

## MODELAJE FÍSICO-MATEMÁTICO UNIDIMENSIONAL DE LA DIFUSIÓN-REACCIÓN DEL IÓN $\text{Ca}^{2+}$ EN ESTRUCTURAS BIOCONTRÁCTILES (CASO: CÉLULA DE MÚSCULO LISO)

ANTONIO D'ALESSANDRO-MARTÍNEZ<sup>1</sup>, ROBERT CÓRDOVA-RANGEL<sup>2</sup>, ENGELS D'ALESSANDRO-CÁCERES<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Central de Venezuela, Instituto de Medicina Experimental. Laboratorio de Contractilidad Miocárdica. Cátedra de Fisiología, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina / Universidad Simón Bolívar. Dpto. de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Sección de Biofísica y Bioingeniería. Email: adaless@gmail.com.

<sup>2</sup> Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Escuela de Física. Email: robertcordova1@gmail.com.

<sup>3</sup> Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Email: edalesan@gmail.com.

Recibido: mayo 2011

Recibido en forma final revisado: octubre 2011

### RESUMEN

La contracción y relajación de la célula muscular lisa está controlada por una variación temporal y espacial de la concentración del ión  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Se construyó un modelo físico-matemático unidimensional basado en una ecuación de difusión-reacción que describe al transporte del ión  $\text{Ca}^{2+}$  que se resolvió numéricamente mediante el uso de COMSOL Multiphysics 3.4® (basado en elemento finito). Se diseñaron experimentos “in silico” para la liberación del ión  $\text{Ca}^{2+}$  desde 1, 2 y 3 canales-receptores de rianodina y la acción de la bomba ATP-ásica de  $\text{Ca}^{2+}$  ubicada en la membrana del retículo sarcoplásmico. Se analizó el comportamiento espacio-temporal transitorio (“sparks” de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y estacionario de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  en lugares muy cercanos a los sitios de liberación y suficientemente alejados de ellos. Se determinó que sólo la acción de bomba ATP-ásica de  $\text{Ca}^{2+}$  no garantiza el regreso a la concentración basal al terminar la relajación, razón por la cual se consideró un término adicional de reacción llamado flujo de fuga. También se demostró que la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  alcanza su estado estacionario cerca de 50 veces más rápido que cuando se considera la acción del amortiguador Calmodulina. Como consecuencia de la liberación impulsiva, la concentración pico de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, es diecisiete (17) veces mayor que la basal. Los cambios transitorios de concentración en puntos cerca del lugar de la liberación ocurren diez (10) veces más rápido que los cambios transitorios en puntos localizados cerca de los extremos del dominio. Se observaron oscilaciones en la concentración del ión  $\text{Ca}^{2+}$  en algunos puntos específicos del dominio cuando se dispara más de 1 canal-receptor de rianodina. El tiempo requerido para alcanzar el estado estacionario (relajación) está acorde con los descritos en la literatura para una célula de íleon.

Palabras clave: Músculo liso, Ión calcio, Ecuación en derivadas parciales, Difusión-Reacción, COMSOL 3.4®, Elemento finito.

### ONE DIMENSIONAL PHYSICAL-MATHEMATICAL MODELING OF $\text{Ca}^{2+}$ ION DIFFUSION-REACTION IN BIOCONTRACTIL STRUCTURES (CASE: SMOOTH MUSCLE CELL)

#### ABSTRACT

The contraction and relaxation of smooth muscle cells is regulated by a temporal and spatial variation in the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration. In this work was elaborated one-dimensional physical-mathematical model based in a reaction-diffusion equation that represents  $\text{Ca}^{2+}$  ion transport. This equation was numerically resolved using COMSOL Multiphysics 3.4 ® (finite element based). It was designed “in silico” experiments using the firing of 1, 2 and 3 Ryanodine Receptors-Channels and the action  $\text{Ca}^{2+}$ ATP Pump located on sarcoplasmic reticulum membrane. It was studied transient ( $\text{Ca}^{2+}$  sparks) and stationary space-temporal behavior of  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolic concentration in locations very near and enough far of liberation sites. It was determined that the sole action of  $\text{Ca}^{2+}$ ATP Pump does not guarantee the return to baseline concentration at end of relaxation, and thus the action of additional reaction term called leak flux was considered. It was also shown that the  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion reaches its steady state about 50 times faster than when was considered the Calmodulin buffer. The impulsive release of  $\text{Ca}^{2+}$  ion permits to obtain a  $\text{Ca}^{2+}$  concentration peak in the cytosol that is seventeen (17) times

the baseline concentration. Transient changes in concentration near of release site occur ten (10) times faster than the transient changes near the ends of the domain. Oscillations were observed in the  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration in the domain points when were triggered per more than 1 Ryanodine Receptors-Channel. The time elapsed to achieve steady state (relaxation) are consistent with those described in the literature for ileum cell.

Keywords: Smooth muscle, Calcium ion, Diffusion-Reaction, COMSOL 3.4®, Finite element, Partial differential Equation.

## INTRODUCCIÓN

El incremento transitorio de la concentración del ión  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) en el citosol de la célula muscular lisa (CML) tras un estímulo (neurotransmisor, voltaje o estímulo mecánico como el estiramiento de la célula) inicia la contracción muscular. En este proceso está involucrada la liberación del ión desde reservorios intracelulares como el retículo sarcoplásmico, su difusión y acoplamiento con la proteína Calmodulina en el citosol y finalmente mecanismos de restauración del nivel basal de la concentración citosólica del ión calcio (Guyton & Hall, 2006; Saraví, 2008).

Una vez activados los canales tipo L (canales de dihidropiridina) en el sarcolema, ingresa  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol de la CML desde el medio extracelular (ME) desde esos canales, o bien se activa el mecanismo “sensor voltage” que acopla los canales tipo L con canales ubicados en la membrana del Retículo Sarcoplásmico (RS) como los canales de Rianodina (RyR) e Inositol Trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) ambos mecanismos promueven el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol desde el RS (que es un reservorio o cisterna intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Fill & Copello, 2002; Keener & Sneyd, 1998). Al aumentar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico aumenta su tasa de unión a la Calmodulina (“buffer”) formando el complejo  $\text{Ca}^{2+}$  - Calmodulina, que activa una proteína denominada Kinasa de la Cadena Liviana de Miosina (KCLM) la cual fosforila a la cadena liviana reguladora de la miosina y permite así que la miosina se una a la actina y se genere fuerza contráctil (Pocock & Richards, 2005; Saraví, 2008). Este mecanismo es diferente al que ocurre en músculo estriado (esquelético y cardiaco) en el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico difunde hasta la Troponina C ubicada en el sarcómero (unidad contráctil del músculo estriado) iniciando la contracción muscular. El ión calcio libre es retornado al ME y al RS por la acción de bombas ATP-ásicas ubicadas en el sarcolema (denominadas PMCA) y el RS (denominadas SERCA), respectivamente. También en el sarcolema existen moléculas intercambiadoras (transporte activo secundario) que normalmente, en forma acoplada, expulsan  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol hacia el ME e ingresan iones  $\text{Na}^+$  en sentido opuesto (contra-transporte), aquí la energía liberada por la difusión del  $\text{Na}^+$  en su sentido natural de flujo es utilizada para trasladar el  $\text{Ca}^{2+}$  en sentido opuesto, hacia el medio extracelular. Estos mecanismos disminuyen

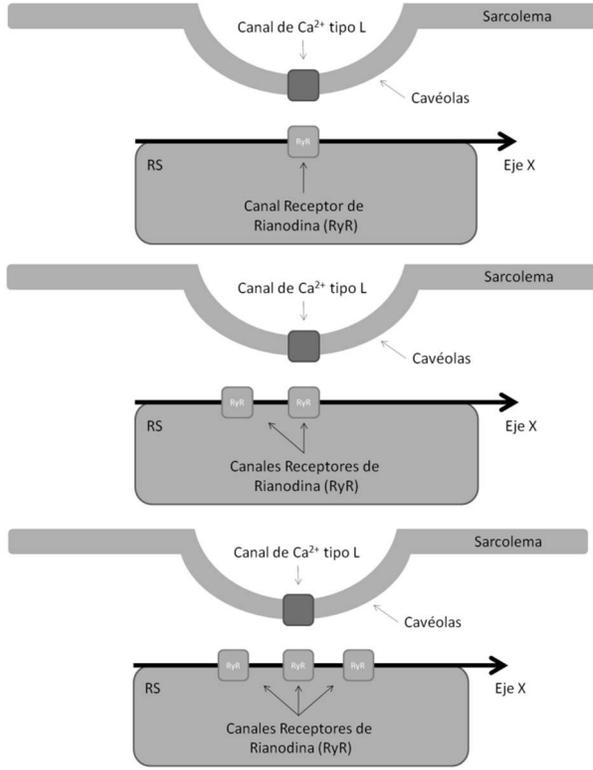
la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , activándose en ese momento una fosfatasa que revierte la fosforilación de la cadena liviana reguladora de la miosina permitiendo la relajación de la célula muscular lisa (separación de la actina y la miosina).

Existen pocas publicaciones sobre el modelaje matemático y la simulación computacional de la difusión-reacción del  $\text{Ca}^{2+}$  en células de músculo liso, una de ellos (Kargacin & Fay, 1991) simuló el transporte citosólico del ión en una y dos dimensiones (coordenadas cilíndricas) resolviendo la ecuación en derivadas parciales por diferencia finita. Se incluyeron los procesos más importantes involucrados en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  y se demostró que SERCA es el mecanismo más importante a corto plazo en la restauración del nivel basal de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , las PMCA y los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  también operan pero son más efectivos a largo plazo. Otro trabajo (Yang, 2006) encontró ondas de calcio complejas y formación de patrones usando un autómata celular estocástico cuyas reglas se obtuvieron de las soluciones (obtenidas por diferencias finitas explícitas) de la ecuación de difusión-reacción correspondiente.

En este trabajo se desarrolla un modelo físico-matemático usando una ecuación de difusión-reacción (Keener & Sneyd, 1998) que permitirá modelar la dinámica espacio-temporal de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el citosol en una célula de músculo liso, considerando la participación de un solo buffer (Calmodulina), esta ecuación se resolvió numéricamente por Elemento Finito (Hutton, 2004) utilizando el paquete computacional COMSOL 3.4® (Pryor, 2011; COMSOL, 2007). Los objetivos de esta investigación consisten en: 1. Elaborar un modelo geométrico unidimensional del sistema a modelar. 2. Identificar las fuentes y sumideros que actúan para regular la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el citosol de las células musculares. 3. Encontrar la solución numérica para la ecuación de Difusión-Reacción propuesta utilizando COMSOL 3.4® mediante diversos experimentos “in silico” (computacionales). 4. Representar gráficamente las soluciones numéricas encontradas. 5. Discutir los resultados obtenidos al modificar diferentes parámetros del modelaje. 6. Comparar los resultados obtenidos con aquellos resultados experimentales previamente publicados.

## METODOLOGÍA

Para los experimentos computacionales realizados en este trabajo, hemos considerado una línea de 2[μm] de largo ubicada sobre una parte de la membrana del RS como lo muestra la Figura 1.



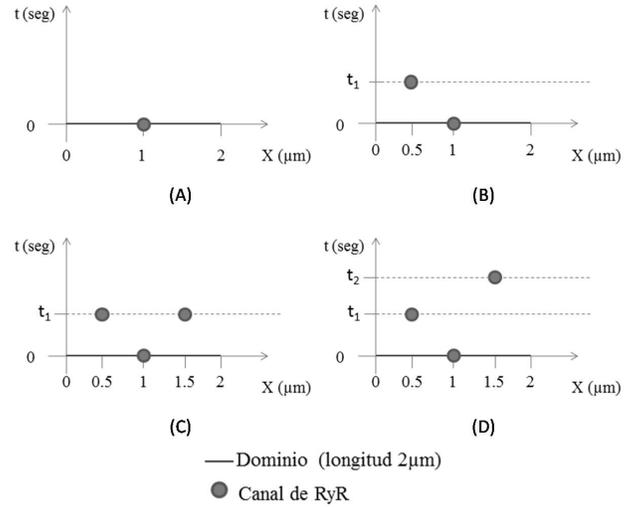
**Figura 1.** Modelos unidimensionales para el esquema de “disparo” de 1, 2 y 3 canales de RyR

La  $[Ca^{2+}]$  citosólica basal que se utilizó fue (Jaggar et al. 1998) de  $1,19 \times 10^{-4}$  [mol/m<sup>3</sup>]. Se pueden observar los escenarios unidimensionales para el esquema de “disparo” de 1, 2 y 3 canales de RyR, o equivalentemente Inositol Trifosfato, IP<sub>3</sub> (Figura 2), y la ubicación del eje x sobre una sección de la membrana del RS donde se encuentra nuestro dominio unidimensional de observación para la dinámica espacio-temporal de la  $[Ca^{2+}]$ .

La ecuación en derivadas parciales de difusión–reacción gobernante en el dominio unidimensional es:

$$\delta_{ts} \frac{\partial c}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x} \left( -D \frac{\partial c}{\partial x} \right) = R \quad (1)$$

Esta ecuación fue resuelta numéricamente usando COMSOL 3.4®. En esta EDP, los símbolos tienen el siguiente significado:



**Figura 2.** Esquema general de “disparo” de los canales de RyR. (A) Disparo del canal central de RyR en  $t=0[s]$ . (B) Disparo de dos canales de RyR en tiempos diferentes. (C) Disparo de tres canales de RyR. (D) Disparo de tres canales de RyR en tiempos diferentes

$\delta_{ts}$ : Coeficiente de escalado temporal. Este coeficiente es normalmente de 1. Si se desea, se puede cambiar la escala de tiempo, por ejemplo, de segundos a minutos estableciéndose en  $1/60$ .

D: Coeficiente de Difusión. En este trabajo se supone constante en posición y tiempo.

R: Tasa de reacción. Se consideran reacciones que incluyen las siguientes fuentes o sumideros:

1.  $J_{SERCA}$ : representa una expresión matemática que considera la acción de las bombas Ca-ATP-ásicas ubicadas en toda la superficie de la membrana del RS. Estas bombas se han empaquetado en una sola equivalente que se han modelado mediante una ecuación de Michaelis-Menten que es el caso más simple de una ecuación tipo Hill (Volkenstein, 1985). Es un término tipo sumidero.

2.  $J_{FUGA}$ : es una expresión matemática que se incluye para que la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  no alcance valores inferiores a su valor basal. Es un artificio para anular a  $J_{SERCA}$  cuando la  $[Ca^{2+}]$  citosólica alcanza su valor basal. Este artificio tiene su justificación fisiológica puesto que normalmente la  $[Ca^{2+}]$  citosólica durante la relajación nunca alcanza valores inferiores al basal. Este efecto inhibitorio sobre SERCA realmente existe y es regulado por la defosforilación del fosfolambano o moléculas equivalentes, y nos permite inferir que el  $J_{SERCA}$  efectivo es el que se obtiene de la suma de  $J_{SERCA}$  y  $J_{FUGA}$ . El término  $J_{FUGA}$  representa a una fuente del ión calcio citosólico.

3. Disparo de RyR(2), ubicado en  $x = 0.5$  [ $\mu\text{m}$ ] y RyR(3), ubicado en  $x = 1.5$  [ $\mu\text{m}$ ]. Son términos fuente del ión calcio citosólico.

4. En este trabajo, no fueron incluidos los efectos del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ni de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  del sarcolema, estos mecanismos serán incorporados en futuros modelos.

Las condiciones de borde impuestas son del tipo Neumann homogéneas (Crank, 1956); es decir, se impone la condición de flujo nulo en los bordes del dominio unidimensional ( $\hat{n} \cdot \nabla c = 0$ ).

La condición inicial del modelo se representa como:

$$c(x, 0) = \text{RyR}(1) + c_{\text{basal}} \quad (2)$$

RyR(1) representa el disparo inicial del canal central de RyR, que representaremos matemáticamente mediante la Delta de Dirac (Rumer & Ryvkin, 1980):

$$\text{RyR}(1) = A\delta(x - x_0) \quad (3)$$

centrada en el primer canal. Sin embargo, el uso de esta expresión en problemas matemáticos que deben ser resueltos numéricamente genera problemas computacionales, entre otros, inestabilidades en la solución numérica y artefactos,

así que en este trabajo usamos su representación gaussiana (Pathria, 1972; Rubinow, 1975), por tanto la condición inicial se representará como:

$$c(x, 0) = \frac{A_x}{\sqrt{2\pi}\sigma_x} e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma_x^2}} + c_{\text{basal}} \quad (4)$$

En este trabajo supondremos que la activación del primer canal de RyR (o  $\text{IP}_3$ ) se debe al cambio conformacional en el canal tipo L (ubicado en el túbulo transverso) que ocurre cuando la onda despolarizante lo alcanza (“sensor voltaje”), y su acoplamiento mecánico con el canal de RyR (o  $\text{IP}_3$ ) permite la apertura de este último (Keener & Sneyd, 1998). En músculo cardíaco donde el mecanismo dominante es el de calcio liberado por calcio (Keener & Sneyd, 1998), entonces se debe sustituir  $c_{\text{basal}}$  por el umbral de disparo ( $c_{\text{umbral}}$ ) del primer receptor que en principio debe ser mayor que  $c_{\text{basal}}$ , aún cuando debe ser considerada la dependencia con el retardo que existe entre la elevación local y transiente de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  muy cerca del canal de RyR (o  $\text{IP}_3$ ) y su apertura efectiva. La magnitud  $A_x$  fue seleccionada apropiadamente para liberar cantidades fisiológicas de iones  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol (Tabla 1) y  $\sigma_x$  fue seleccionada para cumplir la condición  $(\sigma_x/L) \ll 1$  que confina apropiadamente la liberación a un intervalo muy estrecho del dominio centrado en  $x_0$ , donde está localizado el canal.

**Tabla 1.** Valores y expresiones de las constantes utilizadas

Nombre	Expresión	Valor	Descripción
$\sigma_x$	$2\text{e-}8[\text{m}]$	$2 \times 10^{-8}[\text{m}]$	Ajuste Ancho de la Gaussiana
$A_x$	$1\text{e-}10[\text{mol}/\text{m}^2]$	$10^{-10}[\text{mol}/\text{m}^2]$	Intensidad de la liberación impulsiva de $\text{Ca}^{2+}$
L	$2\text{e-}6[\text{m}]$	$2 \times 10^{-6}[\text{m}]$	Longitud del dominio de la simulación
$A_{\text{efec}}$	$A_x / (\text{sqrt}(2 * \text{pi}) * \text{sigma})$	$0.001995[\text{mol}/\text{m}^3]$	Pre factor gaussiano
$D_{\text{Ca}}$	$223\text{e-}12[\text{m}^2/\text{s}]$	$2.23 \times 10^{-10}[\text{m}^2/\text{s}]$	Coefficiente de Difusión del $\text{Ca}^{2+}$ libre
$c_{\text{basal}}$	$1.19\text{e-}4[\text{mol}/\text{m}^3]$	$1.19 \times 10^{-4}[\text{mol}/\text{m}^3]$	Concentración de $\text{Ca}^{2+}$ basal
r	$0.5[\text{mol}/(\text{m}^3 * \text{s})]$	$0.5[\text{mol}/(\text{m}^3 * \text{s})]$	Factor $J_{\text{SERCA}}$
$x_0$	$L/2$	$10^{-6}[\text{m}]$	Ubicación del centro de la gaussiana 0
$x_1$	$L/4$	$5 \times 10^{-7}[\text{m}]$	Ubicación del centro de la gaussiana 1
$x_2$	$L * 3/4$	$1.5 \times 10^{-6}[\text{m}]$	Ubicación del centro de la gausisana 2
Bt	$40\text{e-}3[\text{mol}/\text{m}^3]$	$0.04[\text{mol}/\text{m}^3]$	Concentración total de Calmodulina (CaM)
Kd	$1\text{e-}4[\text{mol}/\text{m}^3]$	$10^{-4}[\text{mol}/\text{m}^3]$	Constante de disociación de la CaM
Kc	$1\text{e-}4[\text{mol}/\text{m}^3]$	$10^{-4}[\text{mol}/\text{m}^3]$	$[\text{Ca}^{2+}]$ a la cual $J_{\text{SERCA}} = J_{\text{máx}}/2$

La Ecuación de Difusión-Reacción a resolver numéricamente por COMSOL 3.4® será:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \left( \frac{D_c}{1 + \Theta} \right) \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{J}{1 + \Theta} \quad \text{con } \Theta = \frac{b_1 K_d}{(K_d + c)^2} \quad (5)$$

$$J = -J_{SERCA} + J_{FUGA} + J_{RS} \quad (6)$$

$$J_{SERCA} = \frac{r c}{K_c + c} \quad (7)$$

$$J_{FUGA} = J_{SERCA} (c = c_0) \quad (8)$$

$$J_{RS} = \frac{A_x}{\sqrt{2\pi\sigma_x}} e^{-\frac{(x-x_i)^2}{2\sigma_x^2}} \cdot [H(t-a) - H(t-b)] \quad (9)$$

Donde  $H(t)$  es la función escalón de Heaviside (Rumer & Ryvkin, 1980) y  $[H(t-a)-H(t-b)]$  representa la duración del flujo  $J_{RS}$  desde los receptores de Rianodina hacia el citosol.  $H(t-a)$  representa la apertura del canal en  $t = a$ . Los valores de las constantes utilizadas se presentan en la Tabla 1. Se dividió el dominio en 30 elementos (segmentos), se usaron elementos Lagrange-Cuadráticos, la tolerancia relativa fue de 0,01 y la absoluta de 0,001. Se aplicó el método de Galerkin (Hutton, 2004). Para obtener las soluciones del sistema algebraico se aplicó el submódulo UMFPACK de COMSOL 3.4 ®. La Técnica de Elemento Finito en su versión Galerkin permite reducir una Ecuación en Derivadas Parciales a un sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDO) que al ser discretizadas (usando por ejemplo un esquema de Diferencia Finita) se convierte en un sistema de ecuaciones algebraicas que puede ser resuelto usando UMFPACK que es un sub-módulo (código interno) de COMSOL3.4® el cual realiza cálculos con grandes arreglos originalmente lineales o linealizados para encontrar la solución de dicho sistema. El tiempo de cálculo se optimiza con la evaluación de la memoria RAM disponible de la PC. El usuario de COMSOL3.4® al ubicarse en el Módulo Multiphysics, tiene la opción de activar el paquete UMFPACK al hacer clic en la tecla correspondiente en una ventana llamada “solver”.

## RESULTADOS

### 1. Difusión Pura con condición inicial $c(t_0) = 0 \text{ mol/m}^3$

Nuestro primer experimento lo realizamos sin liberación impulsiva de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , los resultados se muestran en la Figura 3 (A,B,C). Se puede verificar que al no existir gradiente de concentración (porque no hay liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de ningún canal de RyR entonces la concentración citosólica permanecerá invariable, igual a  $c_{\text{basal}}$  y no existe difusión como lo predice la Segunda Ley de Fick (Rubinow, 1975). Por otro lado, este experimento permite comprobar

parcialmente el adecuado funcionamiento del paquete computacional utilizado.

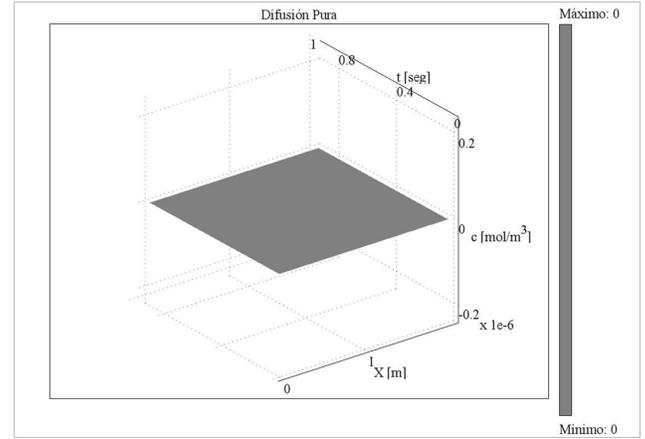


Figura 3A

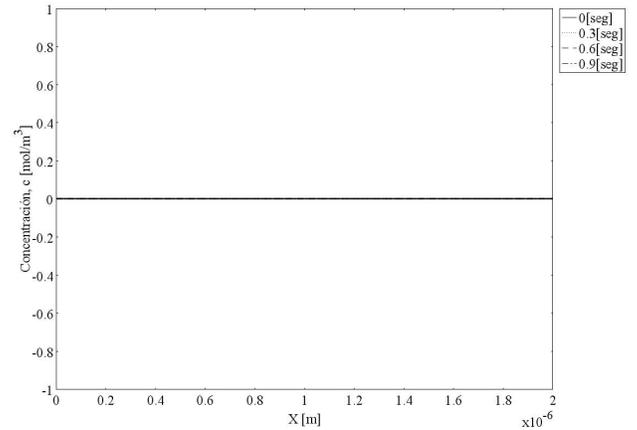


Figura 3B

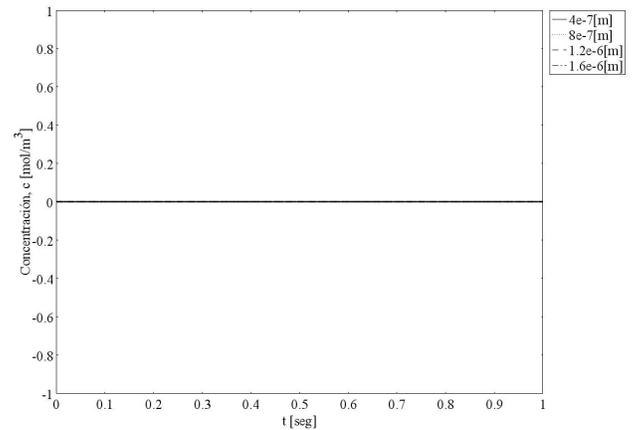


Figura 3C

Figura 3. Difusión pura con  $c(t_0) = 0 \text{ [mol/m}^3\text{]}$ . (A) Concentración en función de la posición y el tiempo. (B) Concentración vs posición, en tiempos diferentes. (C) Concentración vs tiempo, en puntos diferentes del dominio

## 2. Difusión Pura con el disparo del canal central de RyR en $t=0$ seg.

En este experimento se muestra la difusión pura para una liberación inicial impulsiva tipo gaussiana, que representa el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol desde un canal localizado en la mitad del dominio ( $x = 1 \text{ } [\mu\text{m}]$ ) para el instante  $t = 0 \text{ } [\text{s}]$ ; en la Figura 4B se observa que la concentración en función de la posición, presenta un comportamiento similar al encontrado para la solución analítica (Rubinow, 1975) de la ecuación de difusión pura con condición inicial  $c(x,0) = \delta(x)$  y dominio infinito (Figura 5B). Aunque en este trabajo se resolvió numéricamente la ecuación de difusión para un dominio finito, estas soluciones son similares debido a que la dispersión de la gaussiana ( $\sigma_x$ ) que representa el disparo inicial cumple con la condición  $(\sigma_x/L) \ll 1$ , más exactamente, los puntos alejados del centro de la gaussiana (centro del canal de RyR) no están influidos por la liberación impulsiva de  $\text{Ca}^{2+}$  sino cuando ha transcurrido un tiempo muy largo.

La Figura 4C nos muestra que la difusión alcanza su Estado Estacionario (EE) luego de aproximadamente 3 [ms] de iniciado el disparo, y que la concentración de

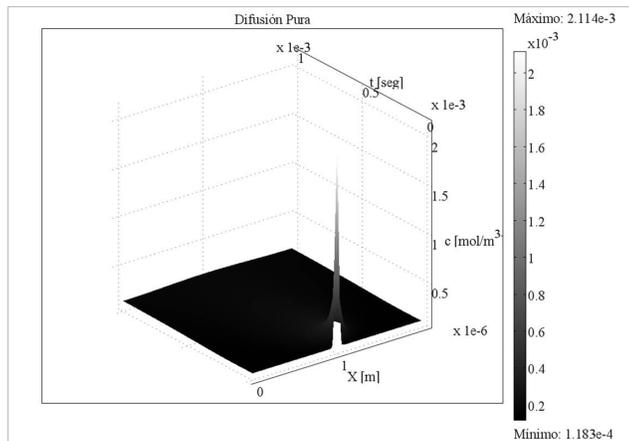


Figura 4A

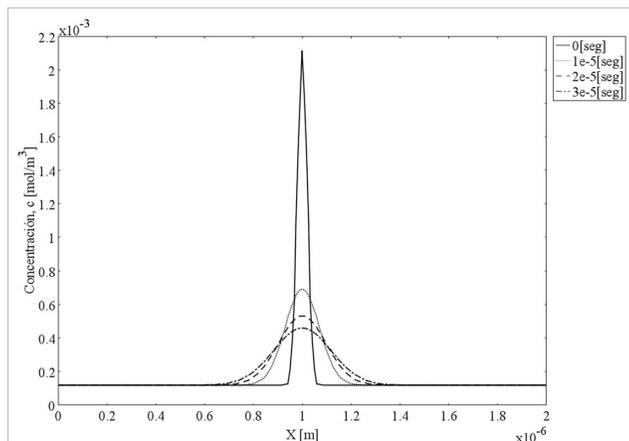


Figura 4B

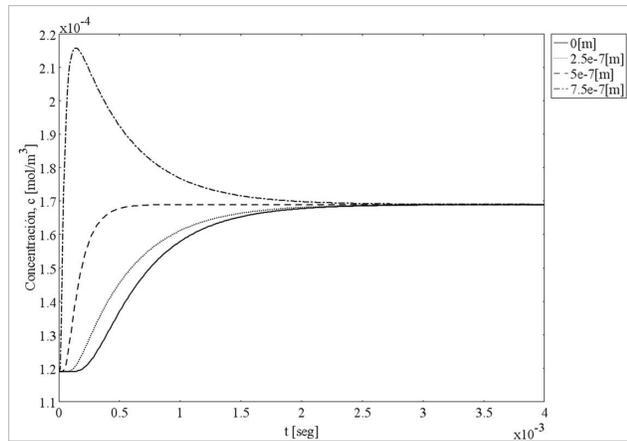


Figura 4C

Figura 4. Difusión Pura para el disparo del canal central de RyR en  $t = 0$ [s]. (A) Concentración en función de la posición y el tiempo. (B) Concentración vs posición, en tiempos diferentes. (C) Concentración vs tiempo, en puntos diferentes del dominio

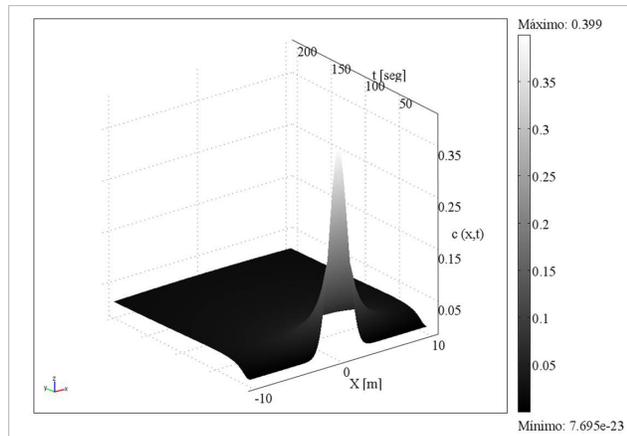


Figura 5A

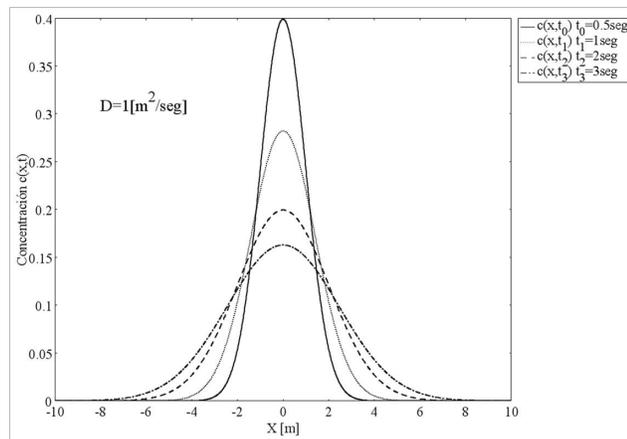
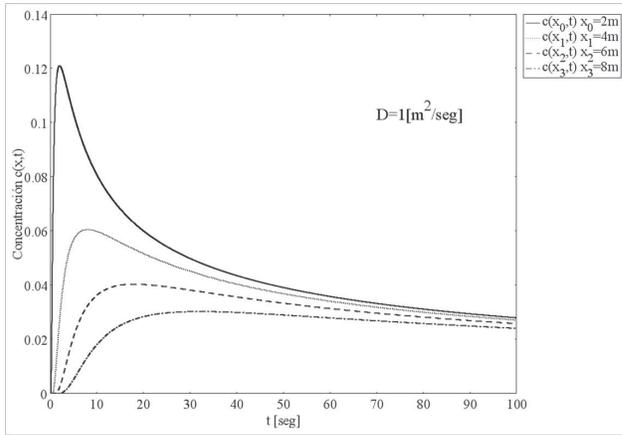


Figura 5B



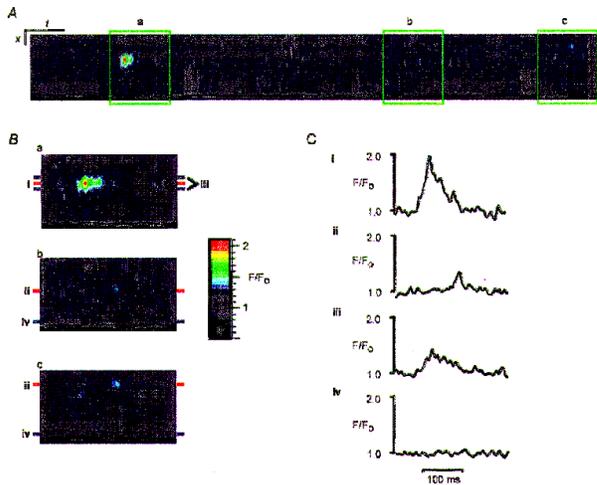
**Figura 5C**

**Figura 5.** Solución analítica de la ecuación de difusión simple. (A) Concentración en función de la posición y el tiempo. (B) Concentración vs posición, en tiempos diferentes. (C) Concentración vs tiempo, en puntos diferentes del dominio

la difusión encontrada en este experimento “in silico” se debe al hecho de no haber considerado la acción del buffer Calmodulina (Figura 6).

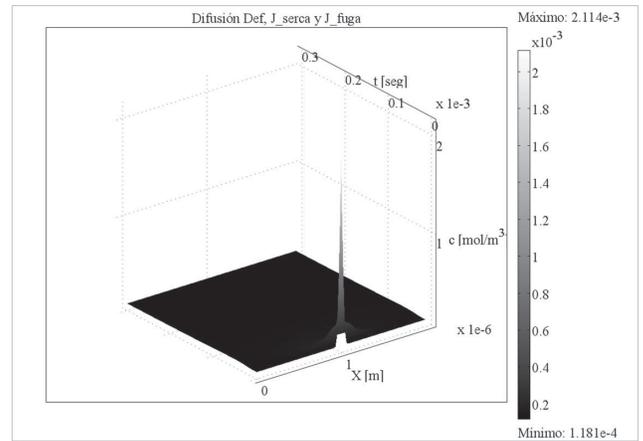
Obsérvese que la escala de tiempo usada para evidenciar los cambios en la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  en puntos alejados del sitio de liberación es 10 veces más grande,  $10^{-4}$  [s] que la usada para evidenciar los cambios en locaciones más cercanas al sitio de liberación  $10^{-5}$  [s].

Respecto al cambio de la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  se pasa de la concentración basal  $1,19 \cdot 10^{-4}$  [mol/m<sup>3</sup>] a un pico de concentración en el sitio de la liberación de  $2,11 \cdot 10^{-3}$  [mol/m<sup>3</sup>]; es decir, aproximadamente 17 veces mayor que la concentración basal; después de alcanzado el EE se observa que la concentración citosólica es aproximadamente 1,4 veces mayor que la concentración basal.

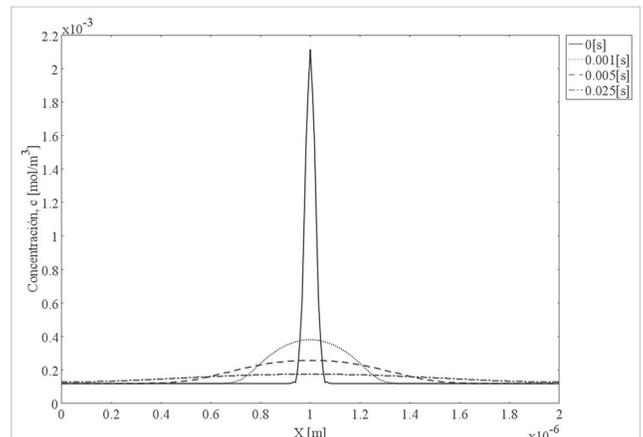


**Figura 6.** Evolución temporal de  $[Ca^{2+}]$  obtenida con microscopía confocal de barrido para diversas locaciones. FUENTE: Gordienko et al. 1998

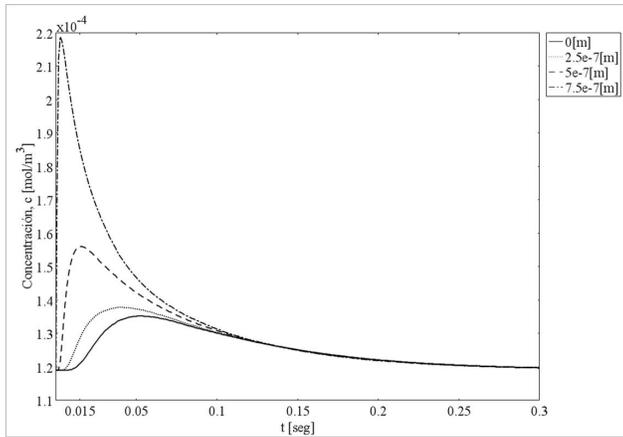
$Ca^{2+}$  en el citosol ( $\approx 1,7 \cdot 10^{-4}$  [mol/m<sup>3</sup>]) está por encima de la concentración basal ( $1,19 \cdot 10^{-4}$  [mol/m<sup>3</sup>]). Por esta razón incluimos en nuestro modelo el flujo de SERCA ( $J_{SERCA}$ ) y el flujo de FUGA ( $J_{FUGA}$ ) operando simultáneamente, los cuales sumados evitan que una vez alcanzada la concentración basal de  $[Ca^{2+}]$  disminuya posteriormente. También podemos observar que el tiempo que tarda la difusión en alcanzar un estado estacionario 3[ms], es muy corto en comparación con el tiempo de duración del “spark” de  $Ca^{2+}$  encontrado en el músculo liso (guinea pig) por microscopía confocal (Launikonis et al. 2005), el cual está entre 150 [ms] y 340 [ms] (Gordienko et al. 1998). Como demostraremos posteriormente la corta duración de



**Figura 7A**



**Figura 7B**



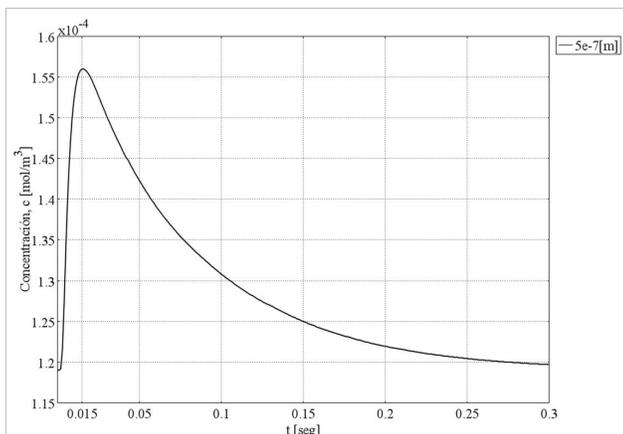
**Figura 7C**

**Figura 7.** Difusión-Reacción para el disparo del canal central de RyR y la acción de  $J_{SERCA}$  y  $J_{FUGA}$ .

- (A) Concentración en función de la posición y el tiempo.
- (B) Concentración vs posición, en tiempos diferentes.
- (C) Concentración vs tiempo, en puntos diferentes del dominio

**3. Difusión-Reacción con: i) Disparo del canal central de RyR en  $t=0[s]$ , ii)  $D_{ef} = D_c / (1 + \Theta)$ , iii) Acción simultánea de  $J_{SERCA}$  y  $J_{FUGA}$ .**

El comportamiento de la concentración del ión  $Ca^{2+}$  debido a la liberación de  $Ca^{2+}$  desde un único canal de RyR central ( $x=1[\mu m]$ ), considerando la acción de la Calmodulina y el efecto de  $J_{SERCA}$  y  $J_{FUGA}$ , observamos que el tiempo para alcanzar el EE es menor que 300 [ms] (Figura 7C). Las concentraciones en los puntos cercanos y alejados del canal alcanzan su máximo por debajo de los 50 [ms]. Existe un buen acuerdo entre el tiempo para alcanzar el EE obtenido en este experimento y los valores publicados previamente para la duración de un spark (Niggli, 1999; Cheng & Lederer, 2008) de músculo liso (Gordienko et al. 1998).

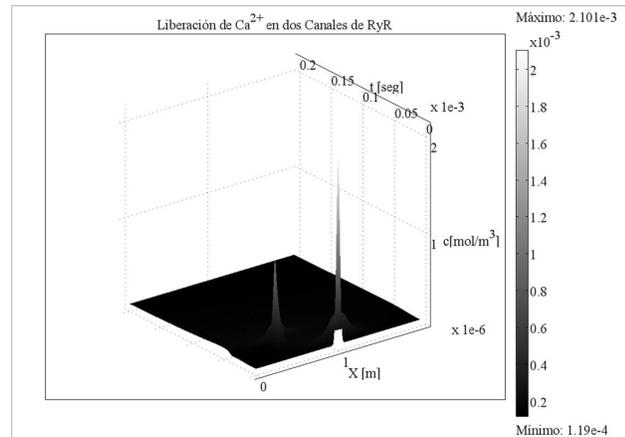


**Figura 8.** Concentración vs tiempo en  $x = 0.5 [\mu m]$ . Difusión del disparo en  $t = 0 [s]$  del canal central de RyR

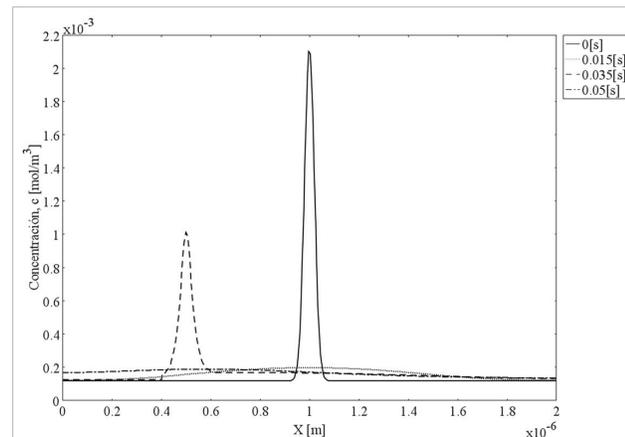
**4. Difusión-Reacción con i) disparo de un segundo canal de RyR por la acción de la difusión de  $Ca^{2+}$  luego del disparo del canal central en  $t=0[s]$ , ii)  $D_{ef} = D_c / (1 + \Theta)$ , iii) Acción simultánea de  $J_{SERCA}$  y  $J_{FUGA}$ .**

El disparo de un canal de RyR puede activar el disparo de otros canales de RyR cercanos los cuales son más sensibles a los cambios de la  $[Ca^{2+}]$  que el canal central (es un hallazgo experimental); es decir, los receptores RyR laterales se disparan con un umbral de concentración de  $Ca^{2+}$  menor, pero también liberan menor cantidad de  $Ca^{2+}$  al citosol. En este experimento definimos un umbral de concentración para el segundo canal de RyR ubicado en  $x=0,5[\mu m]$ , como el máximo valor de la concentración de  $Ca^{2+}$  alcanzando en el proceso de difusión para un solo canal central de RyR, en la posición del segundo canal, lo cual ocurre para  $t = 15[ms]$  (Figura 8).

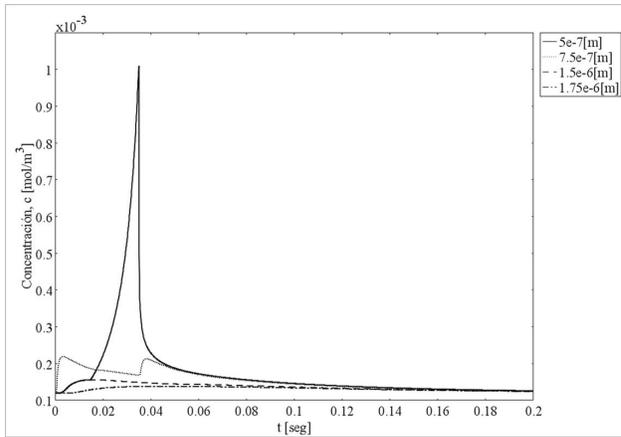
En la Figura 9C, se puede observar que la línea sólida ( $x = 0,5[\mu m]$ ) inicialmente no se hace evidente porque tiene superpuesta la línea a trozos ( $x = 1,5[\mu m]$ ) ya que estos puntos se encuentran equidistantes del centro y por lo tanto la concentración tiene los mismos valores debido al proceso de difusión desde el canal central, luego se ve que el canal



**Figura 9A**



**Figura 9B**



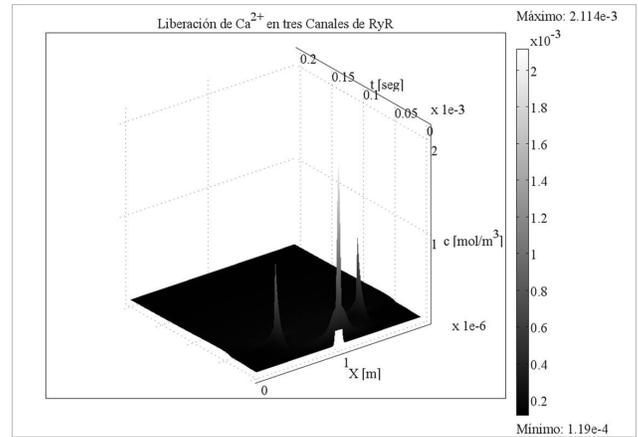
**Figura 9C**

**Figura 9.** Difusión-Reacción para el disparo de un segundo canal de RyR activado por la difusión del disparo del canal central en  $t = 0[s]$ . (A) Concentración en función de la posición y el tiempo. (B) Concentración vs posición, en tiempos diferentes. (C) Concentración vs tiempo, en puntos diferentes del dominio

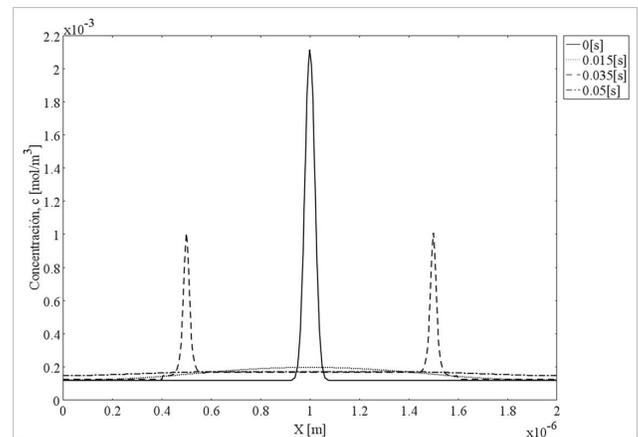
de RyR en  $x = 0,5[\mu\text{m}]$  es activado en el momento en el cual la concentración alcanza su máximo. Cuando el segundo canal cesa la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , el proceso de difusión y la acción de  $J_{\text{SERCA}}$  disminuyen rápidamente el valor de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el punto  $x = 0,5[\mu\text{m}]$ . Se observa también que para puntos alejados del segundo canal (puntos  $1,5[\mu\text{m}]$  y  $1,75[\mu\text{m}]$ ) el disparo del segundo canal no afecta de manera significativa la  $[\text{Ca}^{2+}]$  lo cual se debe a la acción de  $J_{\text{SERCA}}$  que va atenuando el incremento de la concentración debido a este segundo disparo. Se observa que para el punto  $x = 0,75[\mu\text{m}]$  ubicado entre RyR1 y RyR2 hay una oscilación en la  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

**5. Difusión-Reacción con: i) Disparo simultáneo de dos canales de RyR por la acción de la difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  luego de un disparo inicial en  $t = 0[s]$ ; ii)  $D_{\text{ef}} = D_c / (1 + \Theta)$ ; iii) Acción simultánea de  $J_{\text{SERCA}}$  y  $J_{\text{FUGA}}$ .**

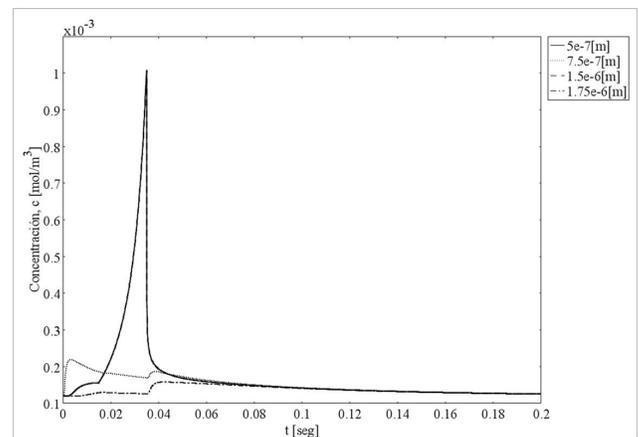
En este experimento (Figura 10), observamos el disparo de un canal de RyR central ( $x = 1[\mu\text{m}]$ ;  $2,1[\text{mmol}/\text{m}^3]$ ) en  $t = 0 [s]$ , seguido del disparo en  $t=0,015[s]$  de dos canales de RyR laterales ( $x = 0,5[\mu\text{m}]$  y  $x = 1,5[\mu\text{m}]$ ) de menor intensidad ( $1,1[\text{mmol}/\text{m}^3]$ ). En  $x = 1,5[\mu\text{m}]$  (sobre el tercer canal de RyR), ocurre un aumento leve de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  debido a la difusión hasta ese sitio del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por el canal central, después se aprecia un aumento brusco de la misma debido al disparo del propio canal RyR3. Se observa que para  $x = 0,75[\mu\text{m}]$  (entre los canales 1 y 2 de RyR) la concentración aumenta por el disparo del primer canal, luego decae por acción de  $J_{\text{SERCA}}$  y la difusión, luego vuelve a aumentar producto del segundo disparo del canal de RyR



**Figura 10A**



**Figura 10B**



**Figura 10C**

**Figura 10.** Difusión-Reacción para el disparo de dos canales de RyR activados por la difusión del disparo del canal central en  $t = 0[s]$ . (A) Concentración en función de la posición y el tiempo. (B) Concentración vs posición, en tiempos diferentes. (C) Concentración vs tiempo, en puntos diferentes del dominio

de menor intensidad, dando como resultado una oscilación de concentración que luego decae al valor basal. El mismo comportamiento ocurre para  $x = 1,75$  [ $\mu\text{m}$ ], aumenta levemente por la acción del disparo del primer canal (por estar este punto más alejado del canal de mayor intensidad) y posteriormente aumenta por acción del disparo del tercer canal, para finalmente decaer hasta la concentración basal.

**6. Difusión-Reacción con:** i) disparo de tres canales de RyR, el canal central activado en  $x = 1$  [ $\mu\text{m}$ ] y  $t = 0$  [s], luego el segundo canal se dispara en  $x = 0,5$  [ $\mu\text{m}$ ] y  $t = 0,015$  [s] y el tercer canal se dispara en  $x = 1,5$  [ $\mu\text{m}$ ] y  $t = 0,040$  [s] y, ii)  $D_{ef} = D_c / (1 + \Theta)$ , iii) Acción simultánea de  $J_{SERCA}$  y  $J_{FUGA}$ .

A diferencia de lo que ocurre en la Figura 10 C de la cual no se observa la línea a trozos porque está sobrepuesta con la línea sólida, en la Figura 11C sí puede apreciarse la curva de concentración vs tiempo para  $x = 0,5$  [ $\mu\text{m}$ ] (línea sólida) y  $x = 1$  [ $\mu\text{m}$ ] (línea a trozos) porque los disparos de RyR2 y RyR3 ocurren en instantes de tiempo diferentes. Los canales 2 y 3 de RyR se activan en instantes de tiempo distintos porque sus umbrales son diferentes (Figura 11C). En el instante de activación del canal 3 ( $x = 1,5$  [ $\mu\text{m}$ ]) el valor de  $[\text{Ca}^{2+}]$  está por debajo del valor que tiene la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cuando se abre el canal 2 ( $x = 0,5$  [ $\mu\text{m}$ ]). Al igual que en el experimento anterior, existen puntos en el dominio ( $x=0,75$  [ $\mu\text{m}$ ] y  $x=1,75$  [ $\mu\text{m}$ ]) donde se observan oscilaciones debido a disparos subsiguientes de los canales de RyR cerca del punto de observación.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El modelo unidimensional elaborado demostró que la difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  sin considerar la acción de buffers en la movilidad del ión  $\text{Ca}^{2+}$  alcanza su estado estacionario a los 3[ms] lo cual es muy rápido en comparación con los tiempos mostrados por microscopia láser confocal de barrido para la duración de un “spark” de  $\text{Ca}^{2+}$  de músculo liso de ileum de guinea pig que está entre los 150 – 340 [ms]. Al considerar la acción de la Calmodulina como único buffer se observó que el tiempo de relajación (tiempo en el cual el “spark” alcanza el estado basal o estado estacionario) es mayor que 160[ms], lo cual está de acuerdo con medidas experimentales previamente publicadas.

2. Se realizaron experimentos computacionales “in silico” de difusión-reacción para:

- El disparo de un canal central en  $t = 0$  [s], efecto del buffer y la acción de  $J_{SERCA}$  y  $J_{FUGA}$ , donde se analizó el comportamiento de la concentración en función del

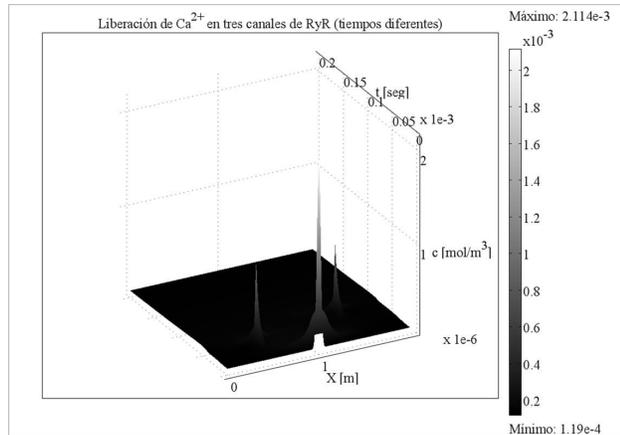


Figura 11A

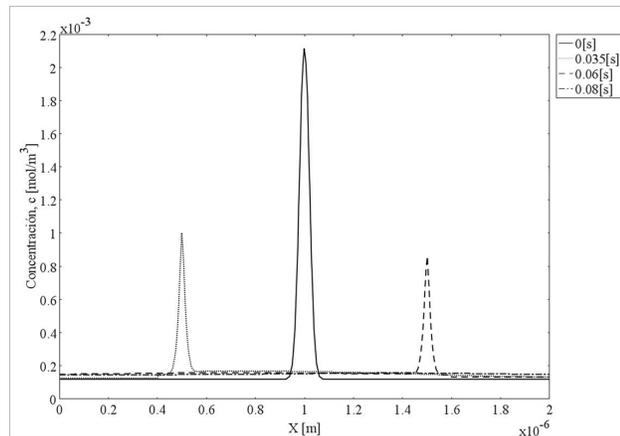


Figura 11B

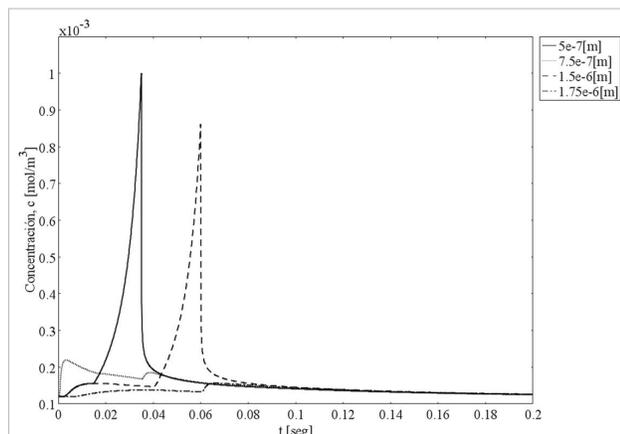


Figura 11C

**Figura 11.** Difusión-Reacción para el disparo de tres canales de RyR activados en tiempos diferentes.  
(A) Concentración en función de la posición y el tiempo.  
(B) Concentración vs posición, en tiempos diferentes.  
(C) Concentración vs tiempo, en puntos diferentes del dominio

tiempo para distintos puntos del dominio, y se determinó que la acción simultánea de  $J_{SERCA}$  y  $J_{FUGA}$  no permite que la concentración de  $Ca^{2+}$  disminuya por debajo del valor basal cuando la difusión llega a su estado estacionario.

- El disparo de dos canales de RyR, el canal central ( $x = 1[\mu m]$  y  $t = 0[s]$ ) y el canal 2 ( $x = 0,5[\mu m]$  y  $t = 0,015[s]$ ), se observa que para los puntos alejados del segundo canal ( $x = 1,5[\mu m]$  y  $x = 1,75[\mu m]$ ) el disparo del mismo no cambia el valor de la  $[Ca^{2+}]$  porque la acción de  $J_{SERCA}$  supera la difusión del segundo disparo.

- El disparo de tres canales de RyR, el canal 1 central ( $x = 1[\mu m]$  y  $t = 0[s]$ ), el canal 2 ( $x = 0,5[\mu m]$  y  $t = 0,015[s]$ ) y el canal 3 ( $x = 1,5[\mu m]$  y  $t = 0,015[s]$ ). Se analizó el comportamiento de la concentración en función del tiempo para distintos puntos del dominio observándose oscilaciones debido al disparo del segundo y tercer canal de RyR que luego es atenuado por la acción de  $J_{SERCA}$ .

- El disparo de tres canales de RyR, el canal 1 central ( $x = 1[\mu m]$  y  $t = 0[s]$ ), el canal 2 ( $x = 0,5[\mu m]$  y  $t = 0,015[s]$ ) y el canal 3 ( $x = 1,5[\mu m]$  y  $t = 0,040[s]$ ). Se evidenció que la concentración en función del tiempo para distintos puntos del dominio presenta oscilaciones debido al disparo del segundo y tercer canal de RyR que luego es atenuado por la acción de  $J_{SERCA}$ .

3. Se recomienda elaborar modelos donde se incorporen la acción de los sumideros representados por el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  y las bombas de  $Ca^{2+}$  del sarcolema (PMCA). Extender los modelos a dominios bidimensionales y tridimensionales, en coordenadas rectangulares y cilíndricas.

## REFERENCIAS

CHENG, H. & LEDERER, W. (2008). Calcium Sparks. *Physiol. Rev.* 88; pp. 1491–1545.

COMSOL, (2007). *Multiphysics User's Guide*.

CRANK, J. (1956). *The Mathematics of Diffusion*. Great Britain: Oxford.

FILL, M. & COPELLO, J. (2002). Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol. Rev.* 82 (4); pp. 893-922.

GORDIENKO, D., BOLTON, T., CANNELL, M. (1998). Variability in spontaneous subcellular calcium release in guinea-pig ileum smooth muscle cells. *J. Physiol.* 507 (3); pp. 707-720.

GUYTON, A. & HALL, J. (2006). *Fisiología Médica*. (11ava Edición). España: Elsevier.

HUTTON, D. (2004). *Fundamentals of Finite Element Analysis*. USA: McGraw-Hill.

JAGGAR, J., STEVENSON, A., NELSON, M. (1998). Voltage dependence of  $Ca^{2+}$  spark in intact cerebral arteries. *J. Physiol. Cell Physiol.* 274; pp 1755-1761.

KARGACIN, G. & FAY, F. (1991).  $Ca^{2+}$  movement in smooth muscle cells studies with one and two dimensional diffusion models. *Biophys. Soc.* 60; pp 1088-1100.

KEENER, J. & SNEYD, J. (1998). *Mathematical Physiology*. New York: Springer-Verlag.

LAUNIKONIS B., ZHOU J., ROYER L., SHANNON, TH., BRUM G., RIOS, E. (2005). Confocal imaging of  $[Ca^{2+}]$  in cellular organelles by SEER, shifted excitation and emission ratioing of fluorescence. *J. Physiol.* 567 (2); pp. 523-543.

NIGGLI, E. (1999). Localized intracellular calcium signaling in muscle: Calcium Sparks and Calcium Quarks". *Annu. Rev. Physiol.* 61; pp. 311-335.

POCOCK, G. & RICHARDS, C. (2005). *Fisiología Humana*. La base de la Medicina. (2da Edición). España: Masson.

PATHRIA, R. (1972): *Statistical Mechanics*. Great Britain: Pergamon.

PRYOR, R. (2011). *Multiphysics modeling using COMSOL*. USA: John and Bartlett.

RUBINOW, S. (1975). *Introduction to Mathematical Biology*. New York: John Wiley & Sons.

RUMER, Y. & RYVKIN, M. (1980). *Thermodynamics, Statistical Physics, and Kinetics*. Moscú: Mir.

SARAVÍ, F. (2008). *Funcionamiento del Organismo: El músculo liso vascular*. Argentina.

VOLKENSTEIN, M. (1985). *Biofísica*. Moscú: Mir.

YANG, X. (2006). Computational modelling of nonlinear calcium waves. *App. Math. Modelling.* 30; pp. 200-208.

