_{Na} (μS)	0.8
$g_{CaV,L}$	Conductancia máxima para $I_{CaV,L}$ (μS)	31×10^{-3}
E_{CaL}	Potencial de equilibrio para el calcio (mV)	65
$\tau_{Ca_{inact}}$	Constante de tiempo para Ca_{inact} (ms)	9×10^{-3}
g_t	Conductancia máxima para I_t (μS)	35×10^{-3}
g_{SS}	Conductancia máxima para I_{SS} (μS)	7×10^{-3}
g_{K1}	Conductancia máxima para I_{K1} (μS)	2.4×10^{-2}
a	Factor de proporción de inactivación de I_t (<i>adimensional</i>)	0.69
b	Factor de proporción de inactivación lenta de I_t (<i>adimensional</i>)	0.31
g_f	Conductancia máxima para I_f (μS)	1.45×10^{-3}
f_{Na}	Factor de proporción de la influencia del potencial de Na^+ en I_f (<i>adimensional</i>)	0.2
τ_{SS}	Constante de tiempo para inactivación de I_{SS} (ms)	2.1
g_{BNa}	Conductancia máxima para I_{BNa} (μS)	8.02×10^{-5}
g_{BCa}	Conductancia máxima para I_{BCa} (μS)	3.24×10^{-5}
g_{BK}	Conductancia máxima para I_{BK} (μS)	1.38×10^{-4}
\bar{I}_{NaK}	Máxima corriente I_{NaK} (nA)	8×10^{-2}
$k_{m,K}$	Constante de afinidad de K^+ en I_{NaK} (mM)	1.5
$k_{m,Na}$	Constante de afinidad de Na^+ en I_{NaK} (mM)	10
\bar{I}_{CaP}	Máxima corriente I_{CaP} (nA)	4×10^{-3}
K_{NCX}	Factor de escala de I_{NCX} (mM) ⁻⁴	9.984×10^{-6}
d_{NCX}	Constante del denominador para I_{NCX} (mM) ⁻⁴	1×10^{-4}
γ_{NCX}	Posición de la barrera de energía que controla la dependencia de voltage para I_{NCX} (<i>adimensional</i>)	0.5

v_1	Flujo de Ca^{2+} máximo en el canal RyR (s^{-1})	1.8×10^3
$[k]_a^+$	Tasa de cambio de P_{C1} a P_{O1} (s^{-1})	12.15×10^{12}
$[k]_a^-$	Tasa de cambio de P_{O1} a P_{C1} (s^{-1})	576
$[k]_b^+$	Tasa de cambio de P_{O1} a P_{O2} (s^{-1})	4.05×10^9
$[k]_b^-$	Tasa de cambio de P_{O2} a P_{O1} (s^{-1})	1930
$[k]_c^+$	Tasa de cambio de P_{O1} a P_{C2} (s^{-1})	100
$[k]_c^-$	Tasa de cambio de P_{C2} a P_{O1} (s^{-1})	0.8
n	Parámetro de cooperatividad P_{C1} a P_{O1} (<i>adimensional</i>)	4
m	Parámetro de cooperatividad P_{O1} a P_{O2} (<i>adimensional</i>)	3

K_{SR}	Factor de escala para la bomba SERCA (<i>adimensional</i>)	1
v_{maxf}	Tasa de flujo de entrada (s^{-1})	32×10^{-3}
v_{maxr}	Tasa de flujo en reversa (s^{-1})	0.9
N_{fb}	Constante de cooperatividad de flujo de entrada (<i>adimensional</i>)	1.2
N_{rb}	Constante de cooperatividad de flujo en reversa (<i>adimensional</i>)	1
K_{fb}	Constante de saturación media de flujo de entrada (<i>mM</i>)	1.68×10^{-4}
K_{rb}	Constante de saturación media de flujo en reversa (<i>mM</i>)	3.29

$\tau_{transfer}$	Constante de tiempo de transferencia entre <i>NSR</i> a <i>JSR</i> (<i>s</i>)	5.747×10^{-4}
τ_{Lib}	Constante de tiempo de transferencia entre <i>SS</i> a <i>mioplasma</i> (<i>s</i>)	26.7×10^{-3}
$[HTRPN]_{tot}$	Concentración total de troponina de alta afinidad (<i>mM</i>)	0.14
$[LTRPN]_{tot}$	Concentración total de troponina de baja afinidad (<i>mM</i>)	0.07
$[k]_{htrpn}^+$	Tasa de unión de Ca^{2+} para sitios de alta afinidad de troponina (<i>mM s</i>) ⁻¹	200000
$[k]_{htrpn}^-$	Tasa de unión de separación de Ca^{2+} para sitios de alta afinidad de troponina (<i>s</i>) ⁻¹	0.066
$[k]_{ltrpn}^+$	Tasa de unión de Ca^{2+} para sitios de baja afinidad de troponina (<i>mM s</i>) ⁻¹	40000
$[k]_{ltrpn}^-$	Tasa de unión de separación de Ca^{2+} para sitios de baja afinidad de troponina (<i>s</i>) ⁻¹	40
$[CMDN]_{tot}$	Concentración total de calmodulina en el citoplasma (<i>mM</i>)	0.05

$[CSQN]_{tot}$	Concentración total de calsequestrina en el citoplasma (mM)	15
$[EGTA]_{tot}$	Concentración total de EGTA en el citoplasma (mM)	0
K_m^{CMDN}	Constante de saturación media de Ca^{2+} para calmodulina (mM)	2.38×10^{-3}
K_m^{CSQN}	Constante de saturación media de Ca^{2+} para calsequestrina (mM)	0.1
K_m^{EGTA}	Constante de saturación media de Ca^{2+} para EGTA (mM)	1.5×10^{-4}

Tabla 5. Volúmenes celulares y subcelulares y concentraciones de iones extracelulares.

V_{myo}	Volumen del citoplasma (μL)	9.36×10^{-6}
V_{NSR}	Volumen del retículo sarcoplasmático (μL)	0.056×10^{-6}
V_{JSR}	Volumen en la unión del retículo sarcoplasmático (μL)	0.504×10^{-6}
V_{SS}	Volumen del espacio submembranal (μL)	1.2×10^{-9}
$[Na^+]_o$	Concentración extracelular de Na^+ (mM)	140
$[Ca^{2+}]_o$	Concentración extracelular de Ca^{2+} (mM)	1.2
$[k^+]_o$	Concentración extracelular de K^+ (mM)	5.4

Tabla 6. Condiciones iniciales del modelo de ecuaciones diferenciales.

V	Membrane potential (mV)	-80.50146
m	Variable de activación de I_{Na}	0.00416411
h	Variable de inactivación de I_{Na} rápida	0.6735613
j	Variable de inactivación de I_{Na} lenta	0.6729362
d	Variable de activación de $I_{CaV,L}$	2.1711×10^{-6}
f_{11}	Variable de inactivación de $I_{CaV,L}$ rápida	0.9999529
f_{12}	Variable de inactivación de $I_{CaV,L}$ lenta	0.9999529
Ca_{inact}	Variable de inactivación dependiente de Ca^{2+}	0.9913102
r	Variable de activación de I_t	0.00219152
s	Variable de inactivación de I_t rápida	0.9842542
s_{slow}	Variable de inactivación de I_t lenta	0.6421196
r_{ss}	Variable de activación de I_{ss}	0.00290717
s_{ss}	Variable de inactivación de I_{ss}	0.3142767
y	Variable de activación de I_f	0.00357871
Na_i	Concentración de sodio intracelular (mM)	10.73519
K_i	Concentración de potasio intracelular (mM)	139.2751
Ca_i	Concentración de calcio intracelular (mM)	7.9014×10^{-5}

Ca_{NSR}	Concentración de calcio en NSR (mM)	0.06600742
Ca_{SS}	Concentración de calcio en SS (mM)	8.7372×10^{-5}
Ca_{JSR}	Concentración de calcio en JSR (mM)	0.06607948
P_{C1}	Fracción de canales de rianodina en estado P_{C1}	0.6348229
P_{O1}	Fracción de canales de rianodina en estado P_{O1}	0.00043275
P_{O2}	Fracción de canales de rianodina en estado P_{O2}	6.0625×10^{-10}
P_{C2}	Fracción de canales de rianodina en estado P_{C2}	0.3647471
$LTRPNCa$	Concentración de Ca^{2+} enlazado a los sitios de baja afinidad de troponina (mM)	5.16×10^{-3}
$HTRPNCa$	Concentración de Ca^{2+} enlazado a los sitios de alta afinidad de troponina (mM)	1.39×10^{-1}