

INDICE

INTRODUCCION.....	4
CAPITULO I: REVISION BIBLIOGRAFICA.....	6
I.1. La Célula, membrana celular y retículo sarcoplasmático.....	7
I.2. Músculo esquelético de mamífero, aspectos histológicos. Miofibrillas.....	11
I.3. Túbulos T (TT) y Tríadas.....	14
I.4. Espacio entre Túbulos T (TT) y Retículo Sarcoplasmático (RS) (Cleft ó Juntional Sarcoplasmatic Reticulum).....	15
I.5. Canales-Receptores de Dihidropiridina (DHPR) y Rianodina (RyR).....	16
I.6. Calcio en la contracción muscular.....	18
I.7. Mecanismos de liberación del ión calcio.....	20
I.8. Sparks y Quarks de Ca^{+2}	21
I.9. Relajación y Buffer de Calcio (CSQ y PV).....	24
I.10. Difusión química.....	26
I.11. Ecuación difusión-reacción para el ión calcio.....	28
I.12. Ecuaciones y modelos matemáticos.....	35
I.13. Modelaje.....	35
I.14. Antecedentes.....	35
I.15. Justificación.....	37
CAPITULO II: METODOLOGÍA.....	40
II.1. Técnica numérica utilizada.....	41
II.2. Modelos utilizados.....	45
II.3. Programas computacionales.....	47
II.3.1 Código del programa de difusión simple.....	47
II.3.2 Código del programa difusión-reacción 1 canal de RyR.....	49
II.3.3 Código del programa difusión-reacción 2 canales de RyR.....	51
II.3.4 Código del programa difusión-reacción 3 canales de RyR.....	53
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	55

III.1. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN NÚMERICA.....	56
III.2. EXPERIMENTOS “IN SILICO”.....	57
III.2.1 COMPORTAMIENTO DE LA DIFUSIÓN SIMPLE CON UNA CONCENTRACIÓN INICIAL UNIFORME EN TODO X (SIN DISPARO DE RECEPTORES DE RYR).....	57
III.2.2 DIFUSIÓN SIMPLE. COMPORTAMIENTO DE LA FUNCION DELTA CON LA DESVIACION ESTÁNDAR SIGMA.....	59
III.2.3. DIFUSIÓN SIMPLE. COMPORTAMIENTO DE LA FUNCION DELTA CON EL FACTOR PRE-EXPONENCIAL A.....	66
III.2.4. DIFUSIÓN-REACCIÓN. INFLUENCIA DE h ($=r(1+\alpha)$) SOBRE LA CONCENTRACIÓN SIN INTERRUPTOR DE LA BOMBA SERCA.....	68
III.2.5 DIFUSIÓN-REACCIÓN. INFLUENCIA DE h SOBRE LA CONCENTRACIÓN CON INTERRUPTOR DE LA BOMBA SERCA.....	75
III.2.6 DIFUSIÓN-REACCIÓN. INFLUENCIA DE h SOBRE LA CONCENTRACIÓN CON INTERRUPTOR DE LA BOMBA SERCA	77
III.2.7 DIFUSIÓN-REACCIÓN. DISPARO DE UN SEGUNDO CANAL DE RYR BAJO LA ACCIÓN DE UN UMBRAL DE CONCENTRACIÓN.....	79
III.2.8 DIFUSIÓN-REACCIÓN. DISPARO DE UN SEGUNDO CANAL DE RYR BAJO LA ACCIÓN DE UN UMBRAL DE CONCENTRACIÓN.....	81
III.2.9 DIFUSIÓN-REACCIÓN. DISPARO DE TRES CANALES DE RYR BAJO LA ACCIÓN DE UN UMBRAL DE CONCENTRACIÓN.....	83
III.2.10 DIFUSIÓN-REACCIÓN. DISPARO DE UN SEGUNDO CANAL DE RYR BAJO LA ACCIÓN DE UN UMBRAL DE CONCENTRACIÓN.....	85
III.3 MODELO TRIDIMENSIONAL DE UN FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA.....	87
CONCLUSIONES.....	92
ANEXOS.....	94
Apéndice I.....	95
Apéndice II.....	97

Apéndice III.....	100
Apéndice IV.....	103
REFERENCIAS	105
RECOMENDACIONES.....	108
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	109

INTRODUCCIÓN

El incremento instantáneo de la concentración del ión Ca^{+2} en el citosol tras un estímulo nervioso inicia la contracción muscular. La contracción muscular desde el punto de vista químico se inicia con la interacción del ión calcio con la proteína denominada troponina C.

Esta variación de la concentración de calcio iónico intracelular está gobernada por un acoplamiento entre el estímulo neural y los mecanismos de liberación del ión calcio al citosol a través de receptores-canales y reservorios de Ca^{+2} ubicados dentro de la célula.

La mayor cantidad de Ca^{+2} está ubicado en reservorios o cisternas (Retículo Sarcoplásmico, RS) y se encuentra asociado a una proteína llamada calsequestrina (CSQ), este al ser liberado desde el RS, al activarse los canales de Rianodina (RyR), difunde hacia el citosol hasta llegar a los sitios de unión con la troponina-C produciéndose finalmente la contracción muscular. Una vez que termina la actividad contráctil, este calcio libre es retornado al RS bien sea por bombeo activo de SERCA como proceso principal de recaptura de calcio o es bufferado a través de proteínas (parvalbúmina y calmodulina). Realmente el bufferado de proteínas ligantes de Ca^{+2} comienza desde el momento en que el ión calcio es liberado al citosol. Dentro del RS el Ca^{+2} libre se mantiene en equilibrio con el calcio atrapado por la proteína calsequestrina (CSQ).

La difusión de la concentración del ión calcio es el producto de pequeñas “explosiones” de concentración del ión calcio (sparks) que a su vez se componen de estallidos de menor intensidad (quarks). Esto ha sido observado a través de técnicas experimentales como la fluorescencia con escáner confocal lineal.

En este trabajo se desarrollará un modelo matemático usando ecuaciones en derivadas parciales (EDP) a partir de leyes físico-químicas (ecuación de difusión-

reacción) que permitirá modelar la dinámica de la evolución de la concentración del ión calcio en el citosol en una célula de músculo esquelético.

Suponiendo una cinética rápida para el bufferado y cinéticas de diferentes órdenes para otras fuentes y sumideros del ión calcio (flujo de Ca^{+2} a través de la membrana celular, mitocondrial y del retículo sarcoplásmico) se obtiene una ecuación en derivadas parciales, cuyo caso mas simple es la ecuación de Fisher que puede ser resuelta con métodos numéricos de diferencias finitas (métodos explícitos e implícitos) y diversos métodos de elementos finitos.

La elaboración de un programa que obtenga la solución numérica por diferencia finita se puede realizar con MATLAB[®]. También se pueden obtener resultados por elementos finitos utilizando FEMLAB[®] o su versión más reciente COMSOL[®]. En este trabajo se seguirá el primer procedimiento.

Las células de músculo esquelético presentan una geometría mas simple que la correspondiente a células cardíacas, lo cual conlleva a modelos mas sencillos.

Como objetivos principales de este trabajo, nos planteamos los siguientes:

- a.- Elaborar un modelo geométrico unidimensional de las principales estructuras vinculadas con la liberación de calcio hacia el citosol (RyR), con las fuentes y sumideros de ión calcio (los canales de RyR y la bomba del retículo sarcoplásmico -SERCA-).
- b.- Elaborar un modelo físico-químico que incorpore la participación de las estructuras anteriores y una proteína buffer en la dinámica del calcio citosólico.
- c.- Elaborar programas computacionales en MATLAB[®] para resolver numéricamente la ecuación en derivadas parciales obtenida y representar visualmente la evolución temporal de la concentración del Ca^{+2} en el citosol para diversas localizaciones.
- d.- Elaborar un modelo geométrico tridimensional, dinámico e interactivo, de las principales estructuras celulares (sarcolema, miofibrillas, retículo sarcoplásmico, mitocondria y núcleo) con el fin de realizar simulaciones con técnicas de elemento finito.

CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1. La Célula, membrana celular, retículo sarcoplasmático (RS) y miofibrillas.

La unidad funcional mas pequeña que sustenta la vida es la célula (Figura 1), existen muchos tipos de células, todas ellas con diferencias microscópicas pero tienen en común ciertos rasgos estructurales. En el hombre existen más de 100 tipos de células diferentes, cada una cumpliendo funciones distintas. ^[1]

La célula puede ser dividida en dos partes importantes; el núcleo (también llamado nucleoplasma) y el citoplasma, que es todo lo que rodea al núcleo, en ambos compartimientos se encuentran un conjunto de componentes celulares que pueden ser clasificados como organelos e inclusiones dependiendo del rol que desempeñan. ^[1,2]

Los organelos son estructuras que se consideran metabólicamente activas y que realizan funciones esenciales específicas, las inclusiones por el contrario se consideran como acúmulos metabólicamente inertes y se toman como componentes no indispensables y muchas veces transitorios. ^[1,2]

Se puede encontrar una tercera categoría denominada componentes citoesqueléticos (microfilamentos, filamentos intermedios y túbulos). ^[1,2]

Los organelos celulares y las inclusiones están suspendidas en la matriz citoplasmática, que está formada por una fase líquida (citósol) que ocupa los intersticios de una red compleja tridimensional de componentes fibrilares que forman el citoesqueleto. ^[1,2]

Cada organelo de la célula está limitado por una fina membrana de fosfolípidos y proteínas que a menudo tiene una estructura interna compleja. ^[1,2]

La membrana celular es el límite externo de la célula (Figura 2), también llamado plasmalema (en las células musculares se denomina sarcolema). Tiene una organización molecular compleja y es capaz de llevar a cabo múltiples funciones entre las cuales está la regulación del movimiento de iones, macromoléculas y gases hacia dentro y fuera de ella; posee dispositivos para la unión y comunicación intercelular,

bombas de iones, moléculas transportadoras e intercambiadoras, para regular el ambiente interno de la célula, receptores de hormonas y mecanismos para producir moléculas mensajeras que activan respuestas fisiológicas a determinados estímulos. [1,2]

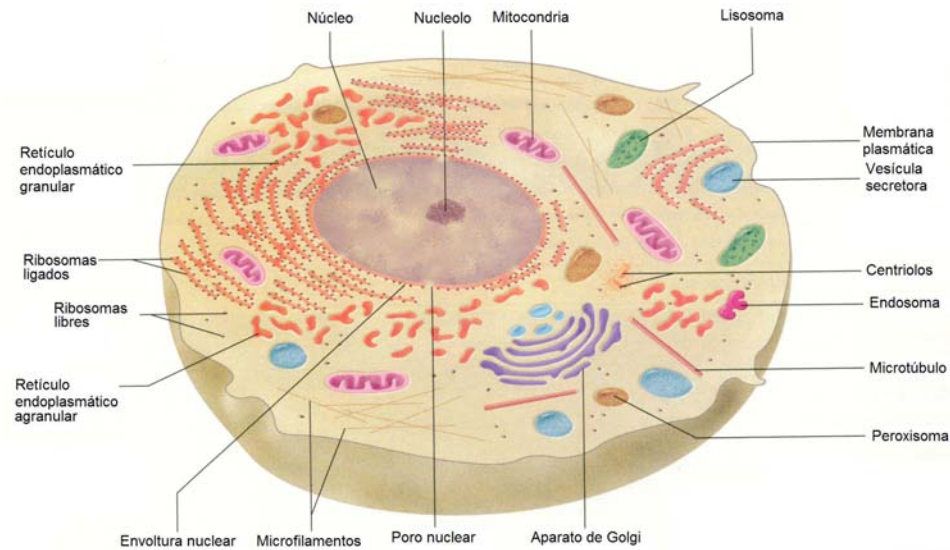


FIGURA 1: Representación de una célula y sus elementos. **FUENTE:** Vander A, Sherman J., Luciano D. Human Physiology. The mechanisms of Body Function. 2001. 8th edition. Mc-Graw-Hill. USA.

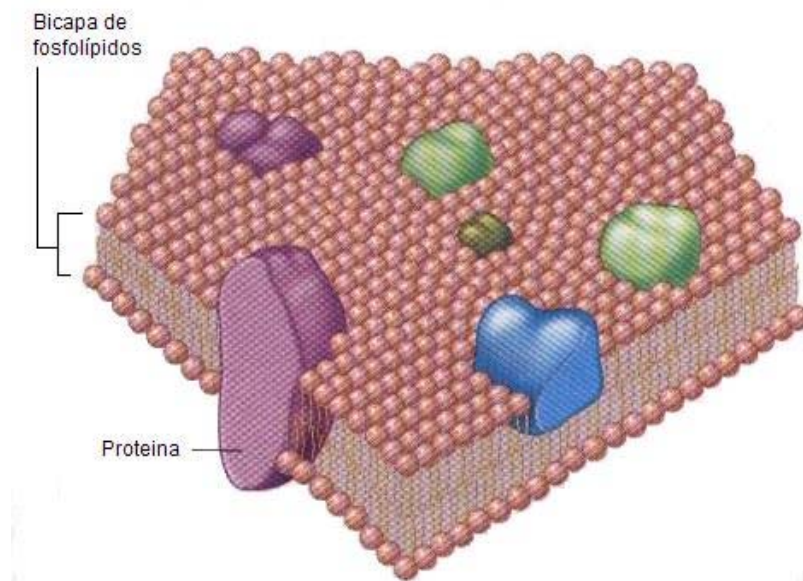


FIGURA 2: Representación de la membrana celular. **FUENTE:** Vander A, Sherman J., Luciano D. Human Physiology. The mechanisms of Body Function. 2001. 8th edition. Mc-Graw-Hill. USA.

Está constituida por una capa bimolecular de fosfolípidos mixtos, orientados con sus extremos hidrofílicos hacia la superficie externa, en contacto con el fluido extracelular y sus cadenas hidrofóbicas se ubican hacia el interior de la doble capa. ^[1]

Gran parte de los procesos fisiológicos de las células se llevan a cabo en las superficies membranosas e interfases, una parte de las moléculas con actividad enzimática (que catalizan las reacciones químicas) se ubican en la superficie de la membrana celular (que separa a la célula del entorno) o en las membranas internas (que separan los organelos del citoplasma). Esta compartimentación celular es de suma importancia para la vida celular, las membranas mantienen separados a enzimas y sustratos en un determinado momento, permite su interacción controlada debido a la permeabilidad de la membrana y a la velocidad de transporte a través de esta. ^[1]

Un organelo importante en la contracción muscular es el retículo sarcoplasmático (RS) o retículo endoplasmático (RE), es un sistema continuo de sarcotúbulos limitados por membranas y se extienden por todo el sarcoplasma y que forma una red de canales de malla fina en torno a cada miofibrilla y corre a lo largo de la fibra muscular. ^[3]

Estos organelos guardan una relación de volumen respecto a la célula que varía de una especie a otra y de un tipo de músculo a otro. En la tabla 1 se muestran las relaciones porcentuales de volumen de los principales organelos y espacios celulares en diferentes especies.

Tabla 1: Relación porcentual de volumen de diferentes estructuras celulares. **Fuente:** Donald M. Bers. Excitation-Contraction coupling and cardiac contractile force. 2001. Holanda. Kluwer.

	Miofibrilla	Mitocondria	Núcleo	Túbulo T	Junct.	RS libre	RS total	RS:TT
Rata Ventriculo	48.1	34	-	1.2	0.3	3.2	3.5	2.9
Cerdo Guinea Soleus	86.7	4.9	0.9	0.14	0.9	2.2	3.1	22.1
Cerdo Guinea White Vastus	82.0	1.9	0.15	0.27	1.6	3.0	4.6	17.0
Ratón Ventriculo	54.3	37.5	-	0.95	0.22	0.65	0.87	0.92

En el RS se distinguen dos regiones, los túbulos longitudinales y las vesículas o cisternas terminales (ver Figura 3) que son dilataciones locales que forman sacos. Se presenta con un patrón repetitivo y localizado que mantiene una relación constante entre las bandas de las miofibrillas estriadas (ver Figura 6). La función más importante del RS es almacenar y liberar Ca^{+2} . [3]

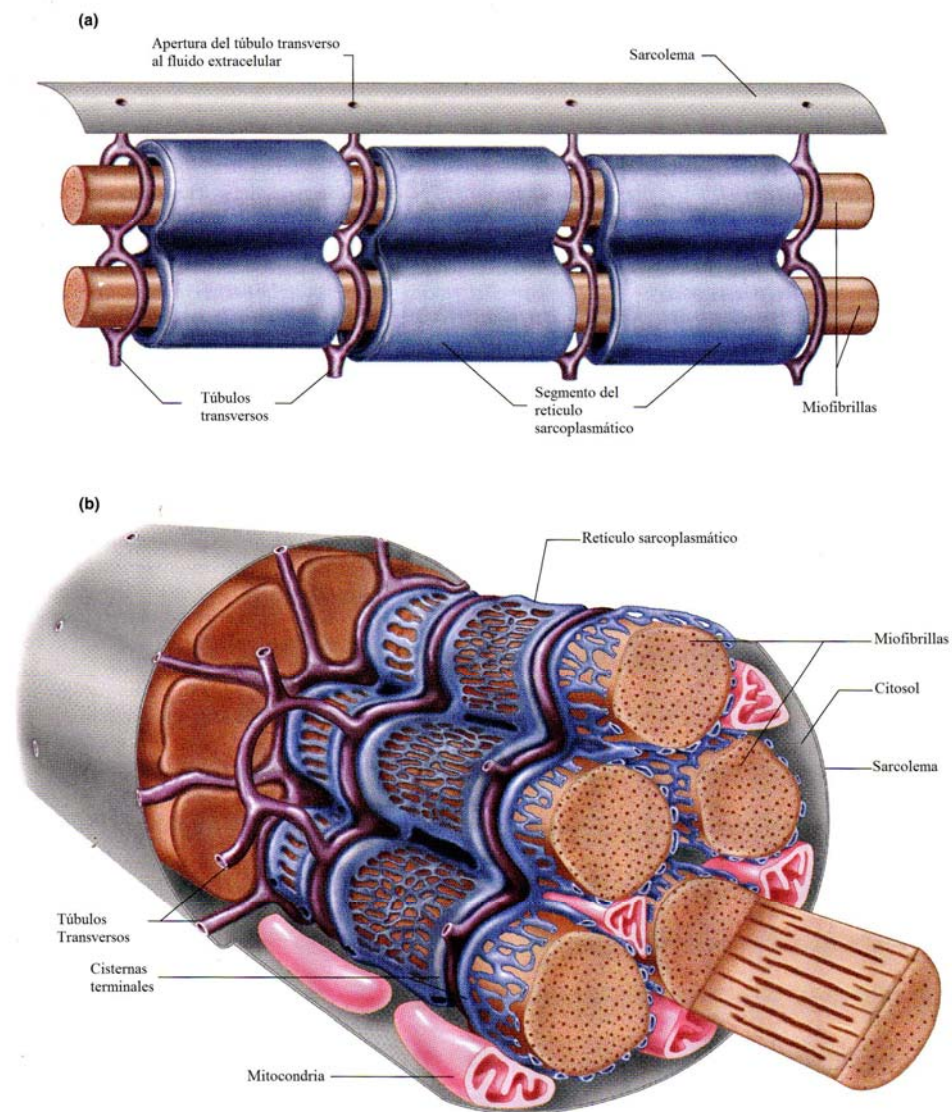


FIGURA 3: a) representación diagramática de la estructura interna de una célula de músculo esquelético, b) representación anatómica de una célula de músculo esquelético. **Fuente:** Vander A, Sherman J., Luciano D. Human Physiology. The mechanisms of Body Function. 2001. 8th edition. Mc-Graw-Hill. USA.

I.2. Músculo esquelético de mamífero, aspectos histológicos. Miofibrillas.

El músculo esquelético de mamífero tiene como unidad de organización histológica la fibra, esta es una célula larga, cilíndrica y multinucleada, un conjunto de numerosas de ellas forman los fascículos, que a su vez conforman el músculo. (ver Figura 4).

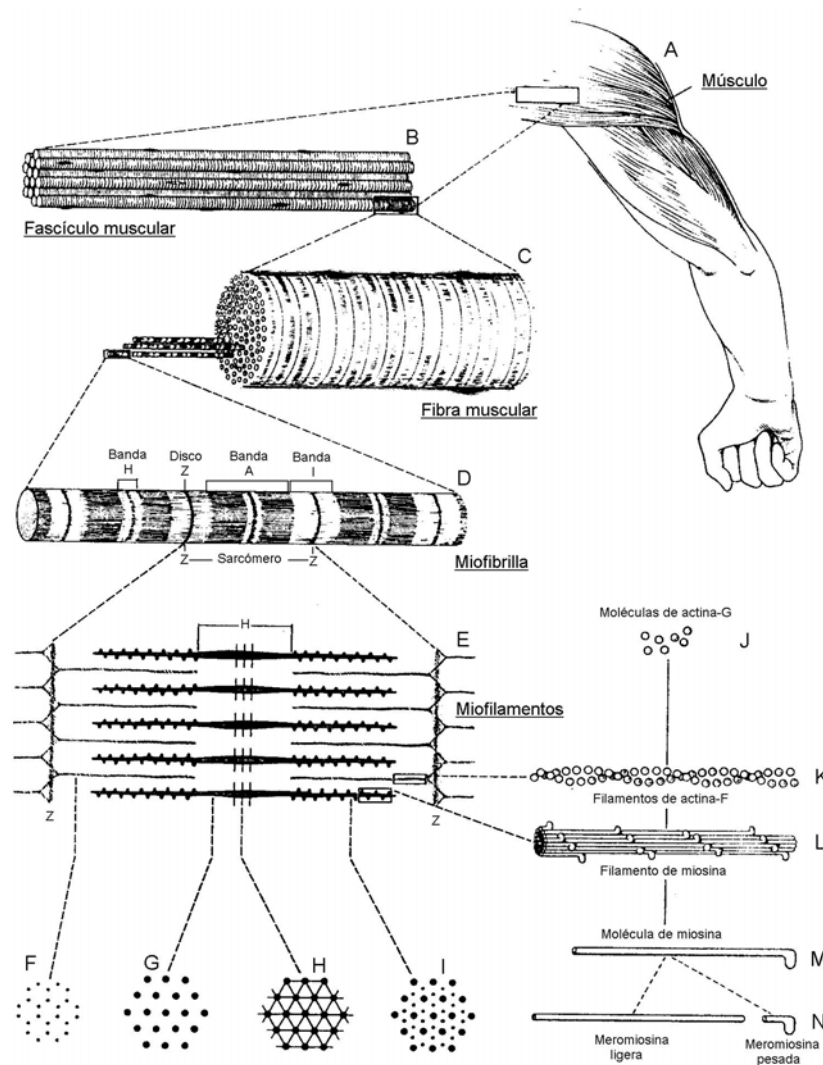


FIGURA 4: Esquema de la organización del músculo esquelético desde el nivel macroscópico al molecular. **Fuente:** Bloom-Fawcett. Tratado de histología. D.W. Fawcett. 11^{ava} edición. 1987.

Cada fibra, fascículo y músculo está recubierto por una capa delgada de tejido conjuntivo, llamados de diferente manera para facilitar su identificación. Este tejido sirve para integrar y unir las unidades contráctiles del músculo y finalmente su acción. [4,5]

Las fibras del músculo esquelético presentan dos tipos de estriaciones, las estriaciones longitudinales producidas por la sustancia contráctil en forma de miofibrillas, que a su vez están estriadas transversalmente debido a que cada miofibrilla está compuesta de segmentos cilíndricos o bandas de refringencia diferentes, que alternan de modo regular por toda la longitud. [5]

Las bandas observadas en las miofibrillas se denotan como bandas A y bandas I, la longitud relativa de las bandas varía dependiendo de si el músculo está en reposo, contraído activamente o estirado pasivamente. La banda A permanece constante durante todas las fases de la contracción, pero la banda I es más grande en el músculo estirado, más corta en la posición de reposo, y extremadamente corta en el músculo contraído. También se nota que hay una línea oscura transversal llamada línea Z que divide por la mitad a la banda I. (Figura 5) [3,5]

La unidad estructural repetida que comprende todos los ciclos de la contracción muscular es el sarcómero, que se define como el segmento comprendido entre dos líneas Z vecinas, esto incluye una banda A y la mitad de cada banda I contigua. Las bandas A, las bandas I y las líneas Z son las únicas estriaciones transversales observables pero se puede demostrar la existencia de una banda H dentro de la banda I y una línea M en el centro de la banda A. [3,5]

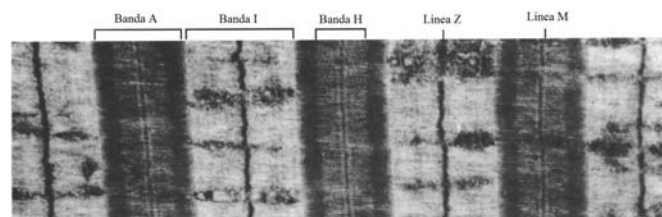


Figura 5: Micrografía electrónica de una sección de fibra muscular. **Fuente:** Ganong, W. F. (2002) Fisiología médica. 18ava edición en español. Editorial El Manual moderno.

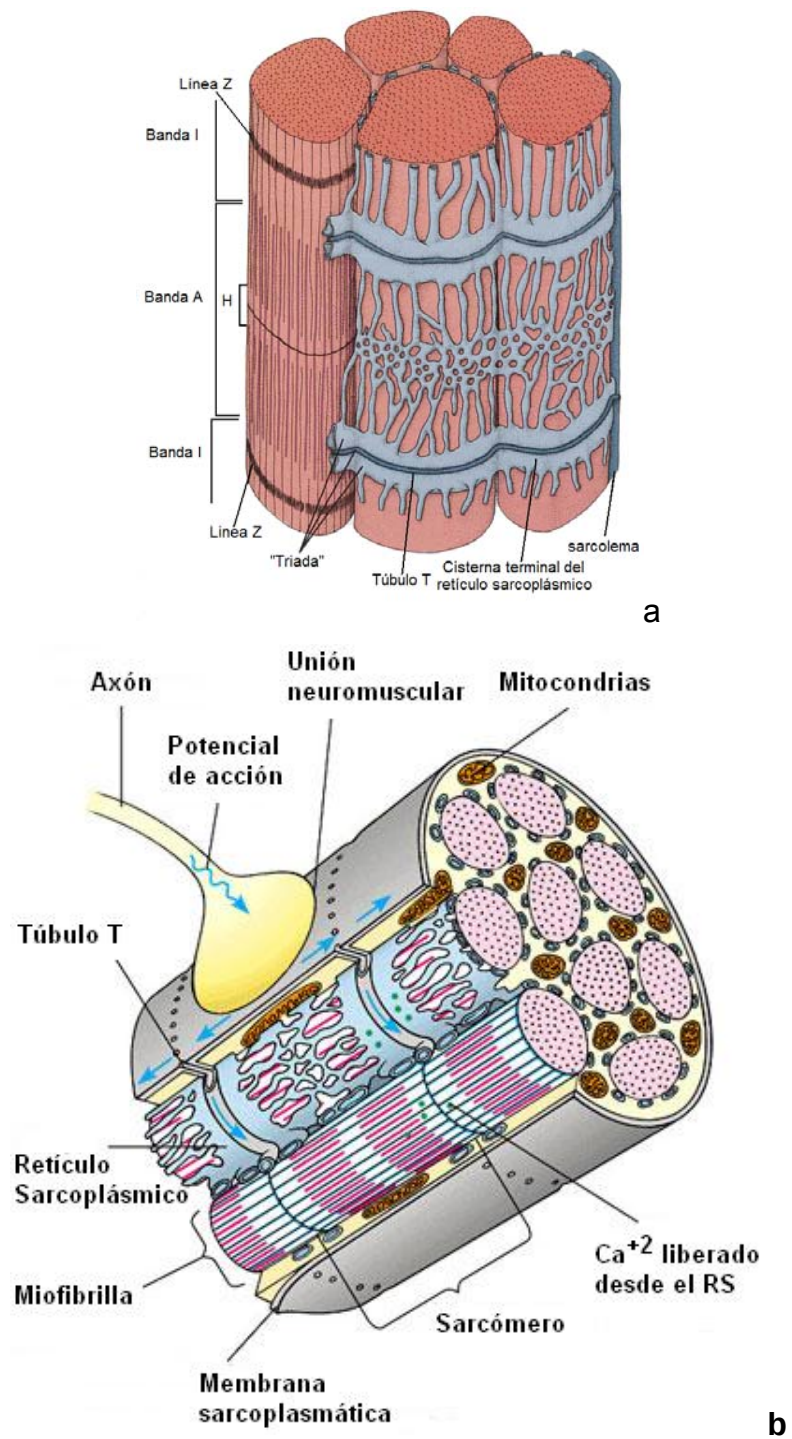


FIGURA 6: Representación tridimensional de una sección de célula de músculo esquelético. En ambas se observa el RS. FUENTE: a. b. <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/neuro/muscle.htm>

I.3. Túbulos T (TT) y Tríadas.

Los túbulos T forman la red que se localiza perpendicularmente al eje longitudinal de la fibra muscular y rodea a las miofibrillas con intervalos regulares, a cada lado del túbulo T se encuentran las cisternas y este conjunto se le llama triada. ^[3,5]

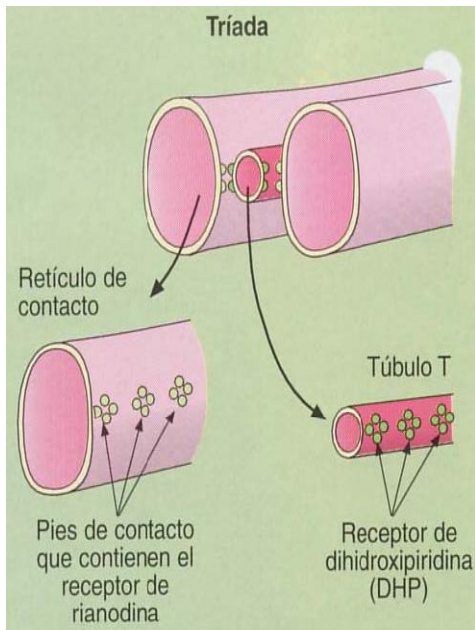


FIGURA 7: Dibujo esquemático de la distribución del retículo sarcoplásmico en torno a las miofibrillas del músculo esquelético de mamífero. Los sarcotúbulos longitudinales se reúnen en unas cisternas terminales transversales. El túbulo T transverso y delgado, penetra desde el sarcolema y está flanqueado por dos cisternas terminales. Se constituyen así las “triadas” del retículo. En músculo esquelético de mamífero hay dos triadas por sarcómero y están alineadas con las uniones de las bandas A con las bandas I. **Fuente:** Estudio de la fatiga muscular mediante estimulación de baja frecuencia. José H. Malén Arroyo. Universidad de Barcelona. España. Tesis Doctoral 2005.

En las fibras musculares de mamífero, por cada sarcómero (línea ZZ) existen dos zonas de túbulos T que coincide con la unión de la banda I y la banda A, en el caso de células musculares de anfibio las triadas coinciden con las líneas Z. ^[2]

I.4. Espacio entre Túbulos T (TT) y Retículo Sarcoplasmático (RS) (Cleft ó Juntional Sarcoplasmatic Reticulum)

El espacio existente entre los Túbulos T y el RS se llama “Cleft” o “Junctional Sarcoplasmic Reticulum” (“JSR”). En este espacio se encuentran las interacciones de los Receptores de DHPR en los túbulos y los receptores de RyR sobre el RS.

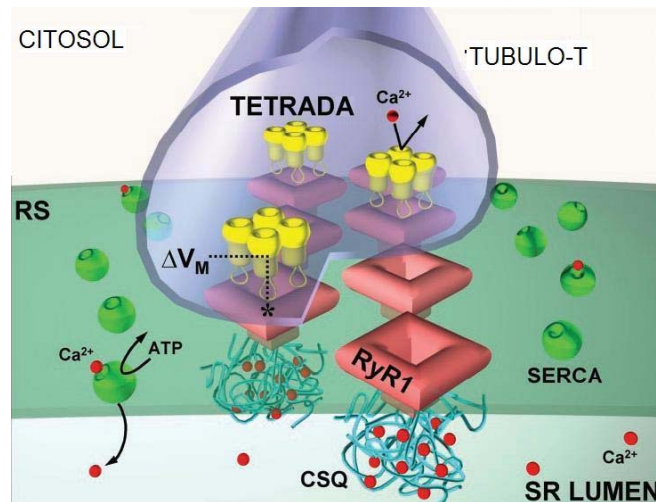


Figura 8: Representación tridimensional de la dinámica de calcio en el citosol. **Fuente:** Fill M. y Copello J. *Physiol Rev.* (2002). Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. 82: 893-922

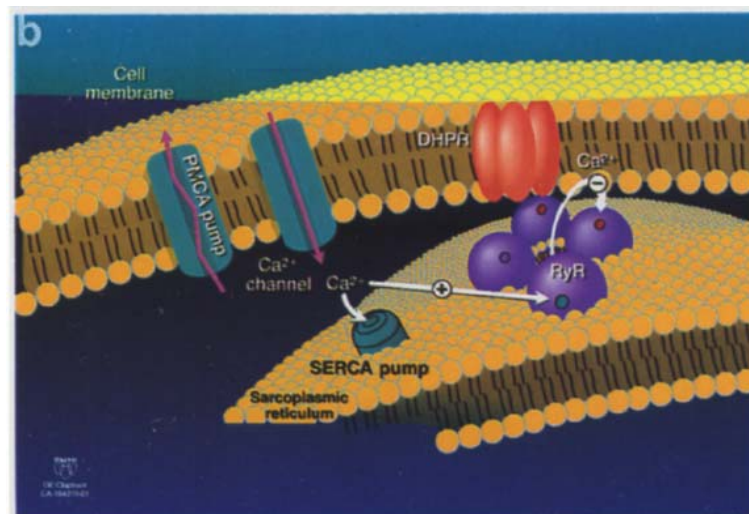


Figura 9: Representación tridimensional de la dinámica de calcio en el citosol. **Fuente:** David E. Clapham. *Calcium signaling.* *Cell.* 80:259-268.

I.5. Canales-Receptores de Dihidropiridina (DHPR) y Rianodina (RyR)

El potencial de acción, al propagarse por los túbulos T, activa dos tipos de canales que son esenciales en la dinámica del calcio, el canal DHPR que es llamado así porque es bloqueado por la dihidropiridina, y el canal conocido como receptor de rianodina (RyR) por ser activado por la rianodina. ^[4]

El canal DHPR es un ejemplo de canal tipo L (“large o long-lasting” en inglés). Consta de cinco subunidades: α -1, α -2, δ , β y γ . La subunidad α -1 contiene los sitios de unión farmacológica para numerosas sustancias que actúan como agonistas y antagonistas, forma el canal de Ca^{+2} en la isoforma cardíaca y es la unidad sensora de voltaje en la isoforma de músculo esquelético. Las otras subunidades tienen funciones reguladoras, ayudan a posicionar la subunidad α -1 en los túbulos T y aumentan su habilidad para detectar despolarizaciones o para actuar como canal de Ca^{+2} . El canal DHPR también permite la entrada de pequeñas cantidades de Ca^{+2} a la fibra, pero este camino es secundario ^[2,4,5]. Existen evidencias de que los canales de DHPR en los túbulos T, y los RyR en el RS, forman unidades macromoleculares para la liberación de Ca^{+2} que están organizadas espacialmente y son visibles con el microscópio electrónico ^[6]. Los canales DHPR están organizados en grupos de cuatro y concurren con uno de cada dos canales RyR en músculo esquelético. De acuerdo con datos actuales, la subunidad α -1 del DHPR interactúa con el RyR y provoca su apertura.

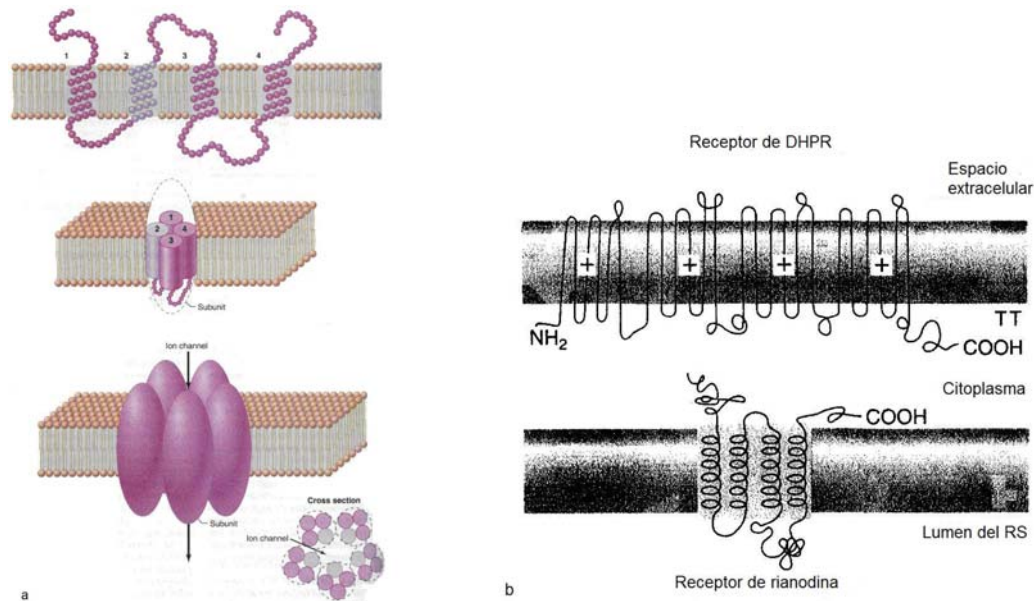


Figura 10: **a)** dibujo esquemático del canal de DHPR, **b)** esquema donde se observa el canal de DHPR enfrente al canal de RyR. **FUENTE:** **a)** Vander A, Sherman J., Luciano D. Human Physiology. The mechanisms of Body Function. 2001. 8th edition. Mc-Graw-Hill. USA. **b)** Ganong, W. F. (2002) Fisiología médica. 18ava edición en español. Editorial El Manual moderno.

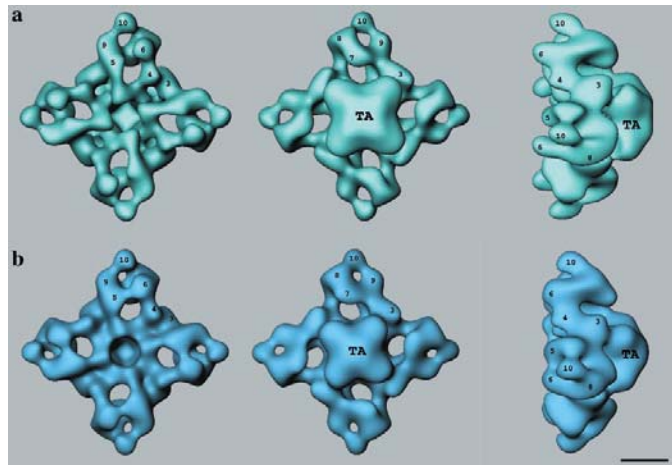
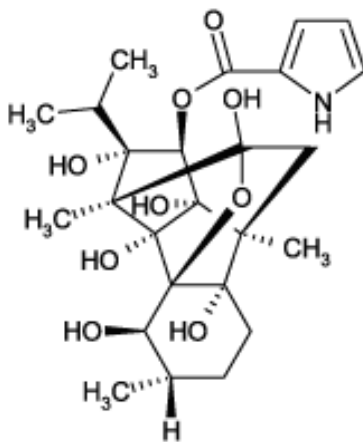


Figura 11: **a)** Molécula de rianodina, **b)** Representación superficial de la reconstrucción tridimensional de RyR3, en **(a)** se muestra el buffer abierto en color verde y **(b)** condición de buffer cerrado mostrado en azul. La reconstrucción tridimensional esta mostrada en tres ángulos diferentes del receptor, visto desde el citoplasma, la superficie que interactúa con los túbulos transversos (*imagen de la izquierda*), la cara que interactúa con la membrana del RS (*imagen central*) y una vista lateral que muestra la interacción con el ensamblaje transmembránico (transmembrane assembly - TA) (*imagen de la derecha*). escala 100 Å. **FUENTE:** Sharma, M.R., Jeyakumar, L.H., Fleischer, S., and Wagenknecht, T. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 9485-9491. Three-dimensional architecture of ryanodine receptor isoform 3 in two conformational states as visualized by cry-electron microscopy.

I.6. Calcio en la contracción muscular

El Ca^{2+} es el principal catión bivalente extracelular y es esencial para muchos procesos importantes, entre ellos la excitabilidad neural, liberación de neurotransmisores, contracción muscular, integridad de membrana y coagulación de la sangre. El incremento temporal del flujo de Ca^{2+} aumenta su concentración, lo cual permite interacciones con proteínas de unión de Ca^{2+} específicas (parvoalbúmina, calmodulina, troponina C, etc) que activan muchos procesos (ver CUADRO I).

El Ca^{2+} es importante en el acoplamiento entre excitación y contracción muscular (ver Cuadro I). Los túbulos T permiten la comunicación con el espacio extracelular y permiten la entrada del ión calcio desde el exterior en respuesta al potencial de acción. En estos túbulos los receptores de dihidropiridina (DHPR) activan los canales de rianodina (RyR) en el RS estimulando la liberación de Ca^{2+} del retículo, este mecanismo se conoce como *liberación de calcio inducida por calcio* (LCIC) o bien en inglés Calcium-Induced Calcium Release (CICR). El Ca^{2+} liberado difunde a través del citosol y dispara la apertura de canales de RyR vecinos. Este Ca^{+2} activa la contracción al unirse a la troponina C (Figura 7). Hay relajación muscular cuando el Ca^{2+} se bombea activamente a través de SERCA (consumo de ATP) de regreso al retículo sarcoplásmico donde es secuestrado por una proteína (calsecuestрина - CSQ).

CUADRO I: Secuencia de eventos en la contracción y en la relajación del músculo esquelético. **FUENTE:** Ganong, W. F. (2002) Fisiología médica. 18ava edición en español. Editorial El Manual moderno.

1) Descarga de la neurona motora
2) Liberación del transmisor (acetilcolina) en la placa motora terminal
3) Unión de la acetilcolina a los receptores nicotínicos de la acetilcolina
4) Incremento de la conductancia del Na^+ y K^+ en la membrana de la placa motora
5) Generación del potencial de acción en las fibras musculares
6) Diseminación de la despolarización a lo largo de los túbulos T
7) Liberación del Ca^{+2} a partir de las cisternas terminales del RS y difusión hacia los filamentos gruesos y delgados
8) Enlace del Ca^{+2} a la troponina C para descubrir los sitios de la actina para el enlace de la miosina
9) Formación de enlaces cruzados entre la actina y la miosina y deslizamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos para producir el acortamiento.

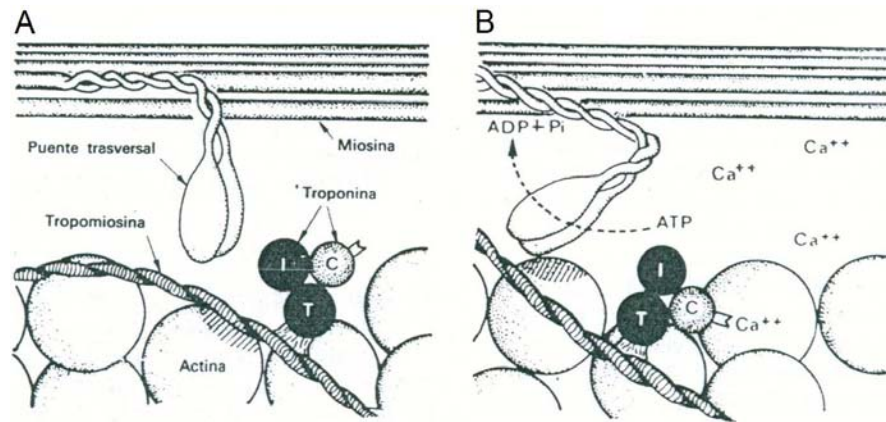


FIGURA 12: A) Arreglo de la troponina en estado relajado, la cabeza de la miosina no se puede unir a la troponina. B) Interacción Ca-Troponina C habilita interacción miosina-troponina para la contracción muscular. **FUENTE:** Ganong, W. F. (2002). Fisiología médica. 18ava edición en español. Editorial El Manual moderno.

La dependencia del sistema contráctil con el ión calcio se ha puesto de manifiesto a través de distintos tipos de experiencias. La importancia de dicho ión se confirma tanto en músculo liso como en estriado (músculo esquelético y músculo cardíaco) y puede observarse en la Figura 13 como varía la tensión muscular en función de la concentración de Ca^{+2} . Este experimento fue realizado en fibras musculares desprovistas de membrana, con lo cual se tiene libre acceso al ambiente intracelular y por ende al aparato contráctil. En este caso la concentración del ión calcio necesaria para que el músculo se mantenga relajado es $<10^{-7}\text{M}$ y a medida que esta concentración aumenta la tensión va alcanzando su máximo a una 10^{-5}M (0,01mM). [5].

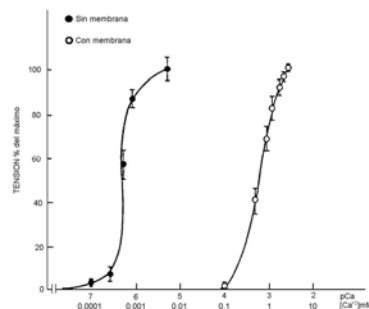


Figura 13: Efecto de la concentración celular del ión calcio sobre la generación de tensión (fuerza) en células musculares con membrana (derecha) y sin membrana (izquierda). $\text{pCa} = \log(1/[\text{Ca}^{+2}])$. **Fuente:** Cingolani, H. y Houssay, A. Fisiología Humana de Houssay. Argentina. Editorial El Ateneo. 2000.

Se puede comparar este resultado con el obtenido para la membrana intacta (parte derecha de la figura), aquí se observa que las concentraciones de Ca^{+2} necesarias para producir tensión son mucho mayores que las correspondientes a la fibra muscular sin sarcolema puesto que este último caso el Ca^{+2} actúa directamente sobre el aparato contráctil.

I.7. Mecanismos de liberación del ión calcio.

El potencial de acción, al propagarse por los túbulos T, activa dos tipos de canales para liberar el Ca^{+2} contenido en el RS: el canal DHPR, que es activado directamente y el canal de RyR, que es activado indirectamente mediante el acople (pies) con los receptores DHPR, a continuación el Ca^{+2} es liberado hacia el citosol siguiendo su gradiente electroquímico. [5]

El exceso local de Ca^{+2} probablemente activa los canales de RyR localizados en regiones distintas a la tríada que no están acoplados directamente a los DHPR, por el mecanismo de liberación de calcio inducido por calcio (LCIC).

Se piensa que otros componentes de la membrana del RS regulan la homeostasis de Ca^{+2} influyendo en la duración de la apertura del RyR: por ejemplo, los aglomerados de calsecuestrina (CSQ), proteína con una elevada capacidad de fijar Ca^{+2} , representan una fuente rápida para su liberación y, por lo tanto, se les considera como un regulador positivo de los RyR. (Figura 8 y 9)

TABLA 2: Estructuras moleculares principales involucradas en la liberación y captura de ión calcio. **FUENTE:** 1. Diversification of function and Pharmacology in Intracellular Signalling, A. Arredouani. Department of Pharmacology, University of Oxford. 2004. 2. Regulation of Ca^{+2} release from internal stores in cardiac and skeletal muscles. A. Wrzosek. 2000. Acta Biochimica Polonica.

Estructura	Estimulación (E) Inhibición (I)	Referencia
DHPR	Despolarización del sarcolema (E)	Tresguerres. (2005).
RyR	[Ca^{+2}] ↑ (E) [Ca^{+2}] ↑↑ (I) Cafeína ↑ (E)	Arredouani. (2004). Wrzosek. (2000).
SERCA	En músculo cardíaco: Fosfolambano no fosforilado (I) Fosfolambano fosforilado (E)	Tresguerres. (2005).

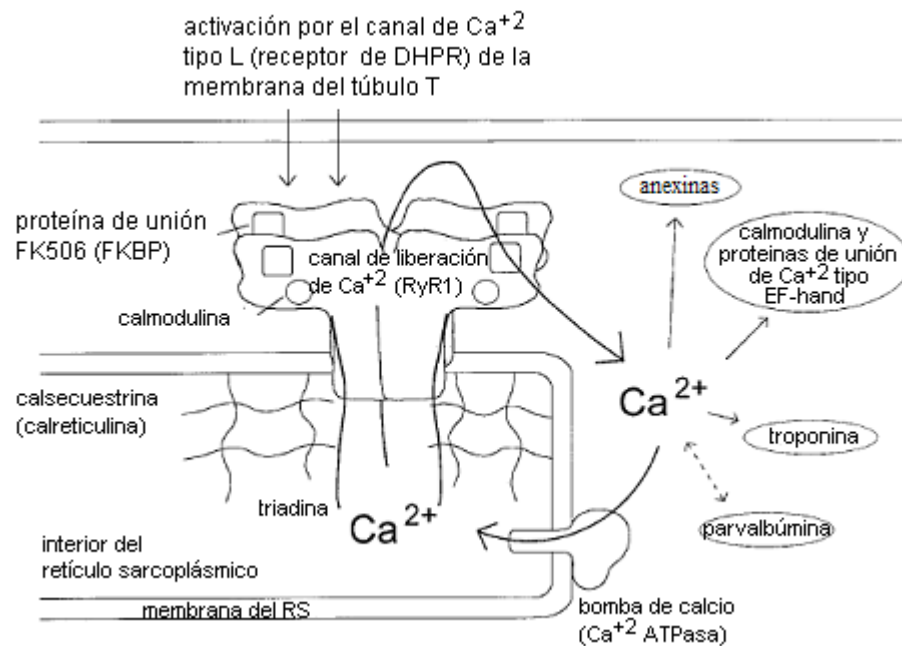


FIGURA 14: Representación bidimensional de la dinámica de calcio en el citosol del músculo esquelético. **FUENTE:** Berchtold, M., Brinkmeier, H. y Münterner, M. Calcium Ion Skeletal Muscle: Its Crucial Role of Muscle Function, Plasticity, and Disease. *Physiol. Rev.* Vol. 80, No 3, 2000.

I.8. Sparks y Quarks de Ca^{+2}

Los avances en las técnicas de medición de Ca^{+2} intracelular han permitido medir la evolución temporal y espacial de la concentración de este ión en el citoplasma de una célula (Figura 11). Esta concentración de calcio es generada por pequeños estallidos de concentración (sparks) que se propagan a través del citoplasma activando otros sitios de liberación (receptores de rianodina) ^[7] (Figura 12).

Un Spark de calcio es una liberación local de Ca^{+2} regenerativa desde un “cluster” de receptores de Rianodina o IP_3 , ubicados en el retículo sarcoplásmico. Durante el acoplamiento excitación-contracción en células musculares el spark de Ca^{+2} es disparado por alguno de los siguientes tres mecanismos:

1) La entrada de calcio a la célula a través de receptores de dihidropiridina (canales de calcio tipo L) ubicados en la membrana de los túbulos T, lo cual ocurre cuando se despolariza el sarcolema. Este mecanismo usualmente requiere de la presencia de receptores de Rianodina en el RS (este mecanismo se denomina liberación de calcio inducida por calcio (LCIC), probablemente en este mecanismo exista un segundo mensajero. Este mecanismo ocurre fundamentalmente en células cardíacas. ^[8]

2) Los receptores de IP_3 ubicados en el RS son sensibles a segundos mensajeros que se activan con la despolarización del sarcolema. Este mecanismo ocurre predominantemente en células no-cardíacas.

3) El spark es gobernado por sensores de voltaje en la membrana de los túbulos T (posiblemente sensores de DHP) que aumentan la afinidad de la captación de calcio del receptor IP_3 o RyR1 (en contacto con los sensores de voltaje) y entonces este canal-receptor ligado con Ca^{+2} se abre y se libera calcio al citosol. Se requiere de un acople proteína-proteína. ^[8]. Este mecanismo es denominado Liberación de calcio inducido por despolarización del sarcolema (LCID) y ocurre predominantemente en células de músculo esquelético.

Se han descrito unas explosiones de concentración de menor intensidad en la literatura como quarks, aceptándose que estas liberaciones de calcio son producto de la apertura desde un solo canal de RyR y que constituyen la base elemental de los sparks ^[7]. Ver Tabla 3.

TABLA 3: Eventos relacionados con la liberación de calcio a través de los receptores de rianodina. **FUENTE:** **1.** Monrad M, et al. Triadin: The New Player on Excitation-Contraction Coupling Block. *Circ. Res.* 2005;96:607-609. **2.** Franzini- Armstrong C, Protasi F, Ramesh V. Shape, size, and Distribution of Ca^{+2} release units and couplons in Skeletal and Cardiac muscles. *Biophysical Journal.* 1999; 77: 1528- 1539. **3.** Tanaka H, Oyamada M, Tsujii E, Nakajo T, Takamatsu T. Excitation-Dependent Intracellular Ca^{2+} waves at the Border Zone of the Cryo-injured Rat Heart Revealed by Real-time Confocal Microscopy. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34: 1501-1512.

Evento	Características
QUARK	Un único canal de RyR
SPARK	Un “cluster de canales de RyR” (ULC)
TRANSIENTES	Un conjunto de ULC (Couplons)
ONDAS	Un conjunto de ULC (Couplons). Se presenta fundamentalmente cuando hay sobrecarga de ión calcio en el citosol

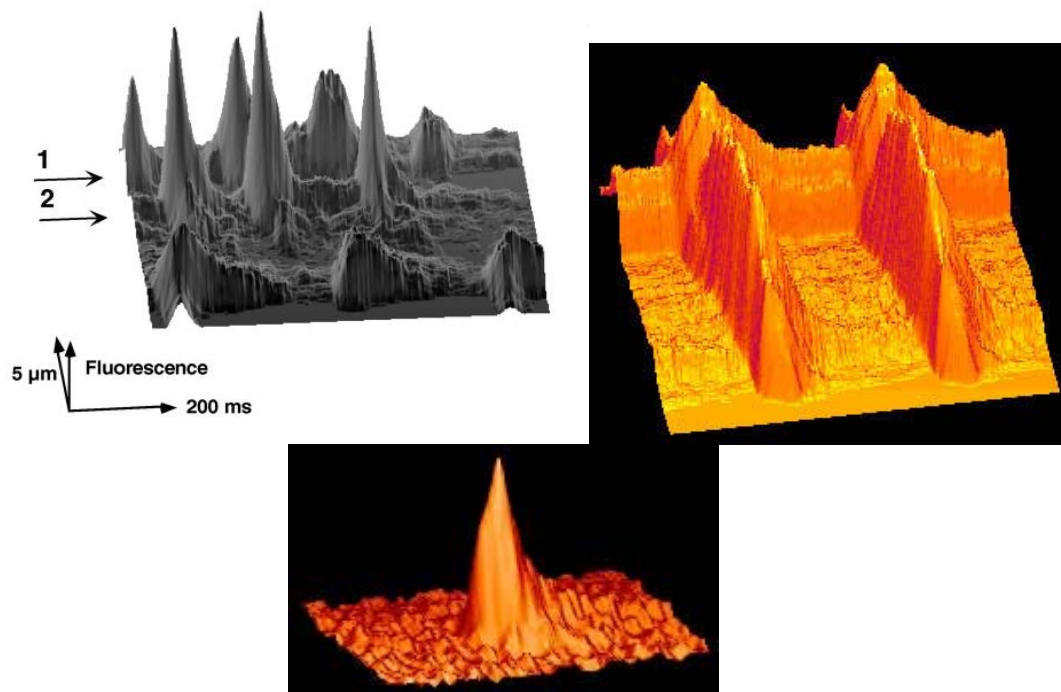


FIGURA 15: Gráfico de la fluorescencia superficial usando fluo-3 medido con un escaner confocal lineal en una célula muscular estriada. **FUENTE:** Ernst Niggli. 1999. Localized intracellular calcium signaling in muscle: Calcium Sparks and Calcium Quarks. *Annu. Rev. Physiol.* 61:311-35.

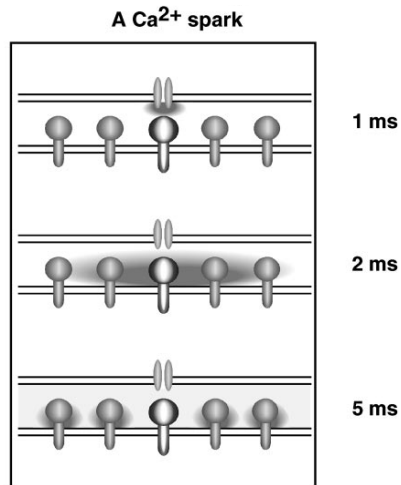


FIGURA 16: El calcio proveniente del canal de DHPR dispara la liberación de calcio desde un receptor de RyR acoplado a este, el canal de RyR acoplado tiene un umbral de apertura más alto que sus vecinos no acoplados, generando un alto flujo de calcio que difunde, activando la liberación de calcio (en menor proporción) desde otros canales de RyR vecinos (quarks). **FUENTE:** Ernst Niggli. 1999. Localized intracellular calcium signaling in muscle: Calcium Sparks and Calcium Quarks. Annu. Rev. Physiol. 61:311-35.

I.9. Relajación y Buffer de Calcio (CSQ y PV).

Una vez que cesa la actividad contráctil, la concentración de calcio en el citosol disminuye hasta la condición basal ($0,1\mu\text{M}$) debido a diversos mecanismos que actúan durante la relajación. De estos mecanismos los más importantes son:

1. Bombeo activo, bombas Ca-ATPasa ubicadas en el RS (SERCA), en este mecanismo los iones calcio son reingresados al interior del RS a través de estas bombas que consumen ATP.

2. Bufferado por proteínas ligantes de calcio donde la más importante es la Parvalbúmina que presenta alta afinidad por el Ca^{+2} , captura este ión (intercambio Ca^{+2} - Mg^{+2} limitado por la velocidad de disociación del Mg^{+2}) hasta ubicarlo por difusión cerca de las bombas de calcio en el RS. SERCA tiene mayor afinidad por el Ca^{+2} que la parvalbúmina. ^[9]

El proceso de relajación tiene un consumo energético que está asociado al bombeo activo de los iones Ca^{+2} (se consume energía proveniente de la hidrólisis del ATP). Este proceso es llevado a cabo por la bomba Ca-ATPasa. La actividad de la bomba (controlada parcialmente por la concentración de Calmodulina y fosfolambano) genera un elevado gradiente de concentración a través del RS en el músculo en reposo. ^[10]

Al entrar los iones Ca^{+2} al RS, son separados de la bomba y tomados por proteínas que ligan Ca^{+2} , tales como la enzima ATPasa de alta afinidad y la CSQ de baja afinidad y alta capacidad. Puesto que cada bomba tiene una baja capacidad de transportar iones (**20 iones/s**), la superficie del RS contiene una enorme densidad de bombas de calcio. Se ha estimado que su número es casi igual al número de iones calcio liberados en una sacudida muscular simple. Por lo tanto, podemos suponer que cada ATPasa de calcio realiza en promedio un ciclo de transporte durante la relajación de una sacudida muscular simple. ^[11]

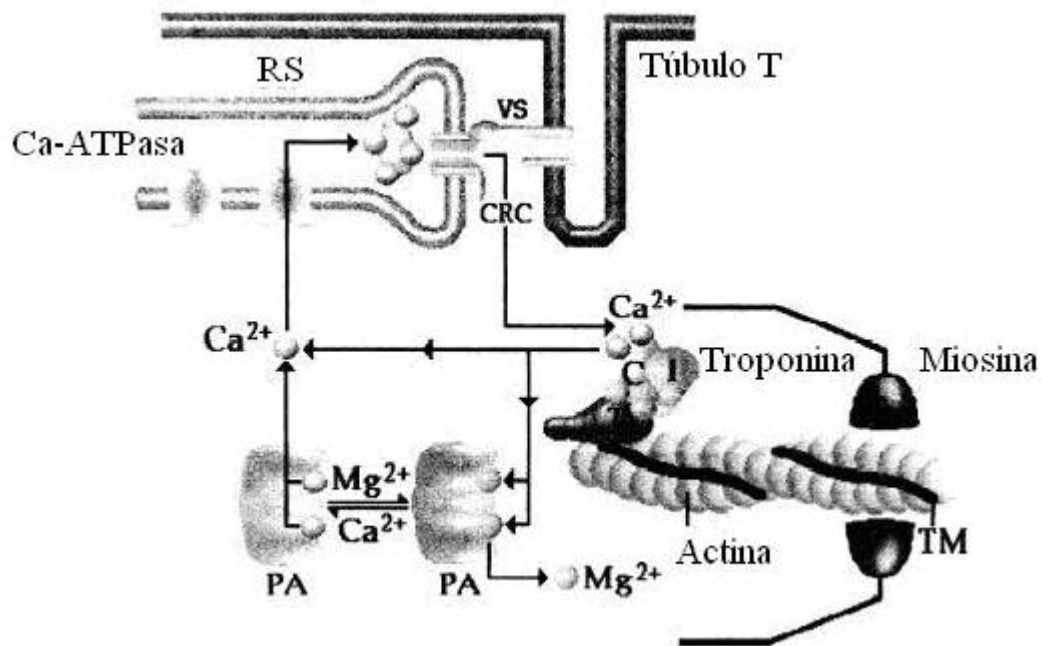


FIGURA 17: Control de Ca^{2+} en la contracción-relajación del músculo esquelético. Este esquema describe como la parvalbúmina podría acelerar la relajación en un músculo esquelético de contracción rápida. Con la estimulación muscular el potencial de acción viaja hasta los TT y activa sensores de voltaje los cuales causan la apertura de canales de liberación de Ca^{2+} en el RS. El Ca^{2+} liberado desde el RS se une preferencialmente con la troponina C para remover la inhibición de la tropomiosina y esto permite la interacción entre la miosina y la actina produciendo el desarrollo de fuerza muscular. Durante la contracción algunos Ca^{2+} son intercambiados por Mg^{2+} en la parvalbúmina dependiendo de la duración de la contracción. Durante la relajación Ca^{2+} es reingresado al RS via SERCA e intercambiado por Mg^{2+} en la parvalbúmina. Ambos mecanismos operan en paralelo para producir la relajación. Después de la relajación el Ca^{2+} unido a la parvalbúmina es reingresado al RS via SERCA por intercambio con Mg^{2+} . **FUENTE:** Rall, J.A. Role of Parvalbumina in Skeletal Muscle Relaxation. News Physiol. Sci. Vol 11. December 1996. 249-255.

I.10. Difusión química

La ecuación diferencial en derivadas parciales que describe el fenómeno de la difusión unidimensional de una sustancia es ^{[12],[13]}:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial c}{\partial x} \right) \quad (1)$$

y si D (coeficiente de difusión) no depende de la posición (difusión homogénea), ni de la dirección (difusión isotrópica) entonces:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (2)$$

Con $D = \frac{k_B T}{F_r}$, donde k_B , T y F_r representan la constante de Boltzmann, la temperatura absoluta y el coeficiente de fricción respectivamente. Para una partícula esférica en un medio de fricción homogénea tenemos: $F_r = 6\pi\eta R$, con η la viscosidad del medio y R el radio de la partícula.

Para el caso tridimensional tenemos:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c \quad (3)$$

donde $\nabla^2 \equiv \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right)$, si utilizamos coordenadas rectangulares.

En coordenadas cilíndricas (en tres dimensiones) tenemos:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c, \text{ con } \nabla^2 c = D \left[\left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 c}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] \quad (4)$$

Si se ignora la dependencia con θ (caso axisimétrico) tendremos

$$\nabla^2 c = \left[\left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] \quad (5)$$

$$\therefore \frac{\partial c}{\partial t} = D \left[\left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] \quad (6)$$

Si ignoramos además la dependencia con z , obtenemos:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) \quad (7)$$

I.11. Ecuación difusión-reacción para el ión calcio

Todas las reacciones químicas a todos los niveles están gobernadas por la cinética química, inclusive a nivel celular las reacciones y procesos químicos que ocurren en el citoplasma están regidos por las leyes cinéticas. Para una reacción química general donde:



donde a,b,e y f son los coeficiente estequiométricos de la reacción. A, B, E y F son las especies químicas de la reacción, entonces la velocidad la reacción se define como:

$$v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = \dots = -\frac{1}{e} \frac{d[E]}{dt} = -\frac{1}{f} \frac{d[F]}{dt} = \dots \quad (9)$$

los signos denotan la aparición y desaparición de la especie química, los corchetes en la ecuación (9) denotan la concentración de la especie química y t representa al tiempo.

Para muchas de las reacciones químicas se encuentra que experimentalmente la velocidad de la reacción puede escribirse: $v = k[A]^a[B]^b \dots$, donde v denota la velocidad de la reacción, k es la constante de velocidad de la reacción, a y b son los órdenes de reacción de cada especie y $a+b$ es el orden total de la reacción. ^[14].

Cerca del 99% de todo el calcio en el citoplasma está ligado a grandes moléculas de proteínas que actúan como buffer de ión calcio. La reacción química para el buffer de Ca^{+2} puede ser representada por ^[15]:



donde:

k_+ , k_- : son las constantes de velocidad directa e inversa

P : representa la molécula de proteína libre que actúa como buffer

B^* : es el complejo calcio-proteína buffer

La concentración total de proteína buffer (b_t) viene dada por:

$$b + p = b_t \quad (11)$$

y la ley de velocidad para la reacción del ión calcio es

$$\frac{dc}{dt} = k_- b - k_+ c(b_t - b) \quad (12)$$

Donde: c : Concentración de Ca^{2+} libre en el citosol ($[\text{Ca}^{+2}]$)

b_t : Concentración total de la proteína (buffer) ligada al calcio

b : Concentración de proteína (buffer) ligada al Ca^{+2}

Las siguientes tablas muestran valores de las constantes k_+ , k_- , b_t , K_n y α para algunas proteínas buffer. En la tabla 5 se listan algunas constantes y parámetros fisiológicos

TABLA 4: Valores de distintos parámetros de buffer de calcio. **FUENTE:** Y.H. Jiang, M.G. Klein, and M.F. Schneider. Numerical simulation of $\text{Ca}(2+)$ "Sparks" in skeletal muscle. Biophys J. 1999 November; 77(5): 2333–2357.

Ca^{2+} Buffer	K_n^+ ($\mu\text{M}^{-1}\text{ms}^{-1}$) Constante de velocidad directa	K_n^- (ms^{-1}) Constante de velocidad inversa	$[b_n]_t$ (μM) Concentración total	K_n (μM) Constante de Equilibrio	$\alpha = \frac{b_t}{K_n}$
Fluo-3	80	90	50	1.13	44
Calmodulin	100	38	24	0.38	63
Troponin C	39	20	70	0.51	137
SR membrana	115	100	47	0.87	54
SL membrana	115	1000	1124	8.7	129
parvoalbúmina	0,25	10^{-3}	1000	$4 \cdot 10^{-3}$	250.000

TABLA 5: Valores de concentración del ión calcio. **FUENTE:** 1. Stern MD, Song L-S, Cheng H, Sham JS, Yan HT, Boheler KR & Rios E (1999). Local control models of cardiac excitation-contraction coupling. J. Gen. Physiol. 113: 469-489. 2. Subramanian S, Viatchenko-Karpinski S, Lukyanenko V, Györke S and Wiesner TH (2001) Underlying mechanisms of symmetric calcium wave propagation in rat ventricular myocytes. Biophysical Journal 80:1-11.

Concentraciones y coeficiente de difusión del ión calcio	Valor
C_{REP} (Concentración basal de calcio en el citosol de miocitos en reposo)	0,1 μ M (Stern y col, 1999; Subramanian, 2001)
C_{FE} (Concentración de calcio en el fluido extracelular)	1000 μ M (Stern y col, 1999)
C_{RSR} (Concentración basal de Calcio en el retículo sarcoplásmico)	150 μ M-500 μ M (Stern y col, 1999)
Coeficiente de difusión del Ca^{+2} libre en solución acuosa	600 μ m ² /s (REF)
Coeficiente de difusión del Ca^{+2} libre en el citosol	223 μ m ² /s (Kieger and cols, 1998)

Para el caso de una cinética de buffer lento tenemos el siguiente sistema de ecuaciones en derivadas parciales (EDP) acoplado [16]:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_c \nabla^2 c + k_- b - k_+ c(b_t - b) + f(c) \quad (13)$$

y para el producto b

$$\frac{\partial b}{\partial t} = D_b \nabla^2 b - k_- b - k_+ c(b_t - b) \quad (14)$$

donde c es la concentración de calcio libre en el citosol, b es la concentración de calcio bufferado, k_+ y k_- son las constantes de velocidad inversa y directa, b_t es la concentración total del buffer y $f(c)$ denota todas las reacciones o mecanismos que involucra al Ca^{+2} libre diferente al bufferado ya considerado.

Suponiendo una cinética rápida para el buffer, se puede demostrar la no-linealidad de la EDP resultante [15]. Sin embargo, si además se cumple que $D_c \gg D_b$ (buffer que difunde lentamente), $k \gg c$ y condiciones estacionarias es posible desacoplar el sistema de EDP y obtener: [15] (Ver Apéndice II)

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{D_c}{1 + \alpha} \nabla^2 c + \frac{f(c)}{1 + \alpha} \quad (15)$$

$$\text{Con } \alpha = \frac{b_t}{k} \text{ y } k = \frac{k_-}{k_+} \quad (16)$$

Las otras reacciones donde interviene el Ca^{+2} y que forman parte del término $f(c)$ son en general, el flujo de este ión a través del sarcolema, el flujo a través de los canales del retículo sarcoplásmico (canales RyR), a través de la membrana mitocondrial y el asociado a la bomba del retículo sarcoplásmico (SERCA).

Este trabajo se limitará a considerar solamente la acción de un único buffer (la parvalbúmina) y un único mecanismo de recaptación de calcio, el asociado con la bomba SERCA, así tendremos que la ecuación (15), queda:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \left(\frac{D_c}{1 + \alpha} \right) \nabla^2 c - \frac{J_{SERCA}}{1 + \alpha} \quad (17)$$

donde $f(c) = -J_{SERCA}$

Si representamos J_{SERCA} por una ecuación tipo Hill con coeficiente igual a n , tendremos (Ver Apéndice III):

$$J_{SERCA} = \frac{hc^n}{v_2^n + c^n} \quad (18)$$

Si suponemos que: $v_2=1$ y un coeficiente de Hill $n=1$, entonces:

$$J_{SERCA} = h \left(\frac{c}{1 + c} \right) \quad (19)$$

Es posible considerar en la ecuación 19, la dependencia de J_{SERCA} con la temperatura y también imponer la condición de que una vez alcanzada en el citosol la concentración basal c_0 , entonces la bomba debe detenerse. Así que:

$h = h_o(1 - e^{-\beta T})^\gamma$, donde β es tal que cuando $T \rightarrow 310K$ ($37^\circ C$), $h \cong h_o$

$$\gamma = \begin{cases} 1 & \text{si } c > c_o \\ 0 & \text{si } c \leq c_o \end{cases} \quad (20)$$

Existe otra forma de conseguir el mismo resultado, definiendo J_{fuga} desde el RS hacia el citosol como:

$$J_{\text{fuga}} = -J_{\text{SERCA}}(c = c_o) \quad (21)$$

Por lo que la ecuación de difusión-reacción resultante es:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \left(\frac{D_c}{1 + \alpha} \right) \nabla^2 c - \frac{h}{(1 + \alpha)} \frac{c}{(1 + c)} \quad (22)$$

En el caso unidimensional

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \left(\frac{D_c}{1 + \alpha} \right) \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - \frac{h}{(1 + \alpha)} \frac{c}{(1 + c)} \quad (23)$$

que es la ecuación de Difusión-Reacción ^{[16], [17]} la cual en general, puede ser resuelta analíticamente pero sin cumplir ninguna condición específica de contorno e inicial, o numéricamente con las condiciones de contorno e iniciales apropiadas.

En este trabajo se quiere resolver la ec. (23) junto con las condiciones de borde e iniciales adecuadas. Es decir, el problema a resolver es:

$$\begin{cases} \frac{\partial c}{\partial t} = \left(\frac{D_c}{1 + \alpha} \right) \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - \frac{h}{1 + \alpha} \left(\frac{c}{1 + c} \right) \\ c(x, 0) = g(x) \\ c(x = 0, t) = g_1(t) \\ c(x = L, t) = g_2(t) \end{cases} \quad (24)$$

En este trabajo simularemos la liberación de Ca^{+2} desde los canales de rianodina haciendo uso de:

$$c(x,0) = A\delta(x - x_o) + c_o \quad (25)$$

Donde $\delta(x-x_o)$ es la función delta de Dirac. Esta expresión significa que en el instante inicial y en $x=x_o$ inyectamos una cantidad A de iones Ca^{+2} al citosol a partir de una concentración basal de Ca^{+2} , c_o . La función delta cumple con:

$$\begin{aligned} \delta(x - x_o) &= 0 \text{ para } x \neq 0 \\ \delta(x - x_o) &\rightarrow \infty \text{ para } x = x_o \end{aligned} \quad (26)$$

y también $\int_a^b \delta(x - x_o) dx = 1$ si $x_o \in [a, b]$. La cantidad A dependerá con la temperatura de la siguiente forma:

$$\text{con } A = A_o(1 - e^{-\alpha T}) \quad (27)$$

donde T es la temperatura en grados Kelvin y α es un constante apropiada, tal que cuando $T \rightarrow 310\text{K}$ (37°C), $A \cong A_o$. Las condiciones de frontera utilizadas en este trabajo son:

$$\begin{aligned} c(x=0, t) &= g_1(t) = c_o \\ c(x=L, t) &= g_2(t) = c_o \end{aligned} \quad (28)$$

Bajo estas condiciones se considera un receptor de RyR localizado en el centro del intervalo, “disparado” inicialmente (condición inicial de la EDP). Este comienza a difundir, al alcanzarse cierta distribución de concentración $c(x,t)$ provoca el “disparo” de un segundo y un tercer canal de RyR. Este proceso de difusión del ión Ca^{+2} liberado del primer canal pasará por un valor de concentración $c(x,t)$ que corresponderá a un valor umbral de “disparo” de un segundo canal (c_{UMBRAL}) dependiendo de la ubicación espacial del mismo. Esto es equivalente a introducir una función delta de Dirac en el sitio de “disparo”

También podemos hacer uso de las condiciones de frontera para “disparar” otros receptores de rianodina en los extremos del intervalo en los instantes requeridos:

$$\begin{aligned} c(x=0, t) &= g_1(t) = N_1 \delta(t - t_1) + c_o \\ c(x=L, t) &= g_2(t) = N_2 \delta(t - t_2) + c_o \end{aligned} \quad (29)$$

Cumpléndose en (29) que:

$$N_1 = N_{1o} (1 - e^{-\alpha_1 T}), N_2 = N_{2o} (1 - e^{-\alpha_2 T}) \quad (30)$$

Con N_{1o} y N_{2o} la cantidad de iones inyectados por cada receptor, respectivamente, cuando $T \rightarrow \infty$.

En las ecuaciones (25) y (29) las funciones delta de Dirac se representaran de la forma:

$$\delta(u - u_o) = \lim_{\sigma \rightarrow 0} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(u-u_o)^2}{2\sigma^2}} \quad (31)$$

En este trabajo, dispararemos un receptor de rianodina en el centro del intervalo y luego, definiendo previamente un umbral de concentración de “disparo” para cualquier otro receptor, procedemos a dispararlos en tiempos ulteriores o al mismo tiempo que al central. En este trabajo se ignorará la dependencia del número de partículas inyectadas por los canales de RyR con la temperatura.

El problema también puede abordarse de la siguiente forma:

$$\begin{cases} \frac{\partial c}{\partial t} = \left(\frac{D_c}{1 + \alpha} \right) \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{f(c)}{1 + \alpha} \\ c(x, 0) = g(x) \\ c(x=0, t) = g_1(t) \\ c(x=L, t) = g_2(t) \end{cases} \quad (32)$$

Pero ahora $f(c)$ representa todas las fuentes o sumideros de Ca^{+2} citosólico. Así, la expresión para $f(c)$ será, por ejemplo:

$$f(c) = J_{\text{FUENTE}} + J_{\text{SUMIDERO}} \quad (33)$$

Con

$$J_{FUENTE} = \sum_i A_i \delta(x - x_{oi}) \delta(t - t_{oi}) \quad (34)$$

Representando la liberación de calcio desde los receptores de rianodina y $J_{sumidero}$ representando al flujo de reingreso de Ca^{+2} debido a SERCA, es decir:

$$J_{SUMIDERO} = h \left(\frac{c^n}{v_2^n + c^n} \right) \quad (35)$$

I.12. Ecuaciones y modelos matemáticos

Este proyecto incorpora modelos físicos-químicos usando Ecuaciones en Derivadas Parciales (EDP), específicamente ecuaciones del tipo difusión-reacción para estudiar la dinámica del ión calcio en el citosol.

I.13. Modelaje

El modelo explora soluciones numéricas para las EDP, haciendo las aproximaciones apropiadas y soluciones numéricas usando “template software” como Matlab® 7.0

I.14. Antecedentes

Keizer y cols (1998) modelaron la dinámica del Ca^{+2} en el citosol de miocitos mediante la ecuación en derivadas parciales unidimensional (“fire-diffuse-fire model”):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{1}{\alpha} \sum_{i=-\infty}^{+\infty} \delta(x - x_i) \delta(t - t_i) + J_{fuga} - J_{SERCA} \quad (36)$$

$$\begin{aligned} J_{fuga} &= v_2 (c_{RS} - c) \\ \text{con: } J_{SERCA} &= \frac{v_3 c^4}{k_3^4 + c^4} \end{aligned} \quad (37)$$

y $c_{basal} = 0,061 \mu M$.

Utilizaron el método de Crank-Nicolson (implícito) para resolver numéricamente la ecuación (36) y obtuvieron ondas de propagación de calcio, que se propagan con una velocidad proporcional al coeficiente de difusión del Ca^{+2} , en vez de depender de su raíz cuadrada, tal como lo predice las ecuaciones de difusión-reacción convencionales. El análisis realizado explica la transición de propagación saltatoria a propagación continua.

Uttenweiler y cols (1998)^[23], presentaron un modelo matemático para simular la evolución temporal y espacial del Ca^{+2} , liberado por la acción de la cafeína sobre los receptores de rianodina en preparaciones de fibras musculares “skinned”. Propusieron una ecuación de difusión-reacción con simetría cilíndrica, pero restringida a la componente radial. Incorporaron en el modelo varios “buffers” móviles e inmóviles y la liberación y recaptura de Ca^{+2} por SERCA. La ecuación se resuelve por diferencia finita. Los resultados experimentales se comparan con los resultados teóricos obtenidos con este modelo y permiten la descripción del intercambio total de Ca^{+2} y las diferentes contribuciones de todos los procesos interactuantes en los transientes de calcio.

Por otra parte, Novo y cols (2003)^[24] desarrollaron un modelo tridimensional cilíndrico axisimétrico (2D) de una miofibrilla en el cual la liberación de Ca^{+2} ocurre en la línea Z. El modelo incorporó la difusión de Ca^{+2} y Mg^{+2} y todos los “buffers” relevantes, así como también la cinética de enlace de estos “buffers” con los iones. Los autores modelan la difusión del Ca^{+2} en el citosol mediante una ecuación de difusión-reacción en coordenadas cilíndricas que resuelven numéricamente utilizando el método implícito de las diferencias alternadas (ADI). La ventaja de este acercamiento es que cada salto de medio tiempo conlleva a un conjunto de ecuaciones que resolvieron por inversión de una matriz tridiagonal usando el método de eliminación gaussiana. Los autores concluyeron que un modelo de liberación que ocurra exclusivamente en la línea Z no puede explicar la data experimental usada por los autores y sugieren que el Ca^{+2} puede

ser liberado desde una región mas ancha del retículo sarcoplásmico que no es simplemente la unión retículo sarcoplásmico-túbulo T.

Smith y col (1998) construyeron un modelo de difusión-reacción para el ión Ca^{2+} dentro de una célula de músculo cardiaco. En el modelo incluyeron la liberación de Ca^{2+} desde los canales de rianodina, el secuestro del ión calcio por SERCA y la asociación y disociación de Ca^{2+} con buffers endógenos y un colorante-indicador difusible (fluo-3). Estos autores utilizaron un esquema numérico explícito para resolver la EDP en coordenadas cilíndricas con dos dimensiones (aproximación axisimétrica) y obtener $c(r,z)$. Los autores concluyen que la movilidad, cinética y la concentración del indicador son determinantes esenciales en la forma del spark de Ca^{2+} . Los buffers estacionarios y bombas influyen en menor proporción en dicha forma. La forma asimétrica del spark de Ca^{2+} se explica de mejor manera por una difusión anisotrópica del ión Ca^{2+} y del colorante-indicador mas que por inhomogeneidades subsarcómericas del buffer de Ca^{2+} y el sistema de transporte.

1.15. Justificación.

La fuerza generada por los elementos contráctiles del músculo (sarcómeros) depende de la concentración del ión calcio, y esta depende de la localización espacial y temporal. Por esta razón el conocimiento de la evolución de la concentración del ión calcio en posición y tiempo es imprescindible para determinar como varía la fuerza muscular en diversas condiciones experimentales. El estudio de esta evolución es precisamente uno de los objetivos de este trabajo.

La relativa simplicidad del modelo propuesto (difusión, reacción –sumidero- y fuentes de liberación puntuales del ión calcio) en una dimensión espacial permite controlar y estudiar con mucha precisión la influencia de cada uno de los factores mencionados en la evolución de la concentración de este ión.

Debido a que el tiempo computacional necesario para realizar una simulación en mas de una dimensión es relativamente costoso cuando se utilizan métodos implícitos, se hace necesario desarrollar un método explícito (determinando su rango de estabilidad previamente) para simular experimentos previos a los que se realizarán en más de una dimensión que nos permitan visualizar muy rápidamente el comportamiento del sistema bajo diversas condiciones experimentales. Para ello es necesario optimizar previamente un método explícito en una dimensión con el objetivo posterior de extenderlo a más dimensiones.

El método de Dufort-Frankel es un método explícito estable para todo d (factor de estabilidad conocido también como beta, β) que determina valores de la función incógnita, requiere para su funcionamiento de un conjunto de datos iniciales que pueden ser obtenidos con un método explícito del tipo FTCS, que es el desarrollado en este trabajo. Adicionalmente el método implícito ADI utilizado para más de una dimensión incorpora en su operación un método explícito.

También se tiene la posibilidad de realizar experimentos “in silico” (computacional) muy parecidos a experimentos reales, que permitan predecir el comportamiento del sistema bajo estudio en condiciones similares a las experimentales “in vivo” y que incluso permitan simular algunas condiciones “in silico” que no se puedan realizar en experimentos “in vivo”.

La necesidad de una total comprensión del fenómeno de la contracción nos lleva directamente a la creación de un modelo tridimensional (3D) donde se representen las principales estructuras involucradas (con la posibilidad de removerlas o agregarlas) en la dinámica del ión calcio y en la contracción muscular iniciada por este. Este modelo 3D puede servir de insumo para una simulación posterior por elemento finito.

El software elaborado permitiría, con la adecuada optimización, identificar las causas de miopatías mediante la comparación del resultado de la simulación obtenida en condiciones anormales modeladas computacionalmente (“in silico”) con medidas experimentales realizadas en muestras de miocitos bajo las mismas condiciones.

CAPITULO II: METODOLOGÍA

II.1. Técnica numérica utilizada.

Para la resolución del problema se utilizó el método numérico de diferencia finita para EDP en su forma explícita, esto se realizó en tres pasos:

1. Discretización del dominio: el dominio espacial y temporal continuo del problema se sustituyó por uno discreto compuesto de puntos en una retícula espacio-temporal.

El dominio espacial es un segmento comprendido en el intervalo $0 \leq x \leq H$, se discretiza cuando es reemplazado por JL puntos de retícula estacionarios igualmente distribuidos.

$$x_j = (j-1)\Delta x, \quad j=1,2,3,\dots,JL$$

donde $\Delta x = H/(JL-1)$ es la distancia entre dos puntos de la retícula adyacentes (o la separación de la retícula)

El dominio temporal que varía entre $0 \leq t \leq T$ es discretizado cuando es sustituido por niveles de tiempo.

$$t^n = n\Delta t, \quad n=0,1,2,\dots$$

donde Δt es el incremento de tiempo.

Cada punto del dominio discretizado tiene las coordenadas (x_j, t^n)

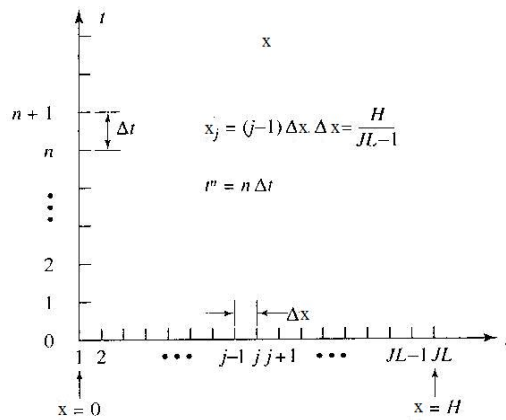


FIGURA 18: Rejilla temporal y espacial utilizada para la discretización.

La separación de la retícula y el incremento de tiempo dependen de las escalas de longitud y tiempo que tienen que ser resueltos, y de las propiedades de las ecuaciones en derivadas parciales discretizadas que son utilizadas para obtener las soluciones.

La solución buscada $c(x,t)$ en la EDP se obtendrá solo en los puntos de retícula y los superíndices niveles de tiempo.

$$c_j^n = c(x_j, t^n)$$

2. Discretización de la EDP: La EDP que rige el problema se reemplazó por un conjunto de ecuaciones algebraicas con los puntos o celdas de la retícula y los niveles de tiempo como su dominio. Este conjunto de ecuaciones algebraicas se denominan ecuaciones de diferencia finita (EDF) y describen el mismo ámbito físico que el descrito por las EDP originales.

La EDP utilizada en este trabajo es:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_{ef} \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - r \frac{c}{(1+c)}$$

y que discretizada adelantada en el tiempo (FT) y centrada en el espacio (CS) queda de la siguiente forma:

$$\frac{u_j^{n+1} - u_j^n}{\Delta t} = D_{ef} \frac{u_{j+1}^n - 2u_j^n + u_{j-1}^n}{\Delta x^2} - r \frac{u_j^n}{1 + u_j^n} + O(\Delta t, \Delta x^2)$$

$$u_j^{n+1} = \beta u_{j-1}^n + (1 - 2\beta) u_j^n + \beta u_{j+1}^n - r \frac{u_j^n}{1 + u_j^n} \Delta t$$

con $h=r(1+\alpha)$, $r \in \mathbb{R}$; $\beta=D_{ef}(\Delta t/\Delta x^2)$ y $D_{ef} = D / (1+\alpha)$

3. Especificar el algoritmo: utilizando el programa MATLAB 7.0 como software computacional, se realizó un código en donde se obtiene la solución en cada punto de la retícula o celda derivada de la EDP para cada nivel de tiempo.

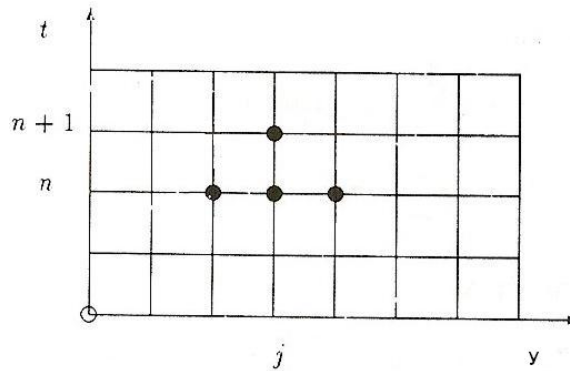


FIGURA 19: Molécula computacional del esquema explícito.

TABLA 6: DEPENDENCIA DE LA VISCOSIDAD CON LA TEMPERATURA

Parámetro	Símbolo	Valor	Fuente
Viscosidad del citosol $D_{(T)} = \frac{k_B T}{6\pi\eta_{(T)} R}$	k_B : constante de Boltzmann T : temperatura absoluta η : viscosidad del medio R : radio de la partícula	$D_{(310K)} = 223 \mu m^2/s$	(Kieger and cols, 1998)

TABLA 7: Tipos de esquemas para resolución de EDP en diferencias finitas para la ecuación de difusión simple.

	Esquema	Formulación	Exactitud	Estabilidad	Requerimientos adicionales
EXPLICITO	FTCS	$u_i^{n+1} = u_i^n + d(u_{i+1}^n - 2u_i^n + u_{i-1}^n)$	$O[(\Delta t), (\Delta x)^2]$	$d \leq 1/2$	Ninguna
	DuFort-Frankel	$u_i^{n+1} = \frac{1-2d}{1+2d}u_i^{n-1} + \frac{2d}{1+2d}(u_{i+1}^n + u_{i-1}^n)$	$O[(\Delta t)^2, (\Delta x)^2, (\frac{\Delta t}{\Delta x})^2]$	Estable para todo d	Requiere dos conjuntos de datos para comenzar
IMPLICITO	Crank-Nicolson	$\frac{1}{2}du_{i+1}^{n+1} - (1+d)u_i^{n+1} + \frac{1}{2}du_{i-1}^{n+1} = -\frac{1}{2}u_{i+1}^n$	$O[(\Delta t)^2, (\Delta x)^2]$	Estable para todo d	Requiere la solución de un sistema tridiagonal
	Full Implicito	$-du_{j-1}^{n+1} + (1+2d)u_j^{n+1} - du_{j+1}^{n+1} = u_j^n$	$O[(\Delta t), (\Delta x)^2]$	Estable para todo d	Requiere la solución de un sistema tridiagonal

*

$$d = D \left(\frac{\Delta t}{(\Delta x)^2} \right)$$

II.2 Modelos utilizados.

Se creó un modelo unidimensional donde se representan 1, 2 y 3 sitios de liberación de ión calcio, y que son parte del esquema “disparo” de Ca^{+2} . Ver figura 20.

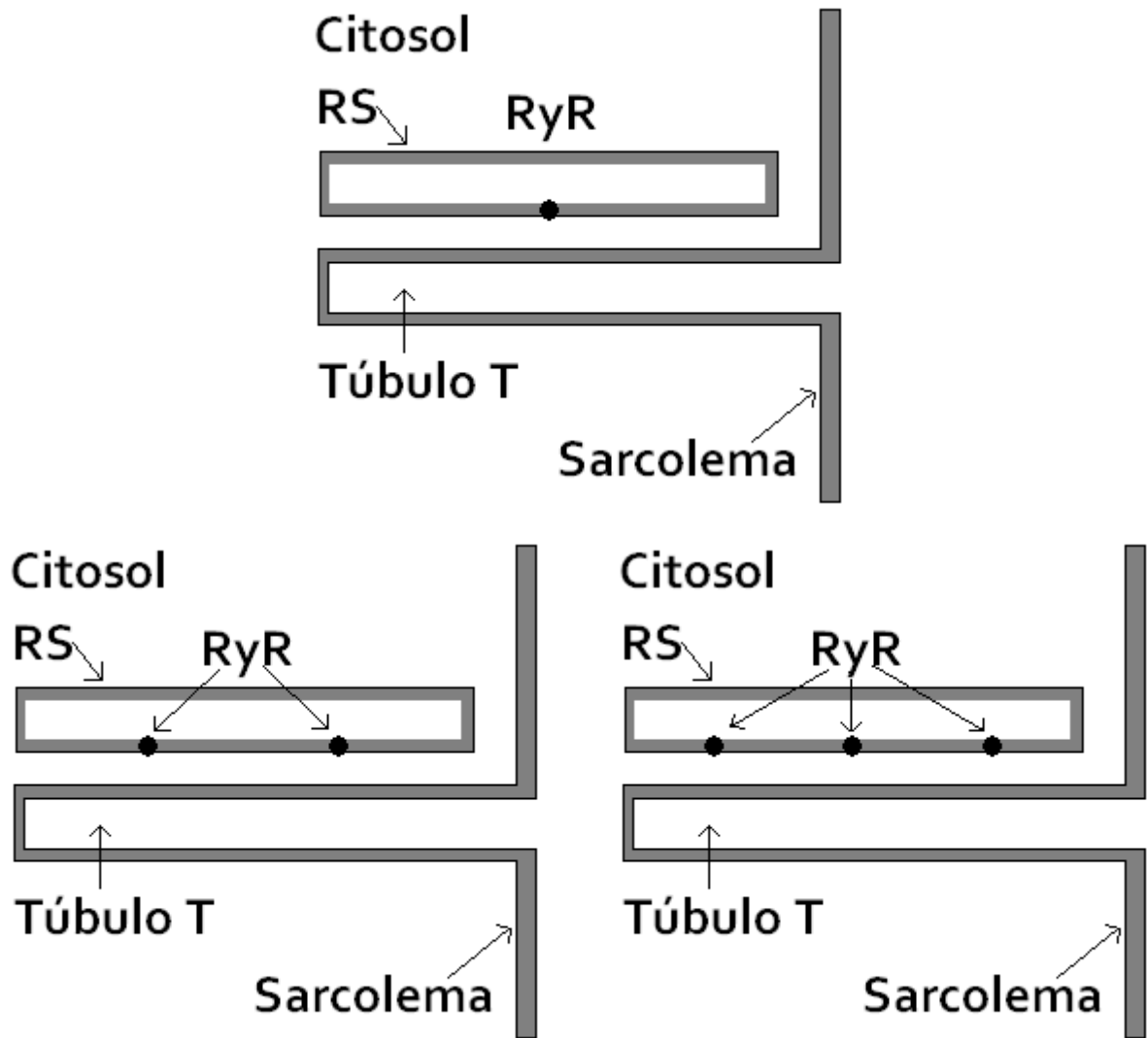


FIGURA 20: Modelos unidimensionales para el esquema de “disparo” de 1, 2 y 3 canales de RyR.

En las figuras 21, 22 y 23 se presentan los esquemas de “disparo”, de los receptores de RyR, utilizados en los experimentos “in silico” realizados en este trabajo.

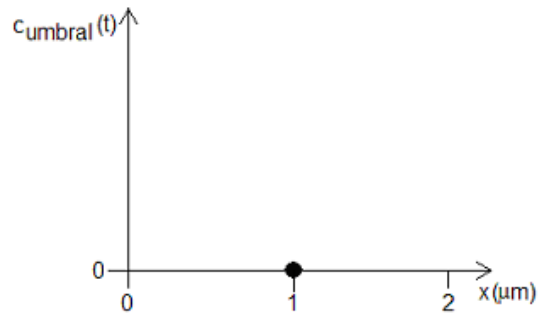


FIGURA 21: Esquema general de “disparo” de 1 receptor de RyR.

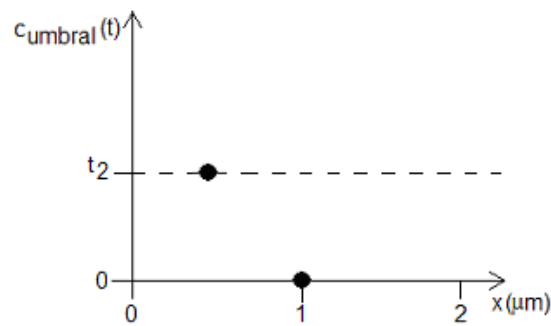


FIGURA 22: Esquema general de “disparo” de 2 receptores de RyR.

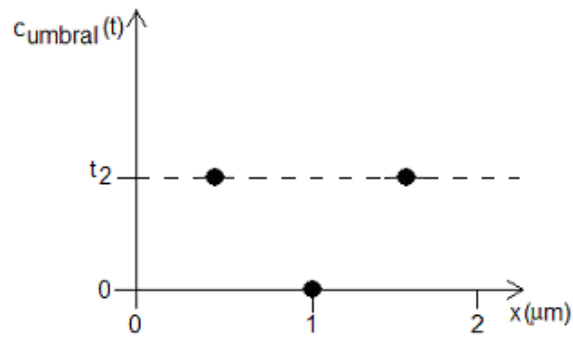


FIGURA 23: Esquema general de “disparo” de 3 receptores de RyR.

II.3. Programas Computacionales.

II.3.1 Código del programa de difusión simple.

```
% PROGRAMA PARA EL CALCULO DE LA SOLUCION DE LA EDP DE DIFUSION
% (METODO EXPLICITO, O(deltat,deltax^2)) CON CONDICIONES DE CONTORNO
% ESPECIFICAS - 1 CANAL
function dalessandro
% INTRODUCCION DE LAS VARIABLES L, J, T, deltat y D
L = input('introduzca el valor de L= '); % VALOR DE LA LONGITUD DEL SISTEMA
J = input('introduzca el valor de J= '); % VALOR DE SEPARACION DE LA MALLA LONGITUDINAL
T = input('introduzca el valor de T= '); % VALOR DEL TIEMPO DE SIMULACION
I = input('introduzca el valor de I= '); % VALOR DE SEPARACION DE LA MALLA TEMPORAL
D = input('introduzca el valor de D= '); % INTRODUCCION DEL COEFICIENTE DE DIFUSION
alfa = input('introduzca el valor de alfa= '); % PARAMETRO DEL BUFFER A CONSIDERAR
BASAL = input('introduzca el valor de la concentración de calcio BASAL= '); % CONCENTRACION BASAL DE
CALCIO EN EL CITOSOL
% INTRODUCCION DE LAS CONDICIONES DE BORDE
U0n = input('introduzca el valor U(0,t)= '); % VALOR DE LA CONDICION DE BORDE EN U(0,t)
ULn = input('introduzca el valor U(L,t)= '); % VALOR DE LA CONDICION DE BORDE EN U(L,t)
% CALCULO DE deltax, deltat y beta
deltax = L/(J-2)
deltat = T/I
s = (D/(1+alfa))*(deltat/deltax^2)
% CONSTRUCCION DE LA MATRIZ (L,T)
x=[0:deltax:L]; % Introduce el vector dimensional x
t=[0:deltat:T]; % Introduce el vector temporal t
%
R=length(x); %determina la dimension de las filas de la matriz
N=length(t); %determina la dimension de las columnas de la matriz
%
u=zeros(R,N); %matriz de ceros
%
u(1,:)=U0n; %sustitución de la primera fila por condicion de contorno
u(R,:)=ULn; %sustitución de la última fila por condicion de contorno
%-----CONDICIONES INICIALES-----
A=1 % PARAMETRO DE LA FUNCION GAUSIANA
sigma=0.02; % PARAMETRO DE LA FUNCION GAUSIANA
a =A /(sqrt(2*pi)*sigma); % CALCULO DEL FACTOR PRE-EXPONENCIAL DE LA FUNCION
GAUSIANA
for k=1:R % ITERACION
    %Co(k)= BASAL + a*exp([-0.5*((x(k)-(L/2))/sigma)^2]); %PRIMER CANAL
    Co(k)=BASAL
end
u(:,1)=Co;
%-----
%
% ITERACION PARA EL CALCULO DE LOS ELEMENTOS DE LA MATRIZ
l=0;
for n=1:N-1
    for m=1:R-2
        u(m+1,n+1)=(s*(u(m,n)+u(m+2,n)))+((1-2*s)*u(m+1,n));
    end
end
subplot(2,2,1) % INSTRUCCION PARA COLOCAR VARIOS GRAFICOS EN LA
MISMA FIGURA
for p=1:10:N
```

```

plot(x,u(:,p))
axis([0 2 0 30])
xlabel('eje longitudinal de canales de RyR')           %
ylabel('concentracion de ion calcio')                %
title('Grafico de respuesta de los canales de RyR')   %
pause(0.1)                                           %
hold on                                             %
end                                                 %
subplot(2,2,2)
surf(u)
shading interp
colormap copper
axis([0 80 0 20 0 30])
zlabel('concentración de ión calcio')
subplot(2,2,3)
plot(t,u(10,:),t,u(11,:))
axis([0 20 0 250])
ylabel('concentracion de ion calcio')
xlabel('eje temporal')
title('Grafico de concentración vs t para x=0.9 y x=1.0')
subplot(2,2,4)
plot(t,u(15,:),t,u(18,:))
axis([0 20 0 250])
ylabel('concentración de ión calcio')
xlabel('eje temporal')
title('Grafico de concentración vs t para x=1.4 y x=1.7')

```

II.3.2 Código del programa de difusión-reacción 1 canal de RyR.

```
% PROGRAMA PARA EL CALCULO DE LA SOLUCION DE LA EDP DE DIFUSION-REACCION
% C/1+C
% (METODO EXPLICITO, O(deltat,deltax^2)) CON CONDICIONES DE CONTORNO
% ESPECIFICAS - 1 CANAL
function dalessandro
% INTRODUCCION DE LAS VARIABLES L, J, T, deltat y D
L = input('introduzca el valor de L= '); % VALOR DE LA LONGITUD DEL SISTEMA
J = input('introduzca el valor de J= '); % VALOR DE SEPARACION DE LA MALLA LONGITUDINAL
T = input('introduzca el valor de T= '); % VALOR DEL TIEMPO DE SIMULACION
I = input('introduzca el valor de I= '); % VALOR DE SEPARACION DE LA MALLA TEMPORAL
D = input('introduzca el valor de D= '); % INTRODUCCION DEL COEFICIENTE DE DIFUSION
alfa = input('introduzca el valor de alfa= '); % PARAMETRO DEL BUFFER A CONSIDERAR
BASAL = input('introduzca el valor de la concentración de calcio BASAL= '); % CONCENTRACION BASAL DE
CALCIO EN EL CITOSOL
% INTRODUCCION DE LAS CONDICIONES DE BORDE
U0n = input('introduzca el valor U(0,t)= '); % VALOR DE LA CONDICION DE BORDE EN U(0,t)
ULn = input('introduzca el valor U(L,t)= '); % VALOR DE LA CONDICION DE BORDE EN U(L,t)
% CALCULO DE deltax, deltat y beta
deltax = L/(J-2)
deltat = T/I
s = (D/(1+alfa))*(deltat/deltax^2)
% CONSTRUCCION DE LA MATRIZ (L,T)
x=[0:deltax:L]; % Introduce el vector dimensional x
t=[0:deltat:T]; % Introduce el vector temporal t
%
R=length(x); %determina la dimension de las filas de la matriz
N=length(t); %determina la dimension de las columnas de la matriz
%
u=zeros(R,N); %matriz de ceros
%
u(1,:)=U0n; %sustitución de la primera fila por condicion de contorno
u(R,:)=ULn; %sustitución de la última fila por condicion de contorno
%-----CONDICIONES INICIALES-----
A=1 % PARAMETRO DE LA FUNCION GAUSIANA
sigma=0.002; % PARAMETRO DE LA FUNCION GAUSIANA
a =A /(sqrt(2*pi)*sigma); % CALCULO DEL FACTOR PRE-EXPONENCIAL DE LA FUNCION
GAUSIANA
for k=1:R % ITERACION
    Co(k)=BASAL + a*exp([-0.5*((x(k)-(L/2))/sigma)^2]); %PRIMER CANAL
    %Co(k)=100
end
u(:,1)=Co;
%-----
% ITERACION PARA EL CALCULO DE LOS ELEMENTOS DE LA MATRIZ
l=0;
for n=1:N-1
    for m=1:R-2
        if u(m+1,n)<= BASAL % INTERRUPTOR DE LA BOMBA SERCA
            h=0;
        else
            h=1;
        end
        u(m+1,n+1)=(s*(u(m,n)+u(m+2,n)))+(1-2*s)*u(m+1,n)- h*(deltat*(u(m+1,n)/(1+u(m+1,n))));
    end
end
```

```

end
end
subplot(2,2,1)                                % INSTRUCCION PARA COLOCAR VARIOS GRAFICOS EN LA
MISMA FIGURA
for p=1:10:N                                    %
    plot(x,u(:,p),'r')
    axis([0 2 0 250])
    xlabel('eje longitudinal de canales de RyR')    %
    ylabel('intensidad de la concentracion de ion calcio') %
    title('Grafico de respuesta de los canales de RyR') %
    pause(0.1)                                     %
    hold on                                         %
end                                                 %
subplot(2,2,2)
surf(u)
shading interp
colormap copper
axis([0 80 0 20 0 250])
zlabel('concentracion de ion calcio')
subplot(2,2,3)
plot(t,u(10,:), 'r', t,u(11,:), 'y')
ylabel('concentracion de ion calcio')
xlabel('eje temporal')
title('Grafico de concentración vs t para x=0.9 y x=1.0')
subplot(2,2,4)
plot(t,u(15,:), 'r', t,u(18,:), 'y')
ylabel('concentracion de ion calcio')
xlabel('eje temporal')
title('Grafico de concentración vs t para x=1.4 y x=1.7')

```

II.3.3 Código del programa de difusión-reacción 2 canales de RyR.

```
% PROGRAMA PARA EL CALCULO DE LA SOLUCION DE LA EDP DE DIFUSION-REACCION
% C/1+C
% (METODO EXPLICITO, O(deltat,deltax^2)) CON CONDICIONES DE CONTORNO
% ESPECIFICAS - 2 CANALES
function dalessandro
% INTRODUCCION DE LAS VARIABLES L, J, T, deltat y D
L = input('introduzca el valor de L= '); % VALOR DE LA LONGITUD DEL SISTEMA
J = input('introduzca el valor de J= '); % VALOR DE SEPARACION DE LA MALLA LONGITUDINAL
T = input('introduzca el valor de T= '); % VALOR DEL TIEMPO DE SIMULACION
I = input('introduzca el valor de I= '); % VALOR DE SEPARACION DE LA MALLA TEMPORAL
D = input('introduzca el valor de D= '); % INTRODUCCION DEL COEFICIENTE DE DIFUSION
alfa = input('introduzca el valor de alfa= '); %PARAMETRO DEL BUFFER A CONSIDERAR
BASAL = input('introduzca el valor de la concentración de calcio BASAL= '); % CONCENTRACION BASAL DE
CALCIO EN EL CITOSOL
% INTRODUCCION DE LAS CONDICIONES DE BORDE
U0n = input('introduzca el valor U(0,t)= '); % VALOR DE LA CONDICION DE BORDE EN U(0,t)
ULn = input('introduzca el valor U(L,t)= '); % VALOR DE LA CONDICION DE BORDE EN U(L,t)
umbral = input('introduzca el umbral del segundo canal= ');
% CALCULO DE deltax, deltat y beta
deltax= L/(J-2)
deltat= T/I
s = (D/(1+alfa))*(deltat/deltax^2)
% CONSTRUCCION DE LA MATRIZ (L,T)
x=[0:deltax:L];
t=[0:deltat:T];
%
R=length(x); %determina la dimension de las filas de la matriz
N=length(t); %determina la dimension de las columnas de la matriz
%
u=zeros(R,N); %matriz de ceros
%
u(1,:)=U0n; %sustitución de la primera fila por condicion de contorno
u(R,:)=ULn; %sustitución de la última fila por condicion de contorno
%-----CONDICIONES INICIALES-----
A=1 % PARAMETRO DE LA FUNCION GAUSIANA
A2=0.5
sigma=0.002; % PARAMETRO DE LA FUNCION GAUSIANA
a =A /(sqrt(2*pi)*sigma); % CALCULO DEL FACTOR PRE-EXPONENCIAL DE LA FUNCION GAUSIANA
a2 =A2 /(sqrt(2*pi)*sigma);
for k=1:R % ITERACION
    Co(k)=BASAL + a*exp([-0.5*((x(k)-(L/2))/sigma)^2]); %PRIMER CANAL
end
u(:,1)=Co;
%-----
%
% ITERACION PARA EL CALCULO DE LOS ELEMENTOS DE LA MATRIZ
l=0;
for n=1:N-1
    for m=1:R-2
        if u(m+1,n)<= BASAL
            h=0;
        else
            h=0.5;
        end
    end
end
```

```

end
u(m+1,n+1)=(s*(u(m,n)+u(m+2,n))+((1-2*s)*u(m+1,n))- h*(deltat*(u(m+1,n)/(1+u(m+1,n)))));
end
if (u(14,n+1) >= umbral) && (l==0);
for v=1:R
    SC(v)=BASAL + a2*exp([-0.5*((x(v)-(L/4))/sigma)^2]); %SEGUNDO CANAL
end
c(:,1)= SC;
u(:,n+1)= u(:,n+1)+ c;
l=l+1;
end
end
subplot(2,2,1) % INSTRUCCION PARA COLOCAR VARIOS GRAFICOS EN LA
MISMA FIGURA
for p=1:N %
    plot(x,u(:,p))
    axis([0 L 0 250])
    xlabel('eje longitudinal de canales de RyR') %
    ylabel('intensidad de la concentracion de ion calcio') %
    title('Grafico de respuesta de los canales de RyR') %
    pause(0.1) %
    hold on %
end %
subplot(2,2,2)
surf(u)
shading interp
colormap copper
axis([0 80 0 20 0 250])
zlabel('concentracion de ion calcio')
subplot(2,2,3)
plot(t,u(10,:),t,u(11,:))
ylabel('concentracion de ion calcio')
xlabel('eje temporal')
title('Grafico de concentración vs t para x=0.9 y x=1.0')
subplot(2,2,4)
plot(t,u(15,:),t,u(18,:))
ylabel('concentracion de ion calcio')
xlabel('eje temporal')
title('Grafico de concentración vs t para x=1.4 y x=1.7')

```

II.3.4 Código del programa de difusión-reacción 3 canales de RyR.

```
% PROGRAMA PARA EL CALCULO DE LA SOLUCION DE LA EDP DE DIFUSION-REACCION
% C/1+C
% (METODO EXPLICITO, O(deltat,deltax^2)) CON CONDICIONES DE CONTORNO
% ESPECIFICAS - 3 CANALES
function dalessandro
% INTRODUCCION DE LAS VARIABLES L, J, T, deltat y D
L = input('introduzca el valor de L= '); % VALOR DE LA LONGITUD DEL SISTEMA
J = input('introduzca el valor de J= '); % VALOR DE SEPARACION DE LA MALLA LONGITUDINAL
T = input('introduzca el valor de T= '); % VALOR DEL TIEMPO DE SIMULACION
I = input('introduzca el valor de I= '); % VALOR DE SEPARACION DE LA MALLA TEMPORAL
D = input('introduzca el valor de D= '); % INTRODUCCION DEL COEFICIENTE DE DIFUSION
BASAL = input('introduzca el valor de la concentración de calcio BASAL= '); % CONCENTRACION BASAL DE
CALCIO EN EL CITOSOL
alfa = input('introduzca el valor de alfa= '); %PARAMETRO DEL BUFFER A CONSIDERAR
% INTRODUCCION DE LAS CONDICIONES DE BORDE
U0n = input('introduzca el valor U(0,t)= ');
ULn = input('introduzca el valor U(L,t)= ');
umbral = input('introduzca el umbral primer canal= ');
% CALCULO DE deltax, deltat y beta
deltax= L/(J-2)
deltat= T/I
s = (D/(1+alfa))*(deltat/deltax^2)
% CONSTRUCCION DE LA MATRIZ (L,T)
x=[0:deltax:L];
t=[0:deltat:T];
%
R=length(x) %determina la dimension de las filas de la matriz
N=length(t); %determina la dimension de las columnas de la matriz
%
u=zeros(R,N); %matriz de ceros
%
u(1,:)=U0n; %sustitución de la primera fila por condicion de contorno
u(R,:)=ULn; %sustitución de la última fila por condicion de contorno
%-----CONDICIONES INICIALES-----
A=1
A2=0.5
sigma=0.002;
a =A /(sqrt(2*pi)*sigma);
a2 =A2 /(sqrt(2*pi)*sigma);
for k=1:R
    Co(k)= BASAL + a*exp([-0.5*((x(k)-(L/2))/sigma)^2]); %PRIMER CANAL
end
u(:,1)=Co;
%-----
% ITERACION PARA EL CALCULO DE LOS ELEMENTOS DE LA MATRIZ
l=0;
i=0;
for n=1:N-1
    for m=1:R-2
        if u(m+1,n) <= BASAL % INTERRUPTOR DE LA BOMBA SERCA
            h=0;
        else
            h=1;
        end
    end
end
```

```

end
u(m+1,n+1)=(s*(u(m,n)+u(m+2,n))+((1-2*s)*u(m+1,n))- h*(deltat*(u(m+1,n)/(1+u(m+1,n)))));
end
if (u((R-1)/4,n+1) >= umbral) && (l==0);
for v=1:R
    SC(v)=BASAL + a2*exp([-0.5*((x(v)-(L/4))/sigma)^2]); %SEGUNDO CANAL
end
c(:,1)= SC;
u(:,n+1)= u(:,n+1)+ c;
l=l+1;
end
if (u(3*(R-1)/4,n+1) >= umbral) && (i==0);
for w=1:R
    TC(w)=BASAL + a2*exp([-0.5*((x(w)-(3*L/4))/sigma)^2]); %TERCER CANAL
end
d(:,1)= TC;
u(:,n+1)= u(:,n+1)+ d;
i=i+1;
end
end
subplot(2,2,1) % INSTRUCCION PARA COLOCAR VARIOS GRAFICOS EN LA
MISMA FIGURA
for p=1:N %
    plot(x,u(:,p))
    axis([0 L 0 250])%
    xlabel('eje longitudinal de canales de RyR') %
    ylabel('intensidad de la concentracion de ion calcio') %
    title('Grafico de respuesta de los canales de RyR') %
    pause(0.1) %
    hold on %
end %
subplot(2,2,2)
surf(u)
shading interp
colormap copper
axis([0 80 0 20 0 250])
zlabel('concentracion de ion calcio')
subplot(2,2,3)
plot(t,u(10,:),t,u(11,:))
ylabel('concentracion de ion calcio')
xlabel('eje temporal')
title('Grafico de concentración vs t para x=0.9 y x=1.0')
subplot(2,2,4)
plot(t,u(15,:),t,u(18,:))
ylabel('concentracion de ion calcio')
xlabel('eje temporal')
title('Grafico de concentración vs t para x=1.4 y x=1.7')

```

CAPITULO III:

RESULTADOS Y DISCUSIONES

III.1 ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN NÚMERICA

En la siguiente tabla se muestra como es afectada la estabilidad (d) de la solución numérica al variar α .

α	d	Δx (μm)	Δt (ms)	Estabilidad
1000	5,5694	0,1	0,25	NO
15000	0,3716	0,1	0,25	NO
18000	0,3097	0,1	0,25	SI
50000	0,1115	0,1	0,25	SI
1000	44,5554	0,05	0,5	NO
15000	2,9731	0,05	0,5	NO
18000	2,4776	0,05	0,5	NO
50000	0,8920	0,05	0,5	NO
150000	0,2873	0,05	0,5	SI

TABLA 8: Variación de la estabilidad (ver apéndice 4). $\alpha = b_l/k$.

Para una rejilla (0,1; 0,25) la estabilidad se obtiene para $d \leq 0,3097$ que corresponde a un valor de $\alpha \geq 18000$.

Para una rejilla (0,05; 0,5) la estabilidad se alcanza cuando $d \leq 0,2873$ lo cual corresponde a un valor de $\alpha \geq 150000$. Los experimentos siguientes se realizarán con una rejilla de tamaño (0,1; 0,25).

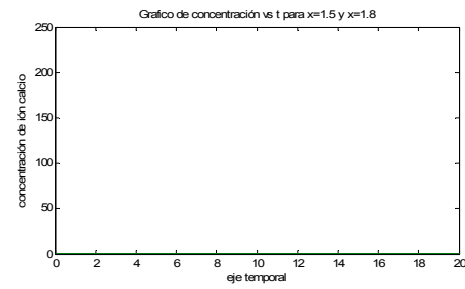
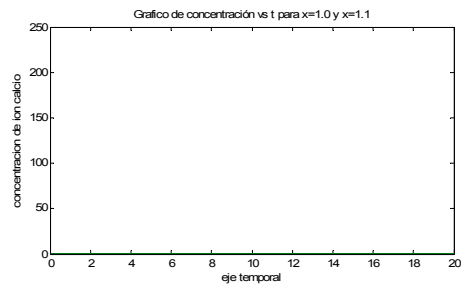
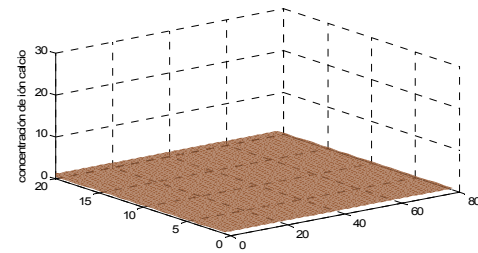
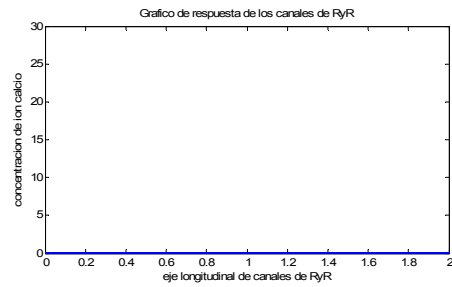
El análisis de estabilidad de von Neuman (ver apéndice IV) para la segunda ley de Fick (ec. de difusión simple) indica que $d \leq \frac{1}{2}$ y $\alpha \geq 11000$ para una rejilla de tamaño (0,1; 0,25). Los valores obtenidos en este experimento están dentro del rango esperado.

III.2 EXPERIMENTOS “IN SILICO”

III.2.1) COMPORTAMIENTO DE LA DIFUSIÓN SIMPLE CON UNA CONCENTRACIÓN INICIAL UNIFORME EN TODO X (SIN DISPARO DE RECEPTORES DE RYR).

TABLA 9: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACIÓN.

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
α	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	100	μM
$C(x=L)$	100	μM
Condiciones de iniciales		
$Co(x)$	100	μM



DISCUSIÓN: Al no existir gradiente de concentración, no existe difusión como lo predice la primera ley de Fick. Por otro lado, este experimento permite comprobar parcialmente el adecuado funcionamiento del software elaborado.

III.2.2 DIFUSIÓN SIMPLE, COMPORTAMIENTO DE LA FUNCION DELTA CON LA DESVIACION ESTÁNDAR SIGMA. CASO: $\sigma=0,002$

TABLA 10: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACIÓN.

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
α	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de iniciales		
$C_0(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=1 $\sigma=0,002$ Co=0,1	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM

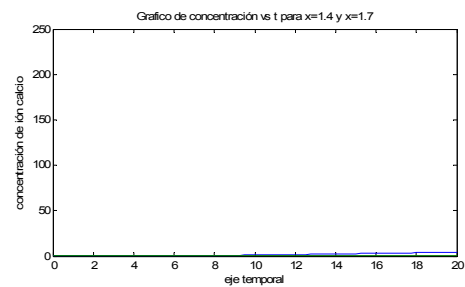
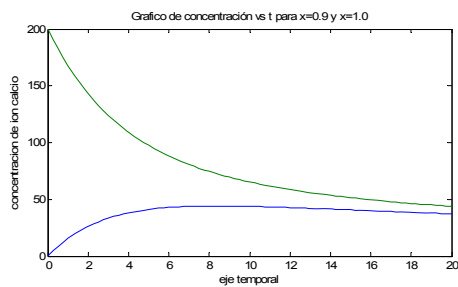
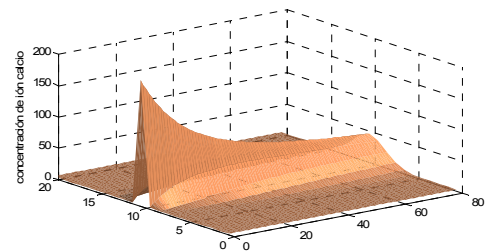
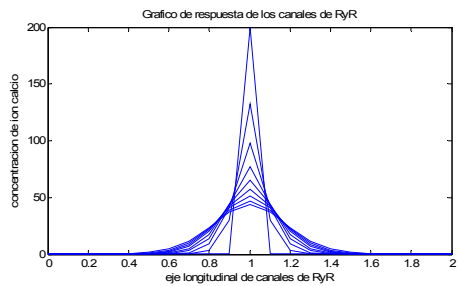


TABLA 11: CONDICIONES UTILIZADOS EN LA SIMULACIÓN. CASO $\sigma=0,02$

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
α	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de iniciales		
$Co(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=1 $\sigma=0,02$ Co=0,1	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM

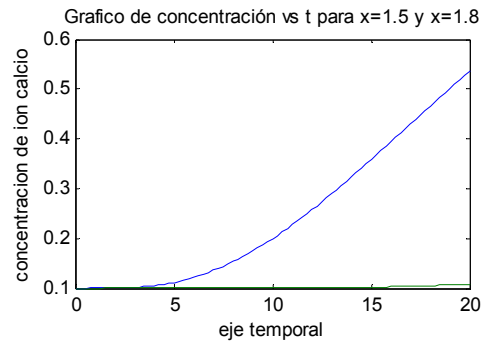
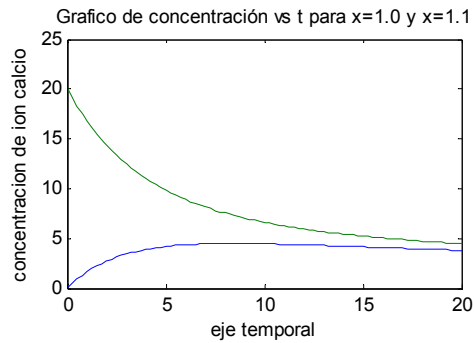
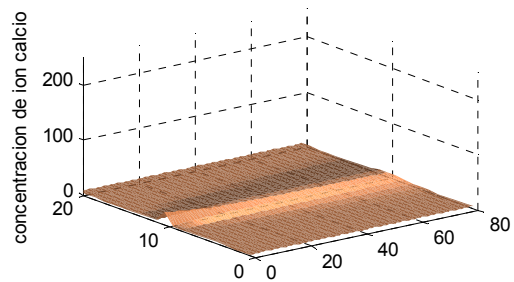
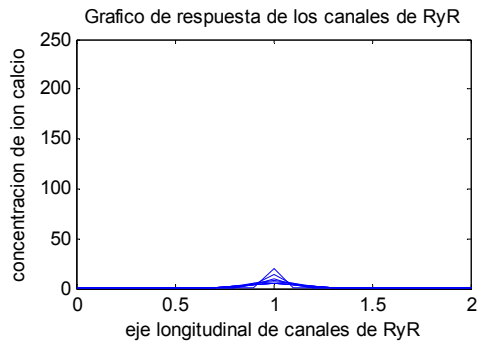


TABLA 12: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACIÓN. CASO $\sigma=0,2$

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
α	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de iniciales		
$Co(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=1 $\sigma=0,2$ Co=0,1	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM

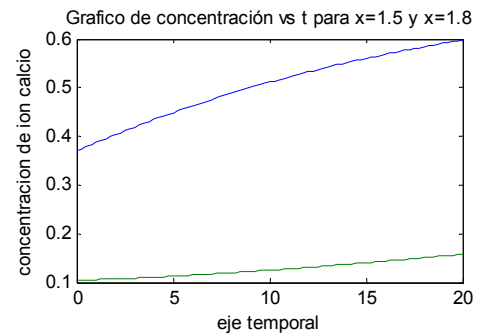
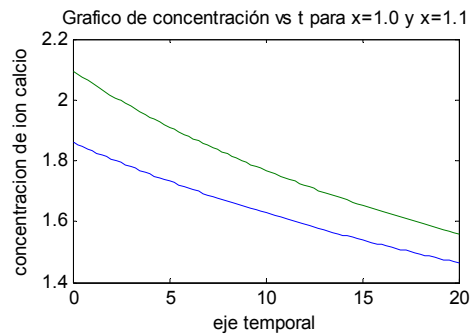
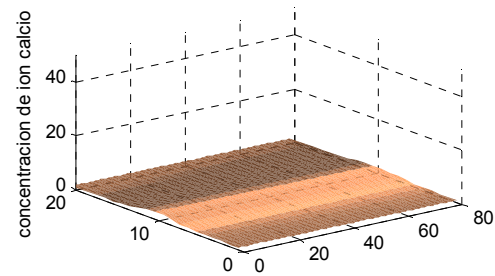
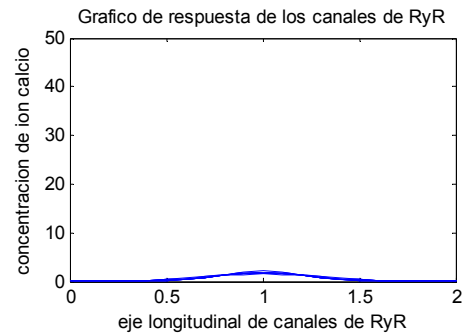


TABLA 13: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACIÓN. CASO $\sigma=2$

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	Ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
α	250000	u.a.
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de iniciales		
$Co(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=1 $\sigma=2$ Co=0,1	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM

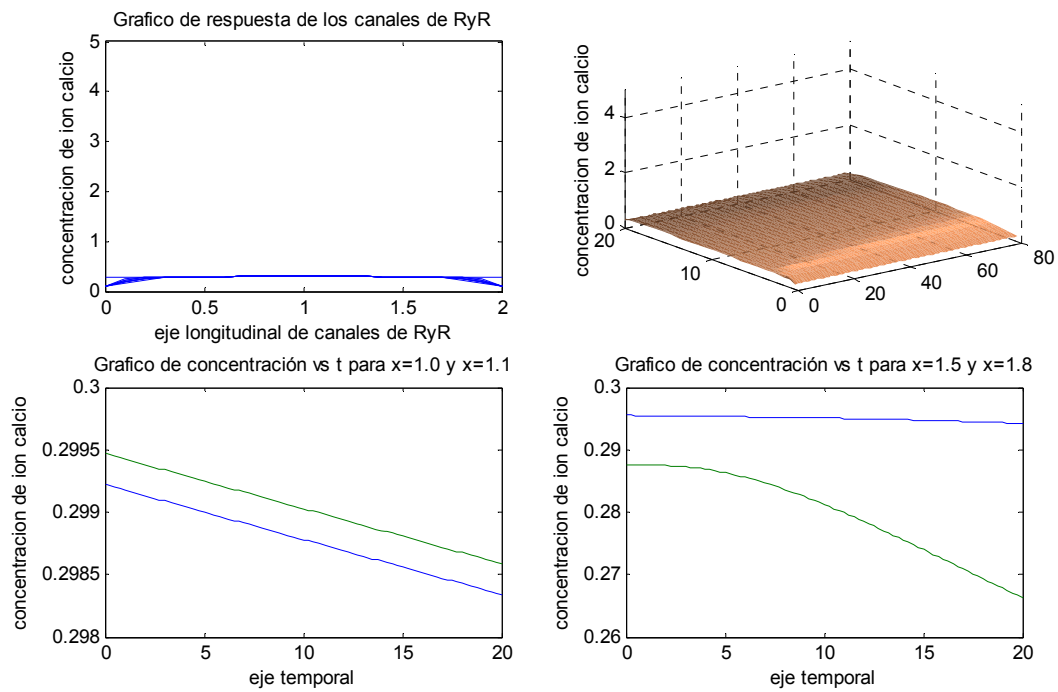


TABLA 14: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACIÓN. CASO $\sigma=0.0002$

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coeficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
α	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de iniciales		
$C_0(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_0$	A=1 $\sigma=0.0002$ Co=0,1	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM

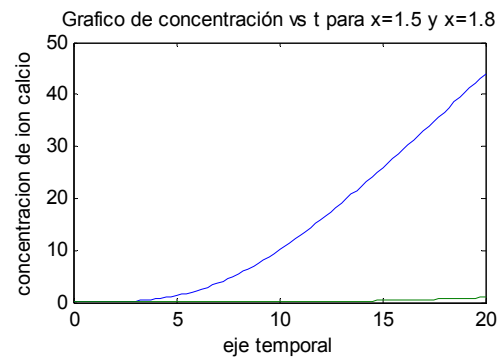
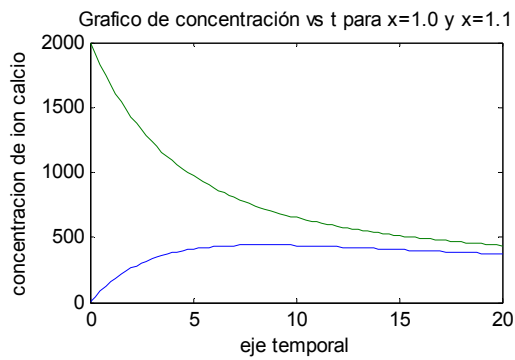
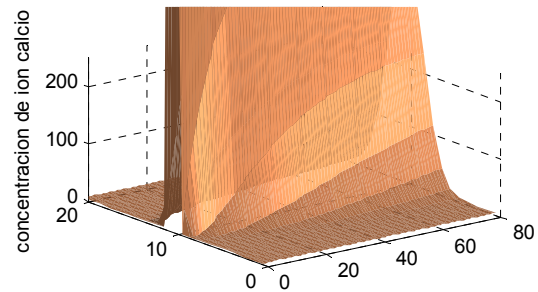
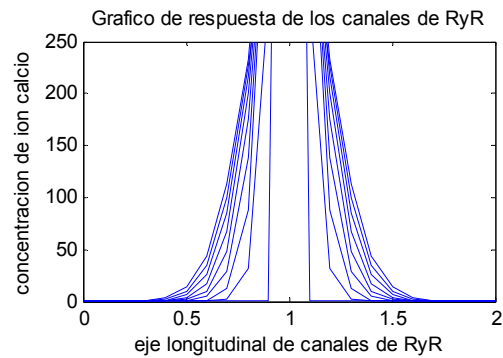


TABLA 15: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACIÓN. CASO $\sigma=0.0002$

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
α	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de iniciales		
$Co(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=1 $\sigma=0.0002$ Co=0,1	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM

Grafico de respuesta de los canales de RyR

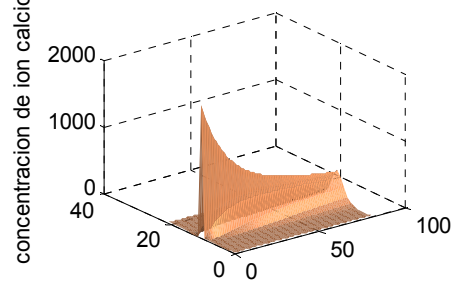
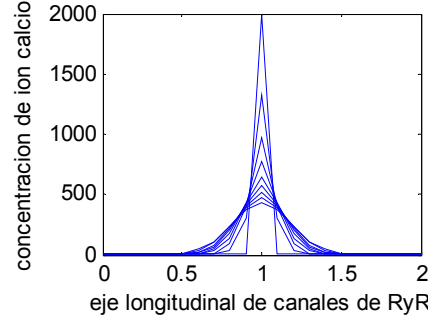


Grafico de concentración vs t para x=1.0 y x=1.8

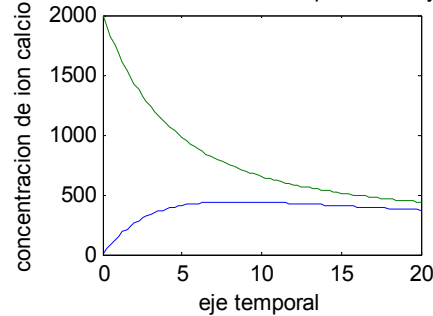
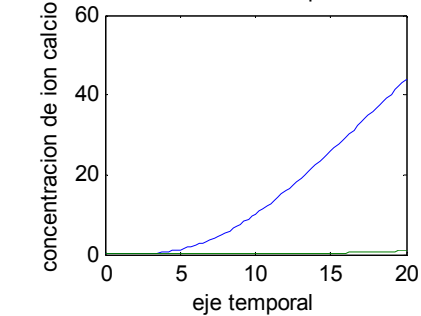


Grafico de concentración vs t para x=1.5 y x=1.8



DISCUSION: El conjunto de experimentos descritos en las tablas 10,11,12,13,14 y 15, permitieron obtener el valor de sigma óptimo para la representación del “disparo” de los receptores de RyR. Para $\sigma=2$ como puede observarse, el ancho de la gaussiana abarca todo el dominio espacial seleccionado para este problema, lo cual implica obviamente que no tenemos localizados el disparo de los receptores de RyR. Evidentemente un $\sigma>2$ no es posible por la longitud del dominio seleccionado. Por otra parte debe ser considerado que el límite de la concentración del ión calcio en el citosol no debe exceder el límite de los $200\mu M$ (*), lo cual implica que el valor optimo se obtiene para $\sigma=0,002$. Además este último valor de σ representa el 0,1% del ancho del intervalo, lo cual localiza adecuadamente al receptor de RyR.

(*)Este límite se ha determinado suponiendo que todos los iones calcio contenidos en el retículo son inyectados hacia el citosol, de tal manera que la nueva concentración (máxima) en este compartimiento es igual a:

$$\frac{N_o + N_{RS}}{V_{citosol}} = \frac{N_o + N_{RS}}{1,6V_{RS}} = \frac{(0,1\mu M)1,6V_{RS} + (325\mu M)V_{RS}}{1,6V_{RS}} \cong \frac{325\mu M}{1,6} = 203\mu M$$

(**) El valor de $V_{citosol} = 1,6 V_{RS}$ se ha obtenido usando los valores contenidos en la tabla 1.

III.2.3. DIFUSIÓN SIMPLE. COMPORTAMIENTO FUNCION DELTA CON FACTOR PRE-EXPONENCIAL A.

TABLA 16: CONDICIONES UTILIZADOS EN LA SIMULACION. CASO A=2,5

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	μm ² /ms
α	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
C(x=0)	0,1	μM
C(x=L)	0,1	μM
Condiciones de iniciales		
$Co(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=2.5 σ=0.002 Co=0,1	μM.μm μm μM

Grafico de respuesta de los canales de RyR

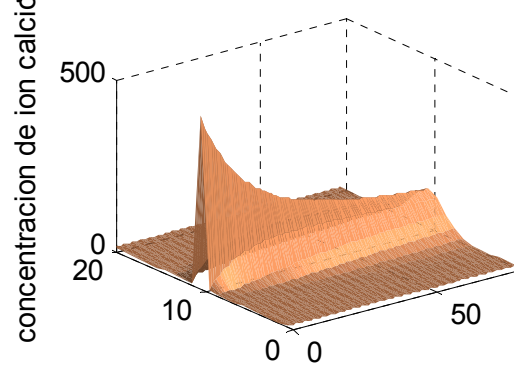
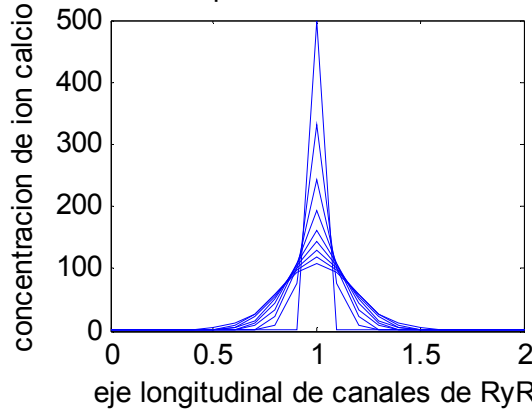


Grafico de concentración vs t para x=1.0 y

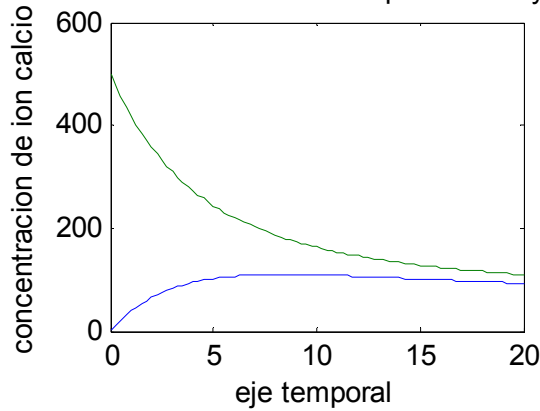
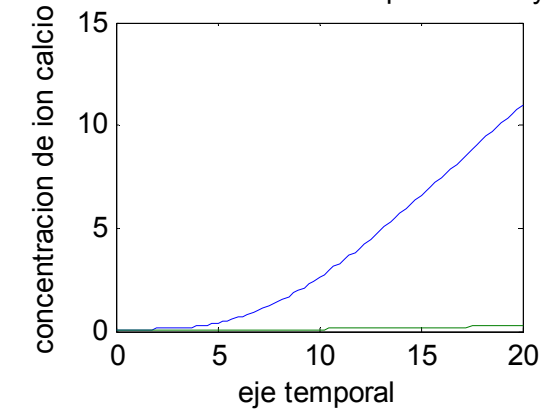


Grafico de concentración vs t para x=1.5 y x=1.8



DISCUSIÓN: El número de partículas inyectadas N por el receptor de RyR viene dada por:

$$N = A \int_0^2 \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} dx$$

de tal manera que al fijar $\sigma=0,002$, este número de partículas está determinado por el valor de A debido a que la integral tiene un valor fijo. Así un valor de A que sobrepase el valor límite de $200\mu\text{M}$ no será adecuado. Así el valor óptimo para A es 1.

III.2.4. DIFUSIÓN-REACCIÓN. INFLUENCIA DE h ($=r(1+\alpha)$) SOBRE LA CONCENTRACIÓN SIN INTERRUPTOR DE LA BOMBA SERCA.

TABLA 17: CONDICIONES UTILIZADOS EN LA SIMULACION. CASO $r=1$.

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coeficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
Alfa	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de SERCA		
r	1	
Condiciones de iniciales		
$Co(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=1 $\sigma=0.002$ Co=0,1	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM

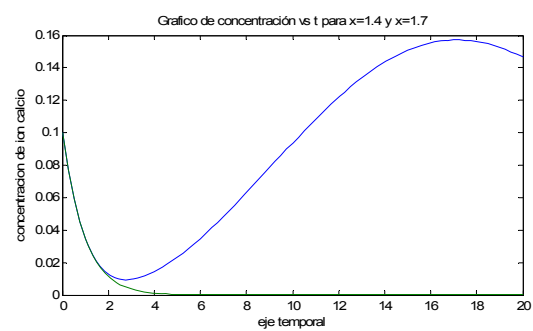
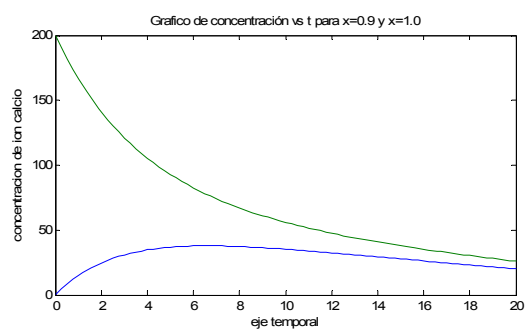
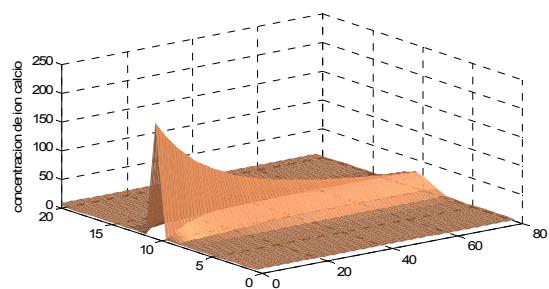
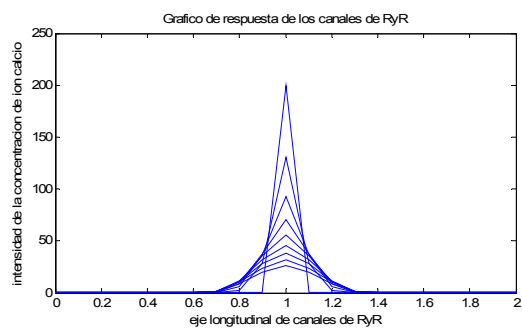


TABLA 18: CONDICIONES UTILIZADOS EN LA SIMULACION. CASO $r=2$

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coeficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
Alfa	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de SERCA		
r	2	
Condiciones de iniciales		
$Co(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=1 $\sigma=0.002$ Co=0,1 μM	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM

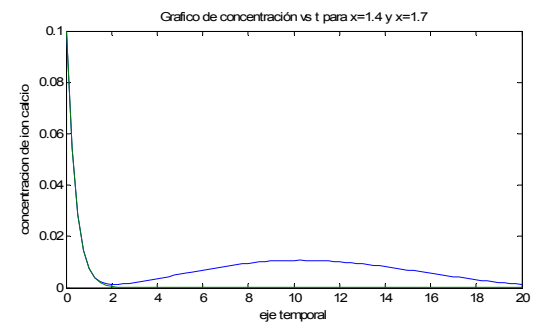
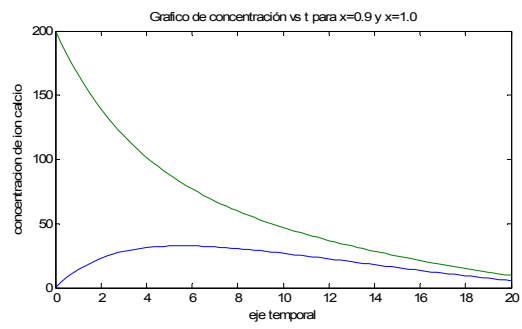
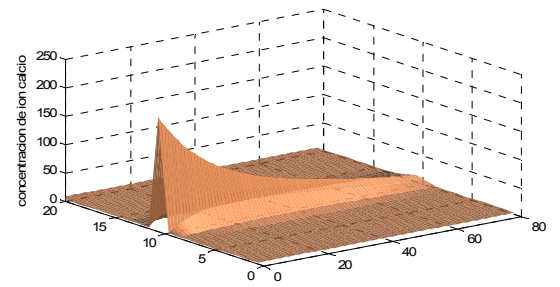
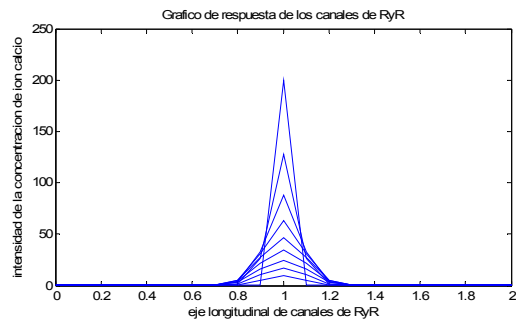
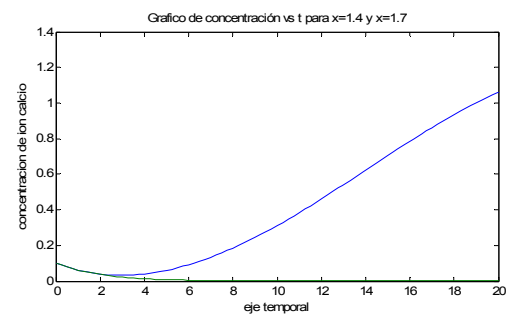
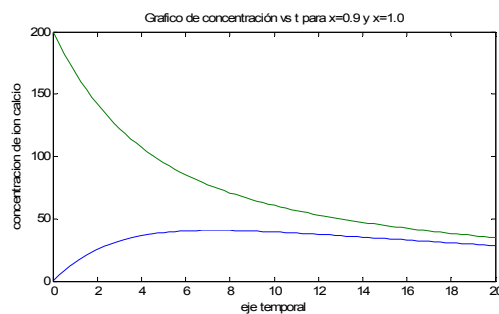
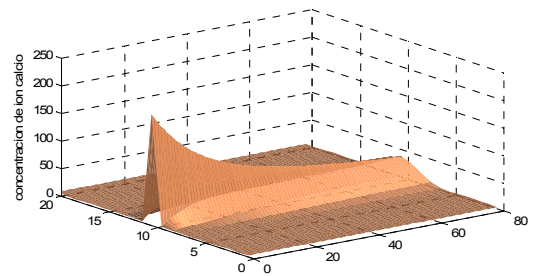
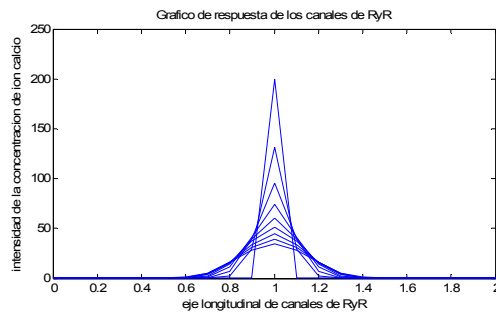


TABLA 19: CONDICIONES UTILIZADOS EN LA SIMULACION. CASO $r=0,5$

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
Alfa	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de SERCA		
r	0,5	
Condiciones de iniciales		
$Co(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=1 $\sigma=0.002$ Co=0,1	$\mu\text{M}.\mu\text{m}$ μm μM



DISCUSION: Con estos experimentos analizamos la influencia de la bomba SERCA sobre la concentración del ión calcio en el citosol. El parámetro r mide las variaciones del flujo de calcio asociado a SERCA. Cuando $r=0,5$ el comportamiento de la concentración de ión calcio para puntos cercanos al receptor de RyR ($x=0,9$, línea color azul y $x=1,0$, línea color verde) presenta el siguiente comportamiento: para $x=0,9$ la concentración parte del valor basal ($0,1\mu\text{M}$ condición inicial), luego alcanza un máximo debido a la difusión del ión calcio y luego la propia difusión y la acción de SERCA hacen que disminuya la concentración en este punto. Para el punto $x=1,0$ (curva color verde, localización del canal de RyR) la concentración parte de un valor máximo de $200\mu\text{M}$ y decae por efecto de la difusión y la acción de SERCA hasta un valor mínimo.

Para puntos alejados del canal de RyR ($x=1.5$ y $x=1.8$) se observa que la concentración cae por debajo de la basal (por acción de SERCA) antes que llegue el calcio que difunde por la liberación desde el canal de RyR. Para el punto menos alejado del canal de RyR ($x=1.5$, curva azul), después de cierto tiempo, la difusión del ión calcio compensa la acción de SERCA y la concentración se eleva hasta alcanzar un máximo y luego debe decaer.

Para $x=1,8$ la acción de SERCA hace disminuir la concentración por debajo del valor basal.

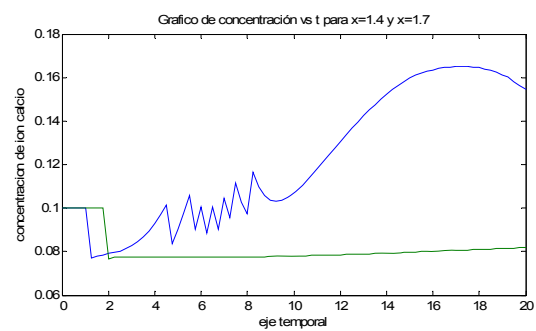
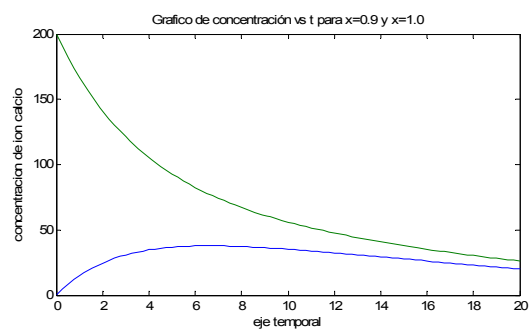
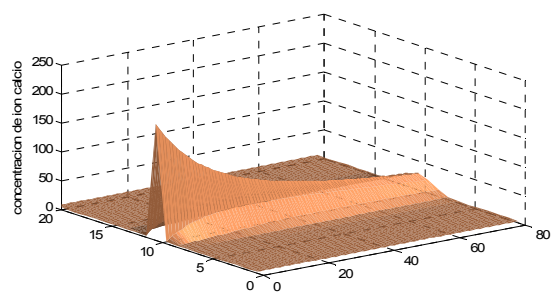
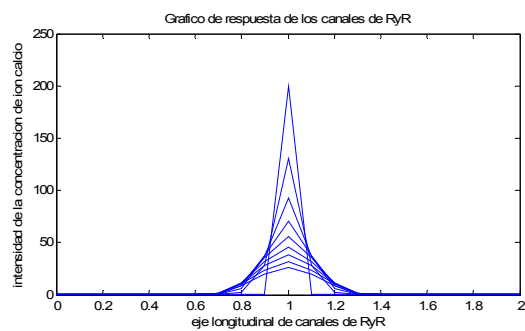
Para $r=1$ y $r=2$ se observa el mismo comportamiento para todos los puntos, excepto que el tiempo máximo (tiempo que transcurre hasta que se alcance el máximo de concentración) es menor, debido a que la acción de SERCA es más fuerte (incremento en la tasa de reingreso del ión calcio al RS). Las alturas de las curvas en el punto máximo (altura máxima) también decrece.

Es importante analizar el comportamiento de la curva para $x=1.4$ cuando $r=1$, en esta se observa que inicialmente la concentración disminuye por efecto de SERCA por debajo de la concentración basal (acción de SERCA sin interruptor), transcurrido un tiempo t el ión calcio proveniente del receptor hace que la concentración en este punto aumente hasta alcanzar un máximo y luego decae nuevamente por efecto de SERCA.

III.2.5 DIFUSIÓN-REACCIÓN. INFLUENCIA DE h SOBRE LA CONCENTRACIÓN CON INTERRUPTOR DE LA BOMBA SERCA .

TABLA 20: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACION. CASO $r=1$

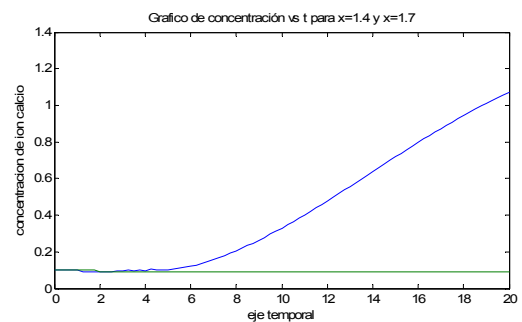
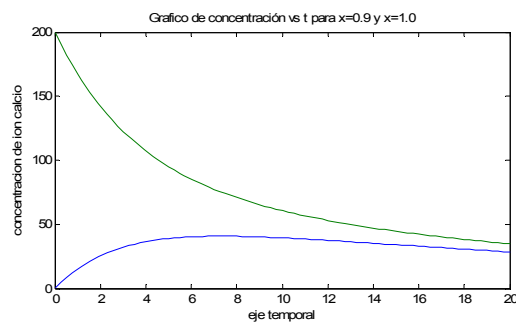
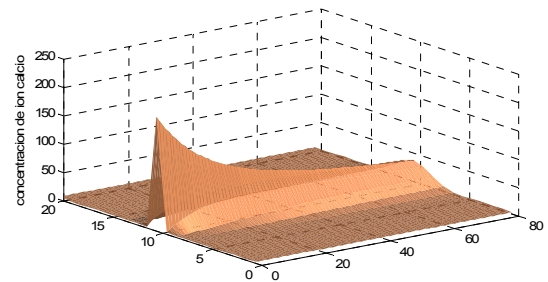
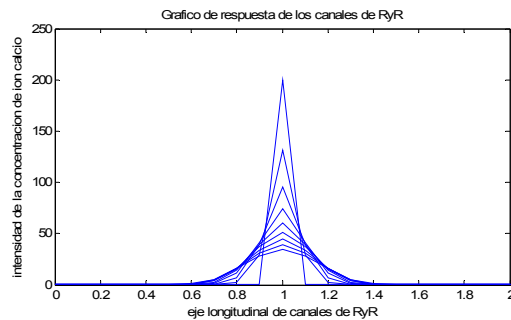
Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
Alfa	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de SERCA		
si $C \leq C_{\text{basal}}$ si $C > C_{\text{basal}}$	$r=0$ $r=1$	
Condiciones de iniciales		
$C_0(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	$A=1$ $\sigma=0.002$ $C_o=0,1$	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM



III.2.6 DIFUSIÓN-REACCIÓN. INFLUENCIA DE r SOBRE LA CONCENTRACIÓN CON INTERRUPTOR DE LA BOMBA SERCA .

TABLA 21: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACION. CASO $r=0,5$

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
Alfa	250000	μM
Nro de receptores	1	
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de SERCA		
$\text{si } C \leq C_{\text{basal}}$ $\text{si } C > C_{\text{basal}}$	$r=0$ $r=0,5$	
Condiciones de iniciales		
$C_0(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	$A=1$ $\sigma=0.002$ $C_o=0,1$	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM



DISCUSIÓN: En este grupo de experimentos “in silico” utilizamos un interruptor de SERCA (r) que esta en la posición “apagado” ($r=0$) cuando la concentración es igual a la basal o esta por debajo de ella, y esta en la posición “encendido” si la concentración esta por encima de la basal.

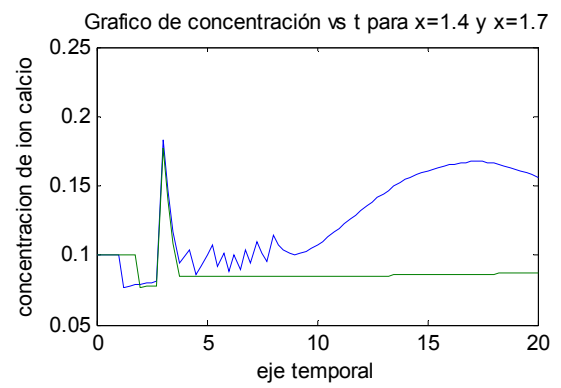
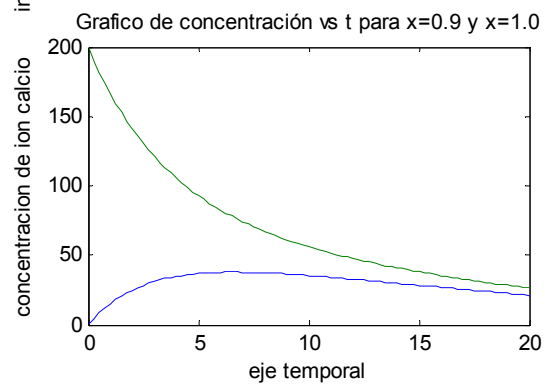
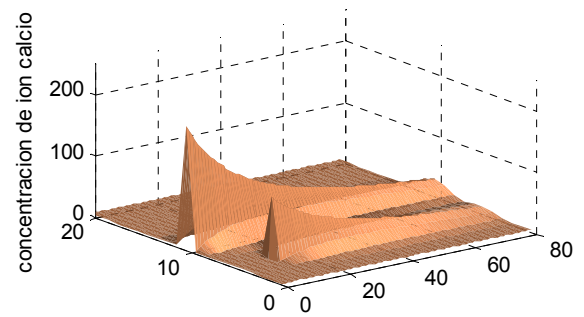
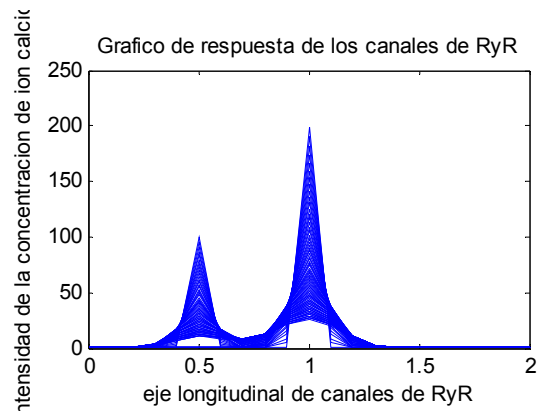
Para puntos alejados del receptor de RyR donde la concentración se mantiene inicialmente en los niveles basales, el comportamiento del interruptor es crítico como puede observarse en el punto ubicado en $x=1,5$ cuando $r=1$, en este caso se observa una región donde la concentración oscila por efecto del encendido y apagado del interruptor. Como la intensidad de la bomba es suficientemente alta, la concentración no puede mantenerse por encima de la concentración basal sino que baja e instantáneamente se interrumpe la acción de SERCA, luego el mecanismo difusivo aumenta la concentración, SERCA entra de nuevo en acción y baja la concentración nuevamente por debajo de la basal, presentándose un ciclo oscilatorio el cual culmina cuando la concentración alcanza niveles tales que la acción de SERCA no puede abatir la concentración hasta un valor inferior al basal y así la curva crece sostenidamente durante cierto tiempo, luego alcanzará un máximo, y finalmente la disminución del efecto difusivo hará declinar la curva.

Cuando $r=0,5$ la intensidad de la bomba es suficientemente baja, de tal manera que el ciclo oscilatorio no esta presente porque SERCA no puede bajar la concentración por debajo de la basal.

III.2.7 DIFUSIÓN-REACCIÓN. DISPARO DE UN SEGUNDO CANAL DE RYR BAJO LA ACCIÓN DE UN UMBRAL DE CONCENTRACIÓN (r=1)

TABLA 22: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACION.

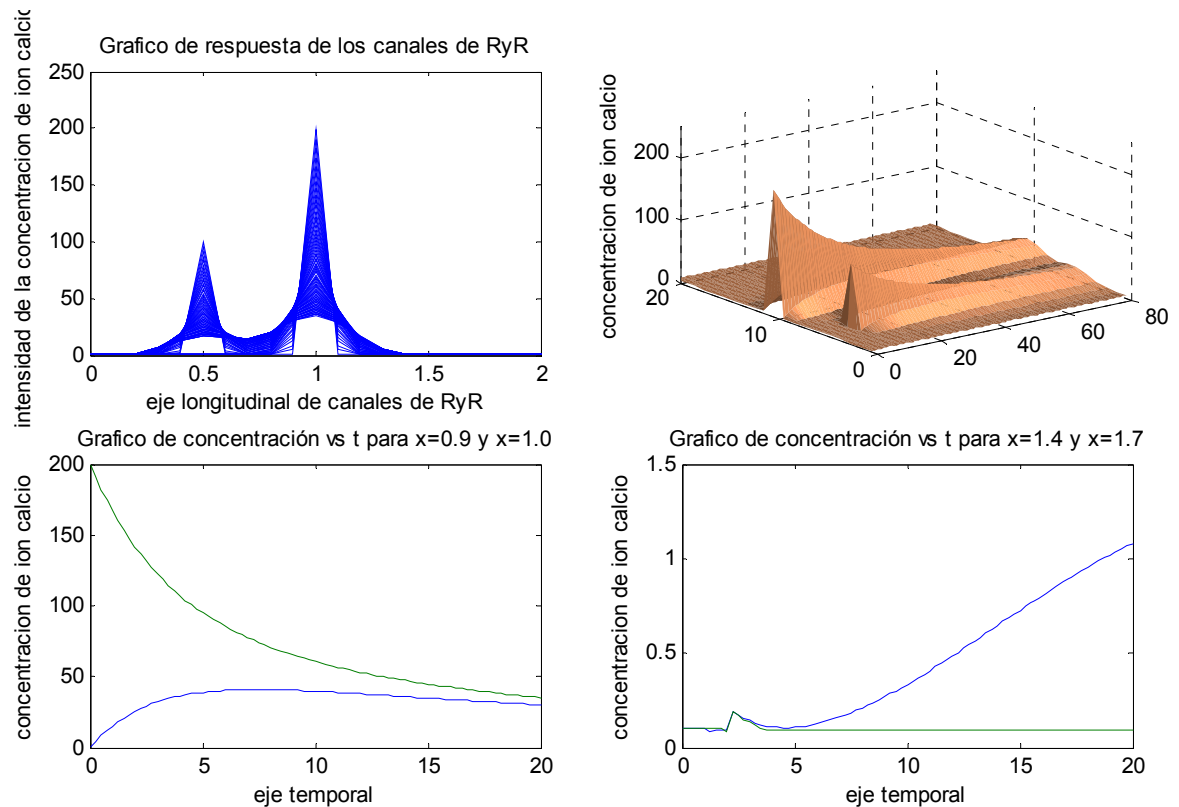
Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	μm ² /ms
Alfa	250000	μM
Nro de receptores	2	
Umbral de disparo	0.15	μM
Condiciones de borde		
C(x=0)	0,1	μM
C(x=L)	0,1	μM
Condiciones de SERCA		
si $C \leq C_{\text{basal}}$ si $C > C_{\text{basal}}$	r=0 r=1	
Condiciones de iniciales		
$Co(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=1 σ=0.002 Co=0,1	μM.μm μm μM
$C_2(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/4)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=0,5 σ=0.002 Co=0,1	μM.μm μm μM



III.2.8 DIFUSIÓN-REACCIÓN. DISPARO DE UN SEGUNDO CANAL DE RYR BAJO LA ACCIÓN DE UN UMBRAL DE CONCENTRACIÓN. (r=0,5)

TABLA 23: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACION. CASO $C_{UMBRAL}=0,15\mu\text{M}$

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	Ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
Alfa	250000	μM
Nro de receptores	2	
Umbral de disparo	0.15	μM
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de SERCA		
si $C \leq C_{\text{basal}}$ si $C > C_{\text{basal}}$	r=0 r=0,5	
Condiciones de iniciales		
$C_0(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=1 $\sigma=0.002$ Co=0,1	$\mu\text{M}.\mu\text{m}$ μm μM
$C_2(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/4)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=0,5 $\sigma=0.002$ Co=0,1	$\mu\text{M}.\mu\text{m}$ μm μM



DISCUSION: En este conjunto de gráficas (para $r=1$ y $r=0,5$) se representa un segundo canal de RyR que “dispara” ($x=0,5\mu\text{m}$), por efecto de un umbral de concentración ($C_{\text{umbral}}=0,15\mu\text{M}$) que libera la mitad de los iones calcio ($A=0,5$) inyectados por el canal central.

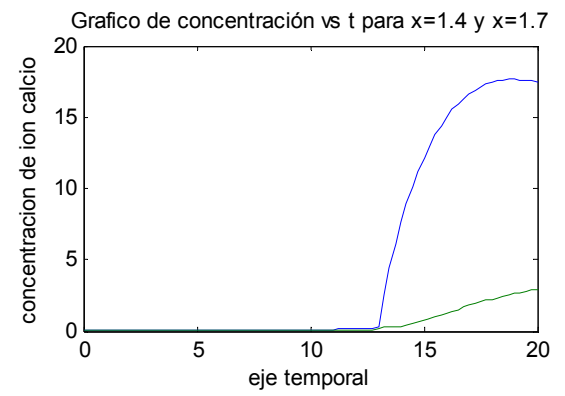
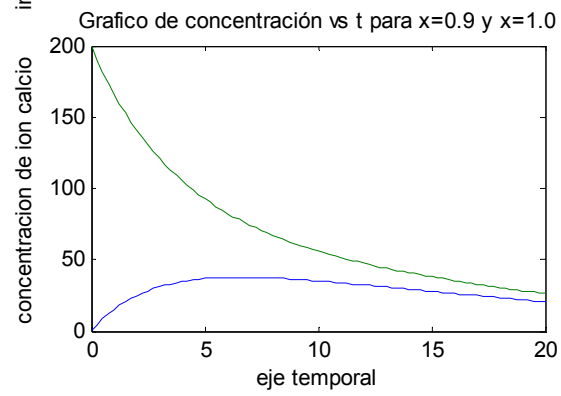
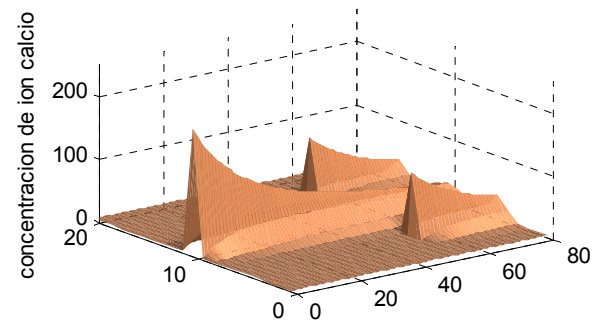
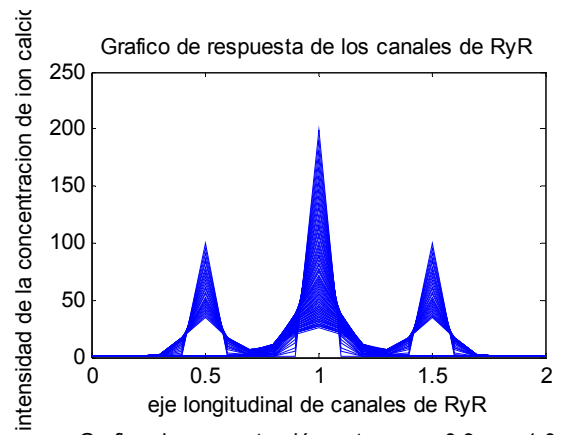
Cuando $r=1$ y $r=0,5$, en el punto $x=0.9\mu\text{m}$ (punto ubicado entre los dos receptores, gráfico inferior izquierdo - curva azul) la concentración aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo. Este punto no refleja el aumento de concentración por efecto del “disparo” del segundo canal ($x=0.5\mu\text{m}$), debido a que está suficientemente alejado de este y a la acción de SERCA.

Cuando $r=1$ y $r=0,5$, en la curva para $x=1.4\mu\text{m}$ (gráfico inferior derecho - curva azul) se observa un tiempo de retardo y una posterior oscilación debido al interruptor de la bomba SERCA, hasta que la concentración por efecto de la difusión vence el efecto de la bomba y la concentración aumenta sostenidamente, luego alcanzará un máximo que no se observa, y finalmente decaerá hasta el valor basal. En menor proporción se observa el mismo efecto del interruptor cuando $r=0,5$, lo cual indica la menor actividad de la bomba.

III.2.9 DIFUSIÓN-REACCIÓN. DISPARO DE UN SEGUNDO Y TERCER CANAL DE RYR BAJO LA ACCIÓN DE UN UMBRAL DE CONCENTRACIÓN (r=1)

TABLA 24: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACION.

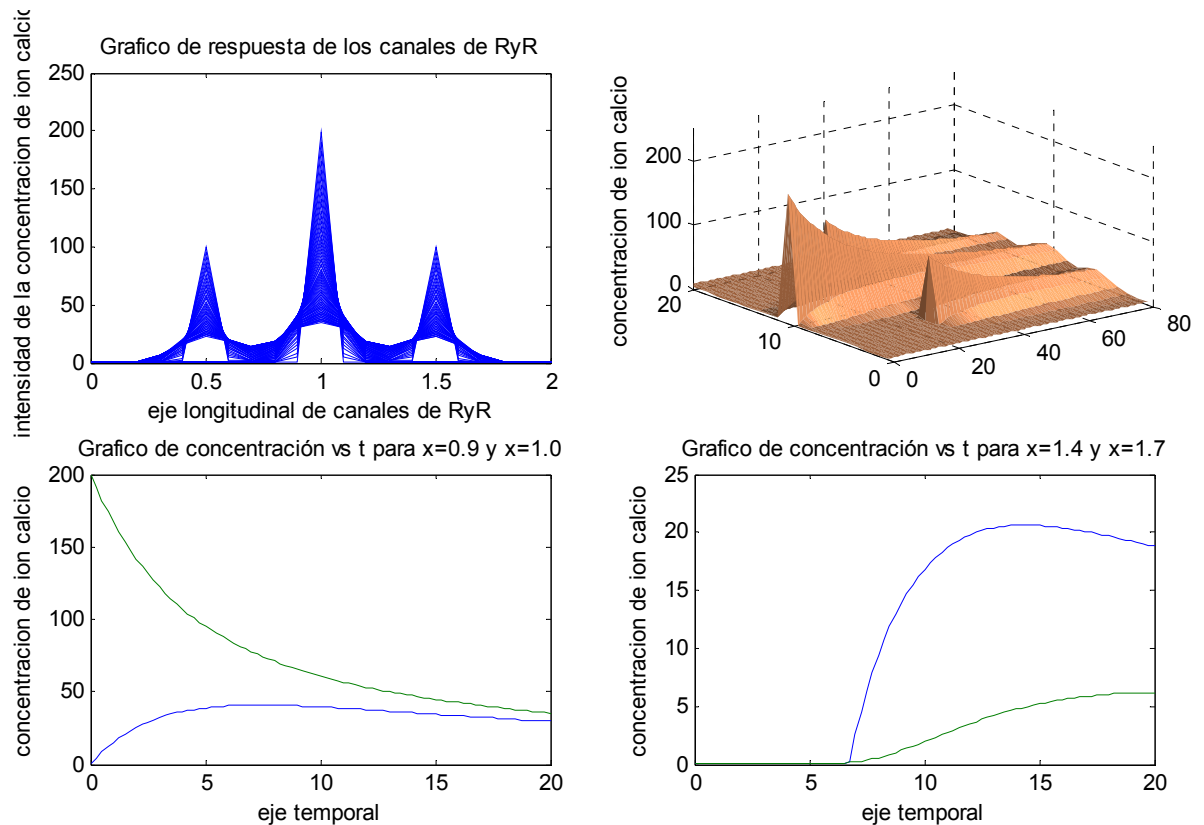
Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	M ms
I	80	
Coeficiente de difusión D	0,223	μm ² /ms
Alfa	250000	μM
Nro de receptores	3	
Umbral de disparo	0.15	μM
Condiciones de borde		
C(x=0)	0,1	μM
C(x=L)	0,1	μM
Condiciones de SERCA		
si $C \leq C_{\text{basal}}$ si $C > C_{\text{basal}}$	r=0 r=1	
Condiciones de iniciales		
$C_0(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=1 σ=0.002 Co=0,1	μM.μm μm μM
$C_2(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/4)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=0,5 σ=0.002 Co=0,1	μM.μm μm μM
$C_2(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-3L/4)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	A=0,5 σ=0.002 Co=0,1	μM.μm μm μM



III.2.10 DIFUSIÓN-REACCIÓN. DISPARO DE UN SEGUNDO Y TERCER CANAL DE RYR BAJO LA ACCIÓN DE UN UMBRAL DE CONCENTRACIÓN ($r=0,5$).

TABLA 25: CONDICIONES UTILIZADAS EN LA SIMULACION.

Parámetro	Valor	Unidades
Longitud	2	μm
J	22	
Tiempo	20	ms
I	80	
Coefficiente de difusión D	0,223	$\mu\text{m}^2/\text{ms}$
Alfa	250000	μM
Nro de receptores	3	
Umbral de disparo	0.15	μM
Condiciones de borde		
$C(x=0)$	0,1	μM
$C(x=L)$	0,1	μM
Condiciones de SERCA		
$\text{si } C \leq C_{\text{basal}}$ $\text{si } C > C_{\text{basal}}$	$r=0$ $r=0,5$	
Condiciones de iniciales		
$Co(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	$A=1$ $\sigma=0.002$ $Co=0,1$	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM
$C_2(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/4)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	$A=0,5$ $\sigma=0.002$ $Co=0,1$	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM
$C_2(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-3L/4)^2}{2\sigma^2}} + C_o$	$A=0,5$ $\sigma=0.002$ $Co=0,1$	$\mu\text{M} \cdot \mu\text{m}$ μm μM



DISCUSION: Este modelo comprende la liberación de calcio desde más de un canal de RyR. Se dispara inicialmente un canal central ($A=1$) y una vez superado un umbral de concentración ($c_{umbral}=0,15\mu M$) los receptores adicionales ubicados a la izquierda ($x=0,5\mu m$) y a la derecha ($x=1,5\mu m$) liberan la misma cantidad de iones calcio al citosol ($A=0,5$) en menos proporción que el canal central.

Cuando $r=1$, en el punto $x=0,9\mu m$ (curva azul – gráfico inferior izquierdo) aumenta la concentración progresivamente hasta alcanzar un punto máximo, en este punto no se refleja aumento de concentración por la liberación del canal izquierdo lateral, luego hay una posterior disminución de la concentración por efectos de la difusión y la actividad de la bomba SERCA. Cuando $r=0,5$ (curva azul – gráfico inferior derecho) el efecto general es el mismo excepto que el valor máximo se alcanza mas rápido debido a que SERCA tiene una menor actividad.

En el punto $x=1,4\mu m$ (curva azul – gráfico inferior derecho) el tiempo de retardo aumenta para $r=1$, lo cual esta de acuerdo con el incremento en la actividad de la bomba.

III.3. MODELO TRIDIMENSIONAL DE UNA FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA.

Este modelo es una representación tridimensional de las principales estructuras celulares de una célula de músculo esquelético de mamífero. Fue desarrollado en el programa de diseño Autodesk 3ds Max. El objetivo este trabajo para futuras aplicaciones, como por ejemplo, la exportación de la estructura del retículo sarcoplasmático al software COMSOL® donde se pueden realizar simulaciones por elemento finito sobre estructuras.

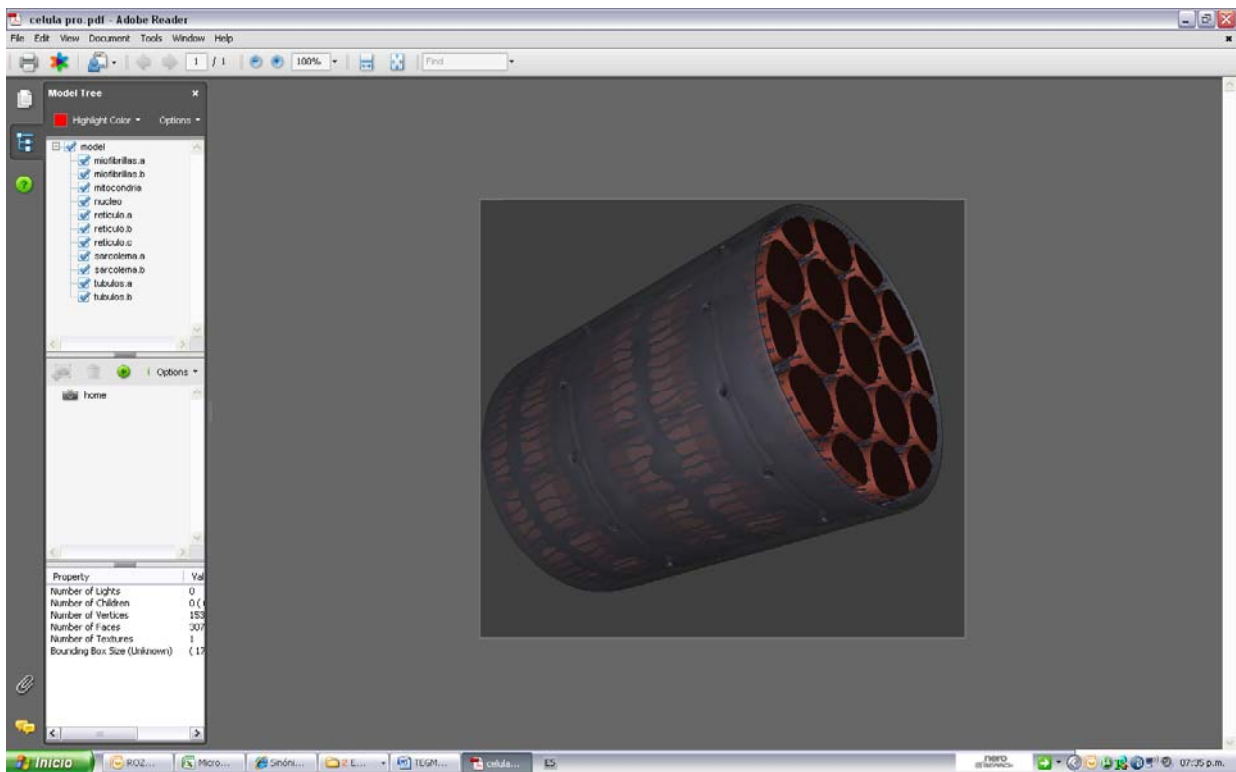


FIGURA 23: Modelo 3D de una fibra muscular esquelética donde se representan el sarcolema,

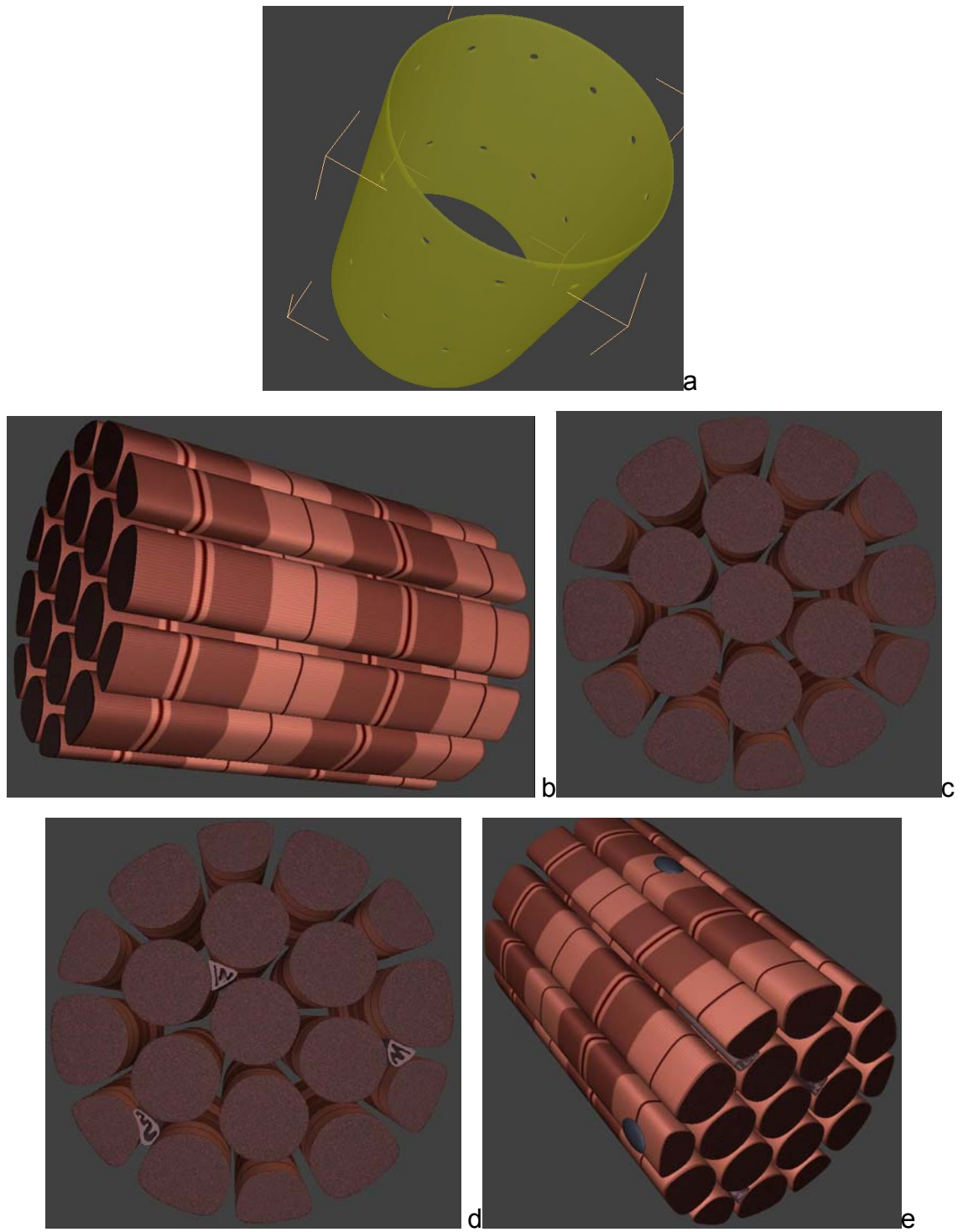


FIGURA 24: a) vista longitudinal del modelo tridimensional donde se observan las miofibrillas con el patrón de estriación. b) vista transversal de las miofibrillas y c) vista transversal de las miofibrillas y mitocondrias,

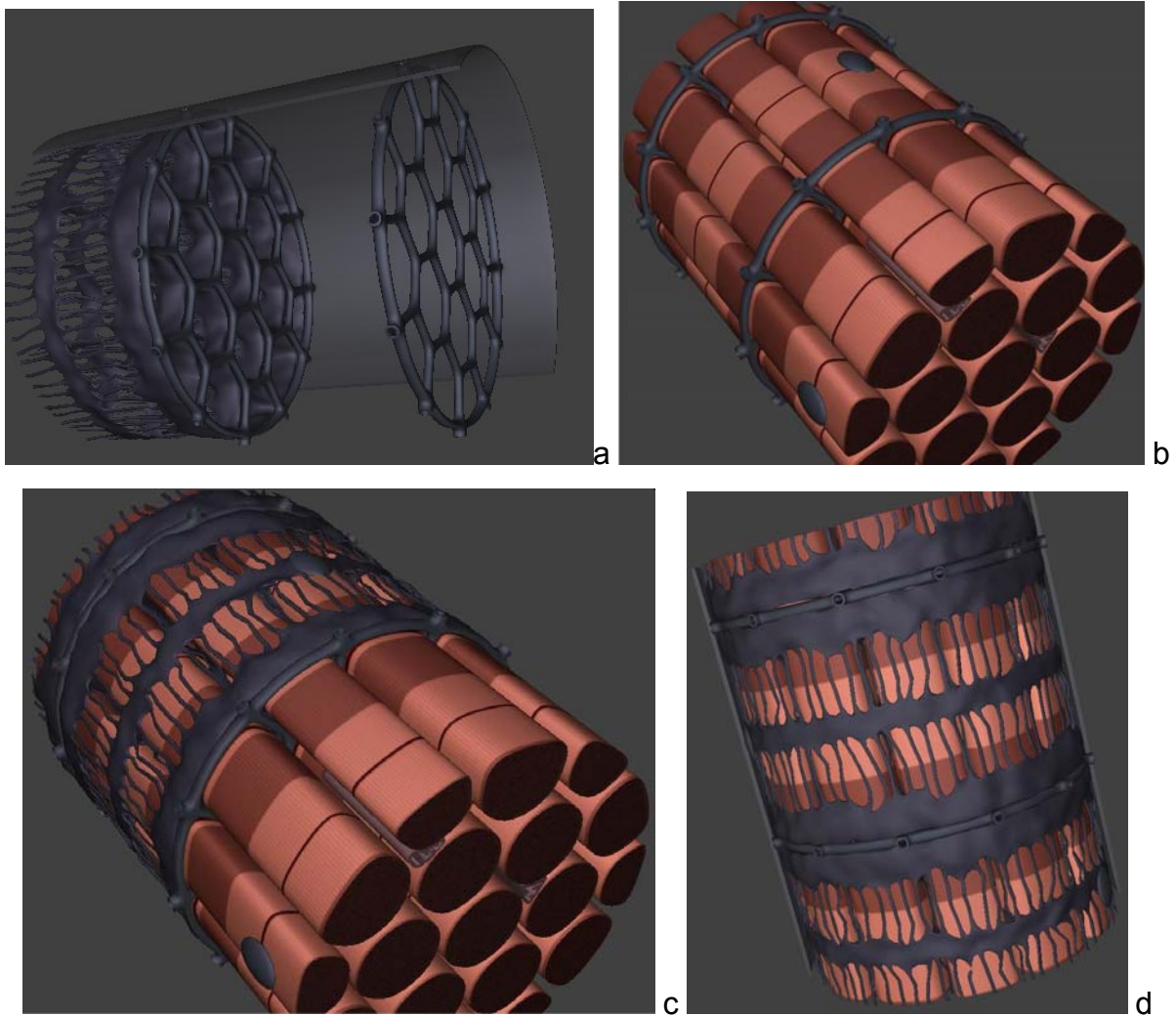


FIGURA 25: Conjunto de imágenes donde se observan las diferentes estructuras celulares, a) sistema de túbulos T y parte del sarcolema, b y c) miofibrillas, núcleos y mitocondrias, d) RS y triadas.

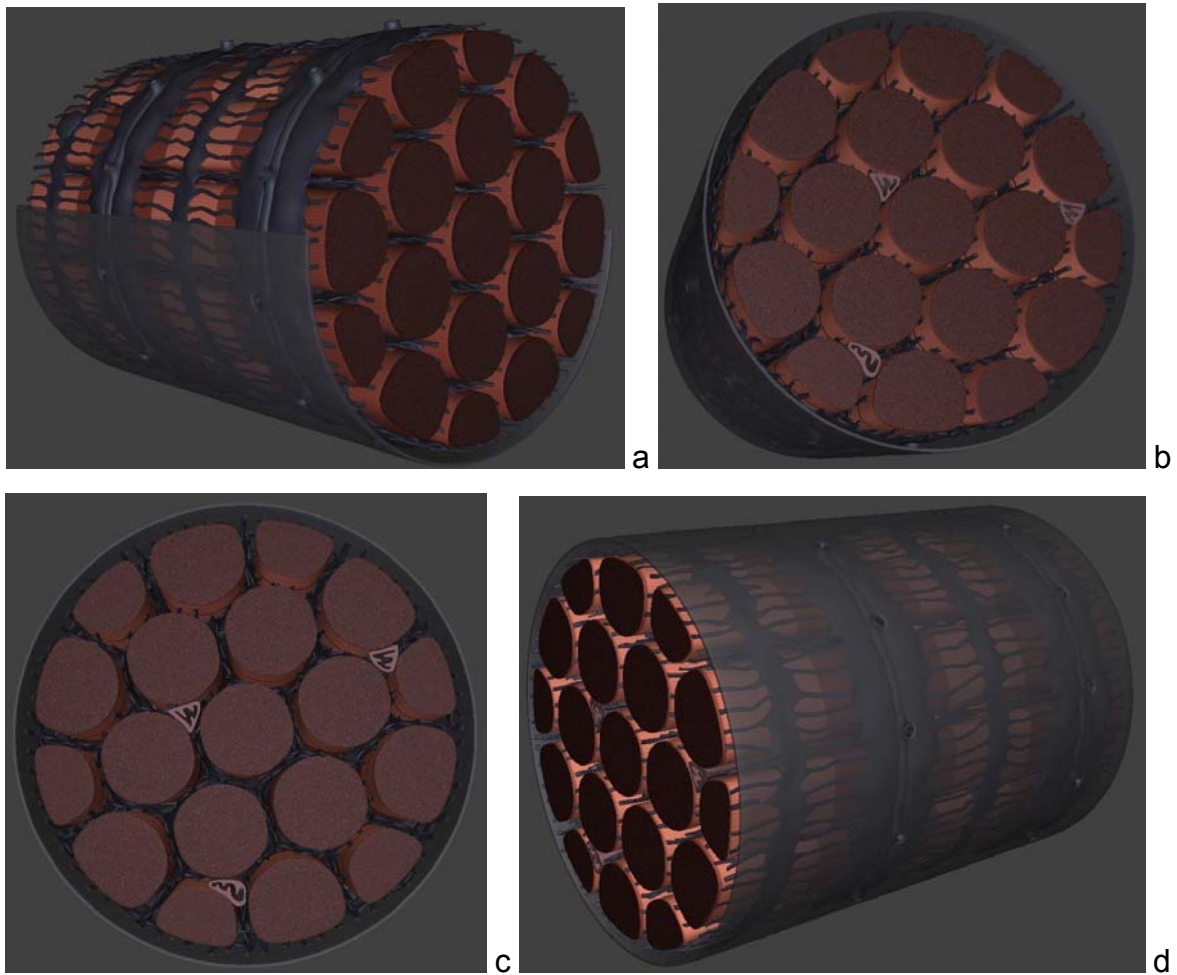


FIGURA 26: vista de diferentes ángulos del modelo tridimensional con todas las estructuras representadas,

CONCLUSIONES

1. El modelo unidimensional de difusión-reacción elaborado se pudo resolver numéricamente la EDP elaborando un software en Matlab 7.0 utilizando el método explícito FTCS de diferencia finita y las condiciones de borde ($c_o=0,1\mu\text{M}$) e iniciales fisiológicas ($c_o=0,1\mu\text{M}$).
2. Se pudo determinar el rango de estabilidad de la solución de la EDP encontrándose que esta es estable para $d\leq 0,3097$ y $\alpha\geq 18000$.
3. Los parámetros de celda óptimos encontrados fueron $\Delta x= 0,1\mu\text{m}$ y $\Delta t=0,25$ ms.
4. Se determinó el valor óptimo de la desviación estándar (σ) y el valor apropiado del parámetro A que es proporcional a la cantidad de iones liberados hacia el citosol por el canal de RyR. Los valores encontrados fueron: $\sigma=0,002$ y $A=1$. Se procedió a realizar experimentos “in silico” utilizando estos valores, y el valor de $\alpha=250.000$ típico de la parvoalbúmina en ciertos tipos de músculo esquelético.
5. Se realizaron experimentos de difusión-reacción “in silico” en donde se disparó un único canal de RyR en el instante inicial y en la mitad del intervalo ($x= 1\mu\text{m}$). Se analizó el comportamiento de la concentración en función de la posición y el tiempo, para cuatro locaciones $x=0.9; 1.0; 1,5$ y $1.7\mu\text{m}$ y para tres intensidades de la bomba ($r= h/(1+\alpha)=2, 1$ y 0.5), encontrándose que cuando la bomba SERCA tiene interruptor y $r=0,5$ y $r=1$, el comportamiento de la concentración es similar cualitativamente a los casos estudiados sin interruptor, en todas las locaciones, excepto, para $r=1$ y $x= 1.4\mu\text{m}$, en este punto la concentración oscila

por efecto del encendido y apagado del interruptor y de la variación de la concentración por efecto difusivo.

6. Se realizaron experimentos de difusión-reacción “in silico” en donde se dispararon dos canales de RyR con interruptor de SERCA, encontrándose para $r=1$ y $x=1.4 \mu\text{m}$ el mismo comportamiento oscilatorio descrito anteriormente. La concentración en el resto de las locaciones para $r=1$ y $0,5$ se comporta en forma similar desde el punto de vista cualitativo a los experimentos “in silico” con un único canal.
7. Se realizaron experimentos de difusión-reacción “in silico” en donde se dispararon tres canales de RyR. Se analizó el comportamiento de la concentración en función de la posición y el tiempo, para cuatro locaciones $x=0.9; 1.0; 1.4$ y $1.7 \mu\text{m}$ y para dos intensidades de la bomba ($r= h/(1+\alpha)=0,5$ y 1) con interruptor, encontrándose que para ambos valores de r el comportamiento cualitativo de la concentración es similar para la misma locación. Sin embargo, se puede observar que, para los puntos más alejados ($x=1.4$ y $1.7 \mu\text{m}$) los máximos de concentración se alcanzan antes para $r=0,5$ que para $r=1$, lo cual es debido a que la acción de SERCA para el primer caso es menor que para el segundo, y por ello, el ión calcio se puede acumular suficientemente rápido en el citosol.
8. El modelo tridimensional diseñado para el miocito esquelético posee una gran versatilidad puesto que la estructura de la célula se puede organizar y desorganizar a voluntad del usuario y posee ventanas de acceso muy amigables. El modelo podría ser utilizado en simulaciones más sofisticadas utilizando técnicas de Elemento Finito.

ANEXOS

APENDICE I

ECUACIONES EN DERIVADAS PARCIALES

ECUACIÓN:	USOS
$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$ 2da Ley de Fick Ley de Fourier	•Difusión térmica unidimensional •Difusión de sustancias unidimensional
$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right)$	Tridimensional y coordenadas rectangulares
$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - \frac{hc}{1+c}$ Ec. de difusión-reacción	Difusión de sustancias con buffer, fuentes y sumideros, Crecimiento de poblaciones, Crecimiento de tumores, Patrones de crecimiento, Morfología y Epidemias
$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) - \frac{hc}{1+c}$	•Tridimensional y coordenadas rectangulares
$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left[\left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] - \frac{hc}{1+c}$	Difusión térmica Difusión de sustancias bidimensional, coordenadas cilíndricas caso: axisimétrico
$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left[\left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 c}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] - \frac{hc}{1+c}$	Tridimensional y coordenadas cilíndricas

OTROS POSIBLES PROBLEMAS

ECUACIÓN:	USOS:
$\frac{\partial c}{\partial t} = D_c \nabla^2 c + k_1 b - k_2 c(b_t - b) + f(c)$ $\frac{\partial b}{\partial t} = D_b \nabla^2 b - k_1 b + k_2 c(b_t - b)$	<i>Sistemas de Difusión-Reacción</i> <i>f(c): todas las reacciones en las que el calcio libre esté presente (flujos a través de membranas)</i> <i>Difusión de partículas con cinética de buffer-lento</i>
$(1 + \theta) \frac{\partial c}{\partial t} = (D_c + D_b \theta) \nabla^2 c - \frac{2D_b \theta}{k + c} \nabla c ^2 + f(c)$ $\theta = \frac{b_t k}{(k + c)^2}; k = \frac{k_1}{k_2}$	<i>Difusión de partículas con Cinética rápida de buffer en condiciones pseudo-estacionarias</i>
$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{D_c}{1 + \alpha} \nabla^2 c + f(c)$ $\alpha = \frac{b_t}{k}$	<i>Situación anterior y además:</i> $k \gg c$ $D_c \gg D_b$

ECUACIÓN:	USOS
$\left. \begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= \alpha \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + u^2 v - 4u + 1 \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= \alpha \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} - u^2 v + 3u \end{aligned} \right\} \text{Brusselator}$	<i>Reacción de Belousov-Zhabotinskii</i>
$\left. \begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + LRv + u(1 - u - Rv) \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + Mv - buv \end{aligned} \right\} \text{Brusselator}$ Si $u = 1 - v \wedge b = 1 - R; R \leq 1$	<i>El sistema se reduce a la ec. de Fisher</i> $\frac{\partial v}{\partial t} = \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} - (1 - R)v(1 - v)$

APÉNDICE II

CINÉTICA DE BUFFER RÁPIDO

Partiendo de las ecuaciones:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = [D_c \nabla^2 c + f(c)] + k_- b - k_+ c(b_t - b) \quad (1)$$

$$\frac{\partial b}{\partial t} = [D_b \nabla^2 b] - k_- b + k_+ c(b_t - b) \quad (2)$$

donde:

$f(c)$: Todas las reacciones químicas en la cual el calcio libre está presente.

D_c : Coeficiente de difusión del calcio libre.

D_b : Coeficiente de difusión de la proteína buffer ligada al calcio.

Considerando:

(1) un estado pseudo-estacionario para c , y

(2) k_+ y k_- muy grandes

entonces:

$$k_- b - k_+ c(b_t - b) = 0 \quad (3)$$

donde:

$$b = \frac{b_t c}{k + c} \quad (4)$$

y

$$k = \frac{k_-}{k_+} \quad (5)$$

entonces:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \frac{\partial b}{\partial t} = (1 + \Theta) \frac{\partial c}{\partial t} \quad (6)$$

$$\text{con: } \Theta = \frac{b_t k}{(k + c)^2} \quad (7)$$

Si (1) y (2) son sumados, el resultado es:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \frac{\partial b}{\partial t} = D_c \nabla^2 c + D_b \nabla^2 b + f(c) \quad (8)$$

Sustituyendo (4) y (6) en (8) y expandiendo el segundo miembro de la ecuación resultante nos queda:

$$(1 + \Theta) \frac{\partial c}{\partial t} = D_c \nabla^2 c + D_b \nabla^2 \left(\frac{b_t c}{k + c} \right) + f(c) \quad (9)$$

$$\nabla^2 \left[\frac{c}{k + c} \right] = \nabla \cdot \nabla \frac{c}{k + c} = \nabla \cdot \left(\frac{(k + c) \nabla c - c \nabla (k + c)}{(k + c)^2} \right) = \nabla \cdot \left(\frac{(k + c) \nabla c - c \nabla c}{(k + c)^2} \right) = \nabla \cdot \left(\frac{k \nabla c}{(k + c)^2} \right) \quad (10)$$

$$k \nabla \cdot \left[\frac{1}{(k + c)^2} \nabla c \right] = k \left[\frac{(k + c)^2 \cdot \nabla^2 c - \nabla c \cdot \nabla (k + c)^2}{(k + c)^4} \right] = k \left[\frac{(k + c)^2 \nabla^2 c - 2(k + c) \nabla c \cdot \nabla c}{(k + c)^4} \right] \quad (11)$$

$$= k \left[\frac{\nabla^2 c}{(k + c)^2} - \frac{2|\nabla c|^2}{(k + c)^3} \right] \quad (12)$$

donde ∇ y ∇^2 son los operadores gradiente y laplaciano, respectivamente.

Sustituyendo (12) en (9) y reagrupando términos obtenemos:

$$(1 + \Theta) \frac{\partial c}{\partial t} = (D_c + D_b \Theta) \nabla^2 c - \frac{2D_b \Theta}{k + c} |\nabla c|^2 + f(c) \quad (13)$$

Así que:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \left(\frac{1}{1 + \Theta} \right) D_c \nabla^2 c + \left(\frac{\Theta}{1 + \Theta} \right) D_b \nabla^2 c - \frac{2\Theta D_b}{(1 + \Theta)(k + c)} |\nabla c|^2 + f(c) \quad (14)$$

esta es una ecuación en derivadas parciales no-lineal. Las siguientes ecuaciones también se cumplen:

$$\frac{\partial b}{\partial t} = D_b \nabla^2 b \quad (15)$$

$$[k_- b - k_+ c(b_t - b)] = 0 \quad (16)$$

$$\frac{\partial c_{SR}}{\partial t} = \text{Flujo neto a través de la membrana del retículo sarcoplásmico} \quad (17)$$

$$\frac{\partial c_m}{\partial t} = \text{Flujo neto mitocondrial} \quad (18)$$

Caso simple: *cinética buffer rápido y lineal*

Cuando el buffer está presente pero no difunde significativamente ($D_c \gg D_b$) y $k \gg c$, entonces la ecuación 14 queda:

$$(1 + \Theta) \frac{\partial c}{\partial t} = D_c \nabla^2 c + f(c) \quad (19)$$

$$\text{Con } b = \frac{b_t c}{k + c} = \frac{b_t}{k} c = \alpha c \quad (20)$$

y:

$$\Theta = \frac{b_t k}{(k + c)^2} = \frac{b_t k}{k^2} = \frac{b_t}{k} = \alpha \quad (21)$$

Así la ecuación 14 se transforma en:

$$(1 + \alpha) \frac{\partial c}{\partial t} = D_c \nabla^2 c + f(c) \quad (22)$$

que es la típica ecuación de difusión-reacción.

APENDICE III

Términos $f(c)$:

Flujos a través de la membrana del RS.	J _{RyR} : Flujo de salida de calcio a través del canal de rianodina	$J_{RyR} = K_3 \sigma G (C_{SR}-C)$	σ : índice de activación del receptor (0 o 1) La function $G= G(t, x,y,z)$ toma en cuenta el tiempo (t) y la localización espacial (x,y,z) del receptor de rianodina, o más convenientemente en coordenadas cilíndricas: $G= G(t, \rho, \varphi, z)$ y: K_3: depende del flujo de DHPR
	J _{RyR} : Flujo de salida de calcio a través del canal de rianodina:	$J_{RyR} = k_f X_2 (C_s-C)$	Este modelo de CICR en células cardíacas supone que el calcio libre puede activar o desactivar a los receptores de rianodina. Se supone que los RyR pueden existir en cuatro estados diferentes. También se supone que la velocidad con que se liga el Ca^{+2} al sitio activante depende de si el calcio está o no ligado al sitio desactivante.
	J _{res} : flujo residual de calcio hacia el citosol desde el RS	$J_{leak} = g_1 (C_s-C)$	Se supone que el mecanismo sigue la primera ley de Fick
	J _{Ca, ATPasa} (bomba SERCA):fluj o de reentrada al RS	$J_{Ca, ATPasa} = \frac{p_1 c^n}{p_2^n + c^n}$	Se supone que: p_1=depende la activación del fosfolambano(transición orden-desorden estimulada por fosfokinasas da los siguientes valores: $n=2$ $p_1=1038 \mu M^{-1}s^{-1}$ $p_2=0,12 \mu M^{-1}s^{-1}$
	J _{Ca, ATPasa} (bomba SERCA):fluj o de reentrada al RS	$J_{Ca, ATPasa} = \frac{V_{SR} c^n}{K_{SR}^n + c^n}$	V_{SR} es la capacidad máxima de la bomba, K_{SR} es la capacidad de calcio a la cual el transporte es la mitad del máximo y n es el coeficiente de Hill $K_{SR} = 184 \text{ nM}$ $n= 3.98$ $V_{SR} = 208 \mu M s^{-1}$

Flujos a través del sarcolema	$J_{E,Na/Ca}$: flujo intercambiador de Ca^{2+} por Na^+	$J_{E,Na/Ca} = \frac{V_{max} [Ca^{2+}]_f}{K_{max} + [Ca^{2+}]_f}$	El transporte de Ca^{2+} hacia el espacio extracelular desde el espacio “fuzzy” (subespacio confinado) por el intercambiador Na^+-Ca^{2+} fue modelado siguiendo la cinética química de Michaelis-Menten el $[Ca^{2+}]_f$, V_{max} and K_m son la concentración de calcio en el espacio “fuzzy”, tasa máxima de remoción de calcio y constante de disociación, respectivamente.
	$J_{p,D}$:Flujo de calcio de difusión pasiva.		Muchos miocitos cardiacos de mamíferos contienen canales tipo T. Estos canales se activan e inactivan a potenciales de membrana más negativos que los canales tipo L (canales de DHPD)
	J_{DHPR}		J_{DHPR} : flujo de calcio a través de canales tipo L (canales de dihidropiridina). Estos canales son voltaje-dependientes y también sensores de voltaje. De esta última forma operan fundamentalmente en miocitos esqueléticos.
	J_{BS} : flujo de la bomba de calcio del sarcolema, el calcio es bombeado desde el citosol hacia el fluido extracelular. Es dependiente de ATP	$J_{BS} = \frac{q_1 c^2}{q_2^2 + c^2}$	

Flujos a través de la membrana mitocondrial	J _{m,out} : flujo de salida de calcio desde la mitocondria: intercambia dor Na ⁺ / Ca ²⁺	$J_{m,sal} = V_2^{\max} (Na^2 / H)$ $H = (Na^2 + K_{Na}^2)^{-1} h$ $h = \left(\frac{m}{m + K_m} \right)$	Donde: $m = [Ca^{2+}]_{mitocondria}$ $[Na^+]$ = concentración de ión sodio en el citosol = 10.0 mM $V_2^{\max}$ = velocidad de liberación máxima = 3 μM s⁻¹ $V_2^{\max}$ dependencia con $m = 1\mu M$ K_m = valor a la mitad del máximo de $V_2^{\max}$ K_{Na} = valor a la mitad del máximo de $V_2^{\max}$ K_d = valor de la mitad del máximo de captura de calcio mitocondrial = 1,5 μM $V_1^{\max}$ = varía de acuerdo al cambio de la captura de calcio mitocondrial.
	J _{m,in} : flujo de entrada de calcio hacia la mitocondria	$J_{m,ent} = V_1^{\max} \left(\frac{c^2}{K_d^2 + c^2} \right)$	$c = [Ca^{2+}]_{citosol}$ K_d = mitad del máximo de la captura de calcio mitocondrial = 1,5 μM $V_1^{\max}$ = varia de acuerdo al cambio de la captura de calcio mitocondrial

APENDICE IV

ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LA ECUACIÓN DE DIFUSIÓN

Para comprender mejor las técnicas numéricas es necesario definir los siguientes términos:

- 1) Consistencia: Una aproximación por diferencia finita de una PDE es consistente si la ecuación en diferencia finita se aproxima a la PDE cuando el tamaño de la rejilla se acerca a cero.
- 2) Estabilidad: Un esquema numérico se dice que es estable si cualquier error introducido en la ecuación en diferencia finita no crece con la solución de la ecuación en diferencia finita.
- 3) Convergencia: Un esquema de diferencia finita es convergente si la solución de la ecuación en diferencia finita se acerca a aquella de la PDE cuando el tamaño de la rejilla tiende a cero.
- 4) Teorema de equivalencia de Lax: Para una PDE que se aproxima de forma bien posicionada y es un problema de valor inicial lineal, entonces la condición necesaria y suficiente para la convergencia es que la PDE sea estable y consistente.
- 5) Exactitud: viene dada por el orden de la truncación de la aproximación por diferencia finita.

CONSISTENCIA+ESTABILIDAD = CONVERGENCIA

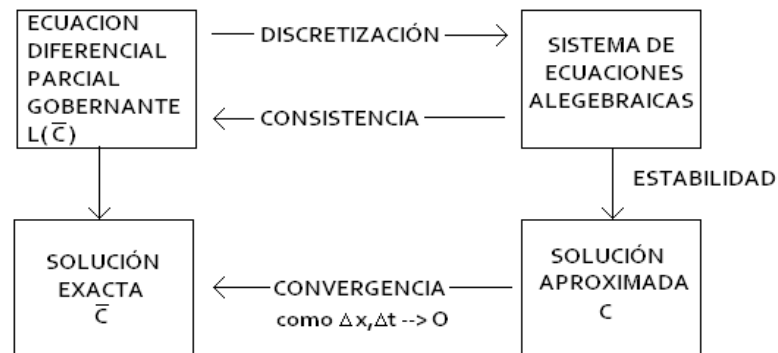


FIGURA 1: Relación conceptual entre consistencia, estabilidad y convergencia. **Fuente:** Computational techniques for fluid dynamics. C. A. Fletcher. Springer-Veslag. Alemania. 2001.

La aplicación del análisis de estabilidad de von Neuman (Fletcher, 2001) la ecuación de difusión simple (2da Ley de Fick) indica que el factor de amplificación G (ganancia) está dado por:

$$G = 1 - 4s \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right),$$

$$\text{Con } s = D \frac{\Delta t}{\Delta x^2} \text{ y } \theta = m\pi\Delta x$$

Para cualquier valor de θ debe cumplirse que:

$$|G| \leq 1$$

Para que las soluciones de la ecuación:

$$c_j^{n+1} = sc_{j-1}^n + (1-2s)c_j^n + sc_{j+1}^n$$

sean estables. Así que debe cumplirse que:

$$1 \leq 1 - 4s \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \leq 1$$

Para todo θ , lo cual implica que $s \leq \frac{1}{2}$

Si $D = \frac{D_o}{1+\alpha}$, donde α es un cierto factor de atenuación, tendremos para la condición de estabilidad que:

$$s = \left[\left(\frac{D_o}{1+\alpha} \right) \frac{\Delta t}{(\Delta x)^2} \right] \leq \frac{1}{2}$$

$$\therefore \frac{D_o}{1+\alpha} \leq \frac{1}{2} \frac{(\Delta x)^2}{\Delta t}$$

$$\therefore \frac{1+\alpha}{D_o} \geq 2 \frac{\Delta t}{(\Delta x)^2}$$

$$\therefore 1+\alpha \geq 2D_o \frac{\Delta t}{(\Delta x)^2}$$

$$\therefore \alpha \geq 2D_o \frac{\Delta t}{(\Delta x)^2} - 1$$

REFERENCIAS

1. McKee T. y McKee J. Bioquímica. McGraw-Hill. España. (2003)
2. Vander A, Sherman J., Luciano D. Human Physiology. The mechanisms of Body Function. 8th edition. Mc-Graw-Hill. USA. (2001)
3. Fawcett, D.W. Bloom, . Tratado de histología. 11^{ava} edición. (1987)
4. Tresguerres, J.A.F. Fisiología Humana. Tercera edición. McGraw-Hill Interamericana. (2005)
5. Cingolani, H. y Houssay, A. Fisiología Humana de Bernardo Houssay. Argentina. Editorial El Ateneo. 2000.
6. Protasi, F., Franzini-Armstrong, C. y Allen, P.D. Role of Ryanodine Receptor in the Assembly of Calcium Release Units in Skeletal Muscle. The Journal of Cell Biology. 140 4 (1998) 831-842.
7. Niggli, E. Localized intracellular calcium signaling in muscle: Calcium Sparks and Calcium Quarks. Annu. Rev. Physiol. 61 (1999) 311-35.
9. Fill M. y Copello J. Physiol Rev. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. 82 (2002) 893-922.
10. Rall, J.A. Role of Parvalbumin in Skeletal Muscle Relaxation. News Physiol. Sci. 11 (1996) 249-255.
11. Berchtold, M., Brinkmeier, H. y Münter, M. Calcium Ion Skeletal Muscle: Its Crucial Role of Muscle Function, Plasticity, and Disease. Physiological Reviews. 80 3 (2000).

13. Jones, D. y Sleeman, B. Differential Equations and Mathematical Biology. Chapman & Hall/CRC, USA. 2003.
14. Crank, J. The mathematical of diffusion. Oxford University Press, London. 1957
15. Levine, I.N. Físico-Química. Tercera edición en español. McGraw-Hill. New York. 1990.
16. Keener, J. y Sneyd, J. Mathematical Biology, Springer-Verlag. USA. 1998.
17. King, J. y McCabe, Ph. On the Fisher-KPP equation with fast nonlinear diffusion. Proc. R. Soc. Lond. A 459 (2003) 2529-2546.
18. Bindu, P. y Lakshmanan, M. Symmetries and integrability properties of generalizad Fisher type nonlinear diffusion equation. Proc. of Math of NAS Ukraine. 1-13. 2002.
19. Okada J., Sugiura S., Nishimura S. y Hisada T. 3D simulation of calcium waves and contraction in cardiomyocytes using the finite element method. Am J Physiol Cell Physiol. (2004)
20. Smith, G. D., Keizer, J.E., Stern, M. D., Lederer, W. J. and Cheng H. A Simple Numerical Model of Calcium Spark Formation and Detection in Cardiac Myocytes. Biophysical Journal. Volume 75 (1998) 15–32.
21. D. Uttenweiler, C. Weber, and R. H. A. Fink. Mathematical Modeling and Fluorescence Imaging to Study the Ca^{+2} Turnover in Skinned Muscle Fibers. Biophysical Journal. 74 (1998) 1640–1653

22. Keizer J., Smith G.D., Ponce-Dawson S. y Pearson J. E. Saltatory Propagation of Ca^{+2} waves by Ca^{+2} sparks. *Biophysical Journal*. 75 (1998) 595-600.
23. Novo D., DiFranco M. y Vergara J.L. Comparison between the predictions of diffusion-reaction model and localized Ca^{+2} transients in amphibian skeletal muscle fibers. *Biophysical Journal*. 85 (2003) 1080-1097.
25. Murray J. D. *Mathematical Biology*. Springer. New York. (2002)
26. Higgins and Cols, 2007. A Buffering SERCA puma in models of calcium dynamics, manuscrito no editado, aceptado para publicación in *Biophysical Journal*.
27. Parulek J, Zahradník I, Šrámek M. A Modelling Tool for Construction of 3D Structure of Muscle Cells. In: Jan J, Kozumplik and Provaznik I. *Analysis of Biomedical Signals and Image proceedings*, Brno University of Technology, ISSN 1211-412X, 2004: 267-269

RECOMENDACIONES

1. Extender el modelaje a más de tres (3) receptores de rianodina y más de un (1) buffer.
2. Utilizar un método de diferencia finita explícito o implícito que sea estable para todo $d=(D\Delta t/\Delta x^2)$, lo cual permitirá ampliar el rango de los parámetros en estudio y por ende aumentar el rango de estudio del comportamiento de la solución numérica de la ecuación de difusión-reacción.
3. Incorporar un término que represente la fricción (frenado) que ejerce el citosol sobre el movimiento del calcio (Ecuación de Difusión-Reacción-Smoluchoski; también denominada ecuación de Difusión-Reacción-Convección (Advección).
4. En casi todos los modelados realizados hasta ahora, el flujo de la bomba SERCA (J_{SERCA}) se ha representado como un continuo, es importante que en los próximos trabajos se localice temporal y espacialmente esta bomba.
5. Incluir en modelajes futuros el flujo del ión calcio mitocondrial.

GLOSARIO:

CITOPLASMA: es la región de la célula externa al núcleo.

CITOSOL: es la región fluídica del citoplasma. Excluye los organelos celulares.

EDP: Ecuación en Derivadas Parciales.

FLUIDO INTRACELULAR: comprende todo el fluido dentro de una célula, es decir, el citosol más el fluido dentro de los organelos.

QUARK: Liberación de ión calcio desde un único receptor de RyR.

SARCOPLASMA: citoplasma de una célula muscular

SERCA: Sarco/Endoplasmatic Reticulum Ca^{2+} -ATPasa

SERCA1: Presente en músculo esquelético predominantemente.

SERCA2: Presente en músculo cardíaco predominantemente.

SPARK: Liberación de ión calcio desde un cluster de canales de RyR.

TRANSIENTE DE CALCIO: Liberación de ión calcio desde un conjunto de ULC

TIEMPO DE RETARDO: Tiempo que transcurre desde el inicio de la simulación ($t=0\text{ms}$) hasta que la concentración del ión calcio cambie respecto al nivel basal en un punto x .

TIEMPO MÁXIMO: Tiempo que transcurre desde el inicio de la simulación ($t=0\text{ms}$) hasta que la concentración de Ca^{+2} alcanza un valor máximo para un punto x .

CRÉDITOS DE FIGURAS

FIGURA 1: Representación de una célula y sus elementos.

FUENTE: Vander A, Sherman J., Luciano D. Human Physiology. The mechanisms of Body Function. 2001. 8th edition. Mc-Graw-Hill. USA.

FIGURA 2: Representación de la membrana celular.

FUENTE: Vander A, Sherman J., Luciano D. Human Physiology. The mechanisms of Body Function. 2001. 8th edition. Mc-Graw-Hill. USA.

FIGURA 3: a) representación diagramática de la estructura interna de una célula de músculo esquelético, b) representación anatómica de una célula de músculo esquelético.

FUENTE: Vander A, Sherman J., Luciano D. Human Physiology. The mechanisms of Body Function. 2001. 8th edition. Mc-Graw-Hill. USA.

FIGURA 4: Esquema de la organización del músculo esquelético desde el nivel macroscópico al molecular.

FUENTE: Bloom-Fawcett. Tratado de histología. D.W. Fawcett. 11^{ava} edición. 1987.

FIGURA 5: Micrografía electrónica de una sección de fibra muscular.

FUENTE: Ganong, W. F. (2002) Fisiología médica. 18ava edición en español. Editorial El Manual moderno.

FIGURA 6: Representación tridimensional de una sección de célula de músculo esquelético. En ambas se observa el RS.

FUENTE:

FIGURA 7: Dibujo esquemático de la distribución del retículo sarcoplásmico en torno a las miofibrillas del músculo esquelético de mamífero. Los sarcotúbulos longitudinales se reúnen en unas cisternas terminales transversales. El túbulo T transverso y delgado, penetra desde el sarcolema y está flanqueado por dos cisternas terminales. Se constituyen así las “triadas” del retículo. En músculo esquelético de mamífero hay dos triadas por sarcómero y están alineadas con las uniones de las bandas A con las bandas I.

FUENTE: Estudio de la fatiga muscular mediante estimulación de baja frecuencia. José H. Malén Arroyo. Universidad de Barcelona. España. Tesis Doctoral 2005.

FIGURA 8: Representación tridimensional de la dinámica de calcio en el citosol.

FUENTE: Fill M. y Copello J. *Physiol Rev.* (2002). Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. 82: 893-922

FIGURA 9: Representación tridimensional de la dinámica de calcio en el citosol.

FUENTE: David E. Clapham. *Calcium signaling.* Cell. 80:259-268.

FIGURA 10: a) dibujo esquemático del canal de DHPR, b) esquema donde se observa el canal de DHPR enfrente al canal de RyR.

FUENTE: a) Vander A, Sherman J., Luciano D. *Human Physiology. The mechanisms of Body Function.* 2001. 8th edition. Mc-Graw-Hill. USA. b) Ganong, W. F. (2002) *Fisiología médica.* 18ava edición en español. Editorial El Manual moderno.

FIGURA 11: a) Molécula de rianodina, b) Representación superficial de la reconstrucción tridimensional de RyR3, en (a) se muestra el buffer abierto en color verde y (b) condición de buffer cerrado mostrado en azul. La reconstrucción tridimensional esta mostrada en tres ángulos diferentes del receptor, visto desde el citoplasma, la superficie que interactúa con los túbulos transversos (imagen de la izquierda), la cara que interactúa con la membrana del RS (imagen central) y una vista

lateral que muestra la interacción con el ensamblaje transmembránico (transmembrane assembly - TA) (imagen de la derecha). escala 100 Å.

FUENTE: Sharma, M.R., Jeyakumar, L.H., Fleischer, S., and Wagenknecht, T. (2000) J. Biol. Chem. 275, 9485-9491. Three-dimensional architecture of ryanodine receptor isoform 3 in two conformational states as visualized by cry-electron microscopy.

FIGURA 12: A) Arreglo de la troponina en estado relajado, la cabeza de la miosina no se puede unir a la troponina. B) Interacción Ca-Troponina C habilita interacción miosina-troponina para la contracción muscular.

FUENTE: Ganong, W. F. (2002) Fisiología médica. 18ava edición en español. Editorial El Manual moderno.

FIGURA 13: Efecto de la concentración celular del ión calcio sobre la generación de tensión (fuerza) en células musculares con membrana (derecha) y sin membrana (izquierda). $pCa = \log(1/[Ca^{+2}])$.

FUENTE: Cingolani, H. y Houssay, A. Fisiología Humana de Houssay. Argentina. Editorial El Ateneo. 2000.

FIGURA 14: Representación bidimensional de la dinámica de calcio en el citosol del músculo esquelético.

FUENTE: Berchtold, M., Brinkmeier, H. y Münterner, M. Calcium Ion Skeletal Muscle: Its Crucial Role of Muscle Function, Plasticity, and Disease. Physiological Reviews. Vol. 80, No 3, 2000.

FIGURA 15: Gráfico de la fluorescencia superficial usando fluo-3 medido con un escaner confocal lineal en una célula muscular estriada.

FUENTE: Ernst Niggli. 1999. Localized intracellular calcium signaling in muscle: Calcium Sparks and Calcium Quarks. Annu. Rev. Physiol. 61:311-35.

FIGURA 16: El calcio proveniente del canal de DHPR dispara la liberación de calcio desde un receptor de RyR acoplado a este, el canal de RyR acoplado tiene un umbral de apertura más alto que sus vecinos no acoplados, generando un alto flujo de calcio que difunde, activando la liberación de calcio (en menor proporción) desde otros canales de RyR vecinos (quarks).

FUENTE: Ernst Niggli. 1999. Localized intracellular calcium signaling in muscle: Calcium Sparks and Calcium Quarks. Annu. Rev. Physiol. 61:311-35.

FIGURA 17: Control de Ca^{+2} en la contracción-relajación del músculo esquelético. Este esquema describe como la parvalbúmina podría acelerar la relajación en un músculo esquelético de contracción rápida. Con la estimulación muscular el potencial de acción viaja hasta los TT y activa sensores de voltaje los cuales causan la apertura de canales de liberación de Ca^{+2} en el RS. El Ca^{+2} liberado desde el RS se une preferencialmente con la troponina C para remover la inhibición de la tropomiosina y esto permite la interacción entre la miosina y la actina produciendo el desarrollo de fuerza muscular. Durante la contracción algunos Ca^{+2} son intercambiados por Mg^{+2} en la parvalbúmina dependiendo de la duración de la contracción. Durante la relajación Ca^{+2} es reingresado al RS via SERCA e intercambiado por Mg^{+2} en la parvalbúmina. Ambos mecanismos operan en paralelo para producir la relajación. Después de la relajación el Ca^{+2} unido a la parvalbúmina es reingresado al RS via SERCA por intercambio con Mg^{+2} .

FUENTE: Rall, J.A. Role of Parvalbúmina in Skeletal Muscle Relaxation. News Physiol. Sci. Vol 11. December 1996. 249-255.

CRÉDITOS DE TABLAS

TABLA 1: Relación porcentual de volumen de diferentes estructuras celulares.
FUENTE: Donald Bers. Excitation-Contraction coupling and cardiac contractile force. 2001. Holanda. Kluwer.

TABLA 2: Estructuras moleculares principales involucradas en la liberación y captura de ión calcio.

FUENTE: **1.** Diversificación of function and Pharmacology in Intracellular Signalling, A. Arredouani. Department of Pharmacology, University of Oxford. 2004. **2.** Regulation of Ca^{+2} release from internal stores in cardiac and skeletal muscles. A. Wrzosek. 2000. Acta Biochimica Polonica.

TABLA 3: Eventos relacionados con la liberación de calcio a través de los receptores de rianodina.

FUENTE: **1.** Monrad M, et al. Triadin: The New Player on Excitation-Contraction Coupling Block. Circ. Res. 2005;96;607-609.

2. Franzini- Armstrong C, Protasi F, Ramesh V. Shape, size, and Distribution of Ca^{+2} release units and couplons in Skeletal and Cardiac muscles. Biophysical Journal. 1999; 77: 1528- 1539. **3.** Tanaka H, Oyamada M, Tsujii E, Nakajo T, Takamatsu T. Excitation-Dependent Intracellular Ca^{2+} waves at the Border Zone of the Cryo-injured Rat Heart Revealed by Real-time Confocal Microscopy. J Mol Cell Cardiol. 2002; 34: 1501-1512.

CREDITOS DE CUADROS

CUADRO I: Secuencia de eventos en la contracción y en la relajación del músculo esquelético. **FUENTE:** Ganong, W. F. (2002) Fisiología médica. 18ava edición en español. Editorial El Manual moderno.

COMENTARIOS PARA CORREGIR

-1.2 Músculo esquelético de mamífero.

Buscar dimensiones típicas de célula esquelética de mamífero

-FIGURA 9: Falta año del artículo de Clapham

- Experimento con tres canales al mismo tiempo

- Al final de 1.14

Completar con 2 trabajos que usen métodos explícitos

- Pag 51

Revisar a el apellido de Neuman

- Evaluar integral $N = A \int_0^2 \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-L/2)^2}{2\sigma^2}} dx$

- GRAFICO DE LA TABLA 21
VALORES $X=1,5$ y $1,8$
- VENTANAS PRINCIPALES DEL PROGRAMA 3DStudio
- COMO SE ESCRIBE 3ds Max
- COMENTARIO PARA EL MODELO DONDE SE DISCUTA OTROS MODELOS 3D REALIZADOS.

III.3 TABLAS DE RESULTADOS COMPARATIVOS

Número de receptores	DS $t(c_{\max}/2)$	DR $t(c_{\max}/2)$
1		
2		
3		

