



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS Y MATEMATICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA Y BIOTECNOLOGIA

# **MODELO ESTOCASTICO DE LA DINAMICA DEL CALCIO EN UN MICRODOMINIO DEL CILIO OLFATORIO**

MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE  
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGIA

PATRICIO IGNACIO CERDA REYES

PROFESOR GUIA:  
JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

PROFESORES CO-GUIA:  
CARLOS CONCA ROSENDE  
MAGDALENA SANHUEZA TOHA

SANTIAGO DE CHILE  
JUNIO DE 2010

## Resumen

El presente trabajo consiste en el diseño de un modelo teórico que explique el comportamiento de las señales de calcio en un microdominio (agrupación de canales iónicos y transportadores involucrados en la dinámica del calcio dentro de un cilio olfatorio), observadas experimentalmente.

Los cilios olfatorios son de gran importancia en la biología ya que funcionan como estructuras receptoras de los odorantes en las neuronas olfatorias. El calcio es uno de los principales transductores de la señal eléctrica generada, por lo que entender su dinámica a cabalidad representa un gran aporte al tema en cuestión.

Teniendo en cuenta que el factor más importante en el análisis de muy pocos canales es que la apertura de éstos es probabilística, y que las señales de calcio son muy puntuales en el cilio olfatorio con respecto al tiempo y al espacio, se realizó un modelo matemático estocástico resuelto numéricamente (utilizando el software MATLAB) en Ecuaciones Diferenciales Ordinarias .

Se observó claramente que el principal modulador de las señales de calcio en el microdominio es el canal activado por nucleótidos cíclicos CNG, existiendo una dependencia directa entre la corriente a través del canal y la concentración intracelular de calcio.

Modificando algunos parámetros de manera apropiada dentro de rangos con sentido desde el punto de vista biológico, fue posible llegar a valores cuantitativos que concuerdan con lo observado experimentalmente. De esta forma, se obtienen resultados numéricos de gran similitud con las mediciones experimentales, siendo la difusión en el cilio y la cinética del canal CNG los parámetros claves en la modulación de las señales de calcio.

Finalmente, el modelo cumple con el objetivo de dar un respaldo teórico a la observación experimental de la existencia de microdominios en los cilios olfatorios de las neuronas del olfato.

## **Agradecimientos**

Carlos Conca y Magdalena Sanhueza por su gran ayuda en la corrección del informe, además de su aporte en las discusiones.

Juan Asenjo, director del Instituto Milenio de Dinámica Celular y Biotecnología (ICDB), por la beca de memoria otorgada y su aporte en las correcciones del informe.

Juan Bacigalupo y Ricardo Delgado, del Laboratorio de Fisiología Sensorial de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por todos los conocimientos proporcionados sobre el problema biológico, además de sus datos experimentales y su ayuda en las discusiones.

Rodrigo Lecaros, estudiante de Doctorado en Modelamiento Matemático de la FCFM de la Universidad de Chile, por su aporte en las investigaciones iniciales.

## Indice de contenidos

Indice de figuras.....	3
Definición de símbolos.....	4
Capítulo I Introducción .....	5
Capítulo II Antecedentes.....	9
2.1 Neuronas Receptoras del Olfato.....	9
2.2 Cilio Olfatorio y Microdominio .....	9
2.2.1 Calmodulina (CaM) .....	13
2.2.2 Canal CNG .....	14
2.2.3 Canal de Cl <sup>-</sup> dependiente de Ca <sup>2+</sup> ( Cl(Ca) ) .....	16
2.2.4 Bomba de Ca <sup>2+</sup> -ATPasa (PMCA) .....	17
2.2.5 Intercambiador Na-Ca (NCX) .....	17
2.2.6 Difusión en el Microdominio .....	17
2.2.7 Fluoróforo (Fluo 4).....	18
2.3 Mediciones experimentales de las fluctuaciones de Ca <sup>2+</sup> en el cilio.....	19
Capítulo III Modelo Teórico .....	22
3.1 Cilio Olfatorio y Microdominio .....	22
3.3 Modelos Cinéticos de los Canales y Probabilidad de Ocurrencia .....	23
3.3.1 Canal CNG .....	24
3.3.2 Canal de Cl <sup>-</sup> dependiente de Ca <sup>2+</sup> (Cl(Ca)).....	26
3.4 Bomba de ATP (PMCA) .....	27
3.5 Intercambiador Na-Ca (NCX) .....	28
3.6 Difusión en el Cilio .....	29
3.7 Voltaje.....	30
3.8 Fluoróforo (Fluo 4).....	30
3.9 Calcio (Ca <sup>2+</sup> ).....	30
Capítulo IV Modelo Numérico .....	31
Capítulo V Resultados .....	35
5.3 Microdominio .....	38
Capítulo VI Discusiones.....	42
6.1 Modelo Teórico y Simulación.....	42
6.1.1 Canal Cl(Ca).....	42

6.1.2 Canal CNG .....	43
6.1.3 Difusión .....	43
6.2 Relación del modelo con los datos experimentales.....	44
6.3 Posibles aplicaciones .....	44
6.4 Mejoras y otras consideraciones .....	45
Capítulo VII Conclusión .....	46
Referencias .....	47
Anexos .....	49
1. Flujo máximo promedio de la bomba PMCA .....	49
2. Cinética del Fluoróforo Fluo4.....	49
3. Ajuste parámetros Cl(Ca) .....	50
4. Volumen del microdominio .....	51
5. Programas utilizados.....	51
5.1. Canal Cl(Ca) .....	51
5.2. Icl v/s Ca .....	53
5.3. Canal CNG.....	55
5.4. Icng v/s Ca .....	58
5.5. Modelo Microdominio .....	60

## Indice de figuras

<b>Figura 1.</b> Ubicación de las neuronas receptoras del olfato en humanos.....	5
<b>Figura 2.</b> Transducción de la señal en el cilio.....	6
<b>Figura 3.</b> Microdominio del cilio olfatorio. ....	7
<b>Figura 4.</b> Neuronas receptoras del olfato. ....	9
<b>Figura 5.</b> Fórmula química y estructura tridimensional del AMPc (3). ....	10
<b>Figura 6.</b> Síntesis y degradación del AMPc en el cilio (3). ....	11
<b>Figura 7.</b> Generación de la señal eléctrica en el cilio (3).....	12
<b>Figura 8.</b> Efecto de la bomba PMCA y el intercambiador NCX en la $[Ca^{2+}]$ (3).....	13
<b>Figura 9.</b> Estructura de la calmodulina y su acción como buffer de $Ca^{2+}$ (3) .....	14
<b>Figura 10.</b> Relación entre corriente y voltaje del canal CNG .....	15
<b>Figura 11.</b> Actividad del canal CNG a 0 y 10 $\mu$ M de AMPc (4).....	15
<b>Figura 12.</b> Corriente Normalizada del canal Cl v/s $[Ca^{2+}]$ a -40 y 40 mV (6).....	16
<b>Figura 13.</b> Canal CNG en función del tiempo (Control).....	20
<b>Figura 14.</b> Fluorescencia normalizada en función del tiempo (-PMCA).....	20
<b>Figura 15.</b> Fluorescencia normalizada en función del tiempo (-NCX).....	21
<b>Figura 16.</b> Esquema del modelo markoviano para el canal CNG .....	25
<b>Figura 17.</b> Corriente Normalizada del canal Cl(Ca) en función de la concentración de $Ca^{2+}$ . Ajuste de los datos mediante regresión no lineal a una función de Hill. ....	36
<b>Figura 18.</b> Corriente Icl de un canal individual Cl(Ca) en función del tiempo para un voltaje fijo de -40 mV durante 40 ms .....	37
<b>Figura 19.</b> Corriente normalizada del canal CNG en función del tiempo para 3 $\mu$ M de $Ca^{2+}$ .....	37
<b>Figura 20.</b> Flujo normalizado del canal CNG en función del tiempo para 0.1 $\mu$ M de $Ca^{2+}$ .....	38
<b>Figura 21.</b> Concentración de calcio en función del tiempo (modelo control) .....	38
<b>Figura 22.</b> Fluctuaciones de la concentración de calcio modelo control (ajustado). (A) Concentración de calcio iónico en función del tiempo. (B) Concentración de CaFluo en función del tiempo. ....	39
<b>Figura 23.</b> Concentración de CaFluo en función del tiempo (-NCX o -PMCA).....	40
<b>Figura 24.</b> Comparación entre la corriente en el canal CNG y la concentración de $Ca^{2+}$ en el microdominio (ambas normalizadas). ....	40
<b>Figura 25.</b> Voltaje en función del tiempo para el caso control (ajustado) con 5 canales Cl(Ca). ....	41

## Definición de símbolos

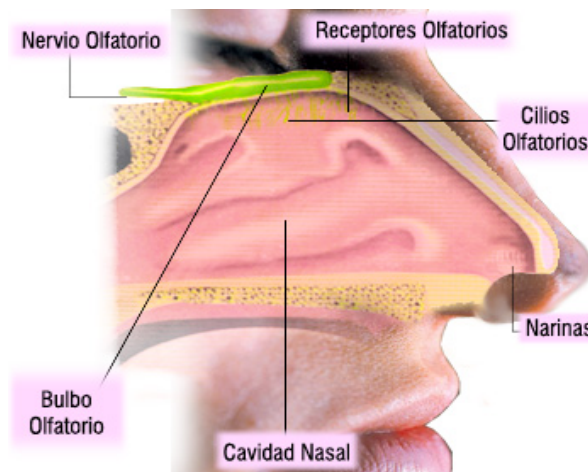
---

$Ca^{2+}$	<i>Ion calcio</i>
$Cl$	<i>Ion cloruro</i>
$Na^+$	<i>Ion sodio</i>
$K^+$	<i>Ion potasio</i>
<i>Fluo</i>	<i>Fluoróforo (FLuo 4)</i>
<i>CaFluo</i>	<i>Complejo Calcio-fluoróforo</i>
<i>CaM</i>	<i>Calmodulina</i>
<i>CaM4</i>	<i>Complejo Calcio-calmodulina</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosín trifosfato</i>
<i>AMP</i>	<i>Adenosín monofosfato</i>
<i>AMPC</i>	<i>Adenosín monofostato cíclico</i>
<i>CNG</i>	<i>Canal de calcio activado por AMPc</i>
<i>Cl(Ca)</i>	<i>Canal de cloruro activado por calcio</i>
<i>NCX</i>	<i>Intercambiador sodio-calcio</i>
<i>PMCA</i>	<i>Bomba de calcio-ATPasa</i>
$Pc_{cng}$	<i>Probabilidad de encontrar CNG en estado cerrado</i>
$Pa_{cng}$	<i>Probabilidad de encontrar CNG en estado abierto</i>
$Pi_{cng}$	<i>Probabilidad de encontrar CNG en estado inhibido</i>
$Pc_{cl}$	<i>Probabilidad de encontrar Cl(Ca) en estado cerrado</i>
$Pa_{cl}$	<i>Probabilidad de encontrar Cl(Ca) en estado abierto</i>
$I_{CNG}$	<i>Corriente a través del canal CNG [pA]</i>
$I_{Cl}$	<i>Corriente a través del canal Cl(Ca) [pA]</i>
$I_{NCX}$	<i>Corriente a través del intercambiador NCX [pA]</i>
$I_{Dif}$	<i>Corriente de difusión [pA]</i>
$D_{ca}$	<i>Constante de difusión de calcio [1/ms]</i>
$[CaM]_{tot}$	<i>Concentración total de CaM [<math>\mu</math>M]</i>
$[Fluo]_{tot}$	<i>Concentración total de fluoróforo [<math>\mu</math>M]</i>
$V$	<i>Voltaje [mV]</i>
$V_{CNG}$	<i>Potencial de reversión del canal CNG [mV]</i>
$V_{Cl}$	<i>Potencial de reversión del canal Cl(Ca) [mV]</i>
$V_{Dif}$	<i>Potencial de reversión de la difusión del sistema [mV]</i>
$cap$	<i>Capacitancia de la membrana [nF]</i>
$g_{CNG}$	<i>Conductancia del canal CNG [nS]</i>
$g_{Cl}$	<i>Conductancia del canal Cl(Ca) [nS]</i>
$g_{Dif}$	<i>Conductancia de corriente de difusión [nS]</i>
$frac_{Ca}$	<i>Porcentaje de ión <math>Ca^{2+}</math> en la corriente CNG</i>
$n_{canales_{cl}}$	<i>Número de canales de Cl(Ca)</i>
$F$	<i>Constante de Faraday [pC/<math>\mu</math>M]</i>
$vol$	<i>Volumen del dominio [L]</i>
$Jncx_{max}$	<i>Flujo máximo del intercambiador NCX [<math>\mu</math>M/ms]</i>
$R$	<i>Constante universal de los gases ideales [J/(mol K)]</i>

---

# Capítulo I      Introducción

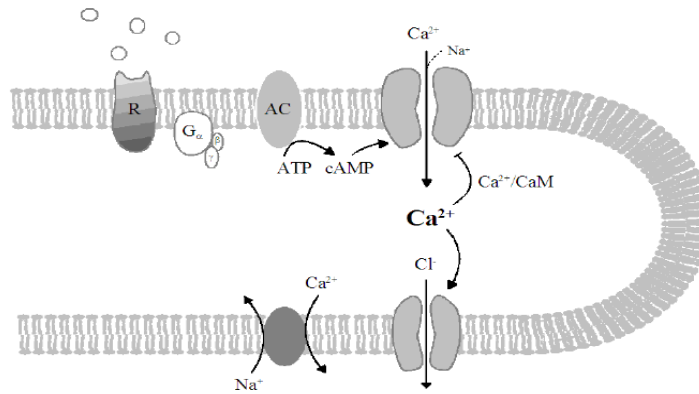
Las neuronas receptoras del olfato son, en los vertebrados, las células que captan las moléculas de odorantes disueltas volátiles del medio ambiente, para luego generar una señal eléctrica que pueda ser reconocida por el cerebro como un olor determinado. Cada neurona olfatoria consiste en un fino axón y un soma, del cual emerge una única dendrita que se dirige hacia la superficie mucosa de la cavidad nasal. Cada dendrita posee unas 10 a 20 pequeñas extensiones filiformes, llamadas cilios olfatorios. En humanos, estos cilios olfatorios se encuentran en la mucosa de la porción superior de la fosa nasal, sobre el nivel de la concha superior (pituitaria amarilla), tal como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1. Ubicación de las neuronas receptoras del olfato en humanos.**

Cada cilio consiste en una estructura cilíndrica hueca (sin organelos en su interior) y pequeña, de entre 5 a 100  $\mu\text{m}$  de largo y 0.2  $\mu\text{m}$  de radio aproximadamente. Es en los cilios olfatorios donde se lleva a cabo el proceso de transducción de la señal olfatoria, el cual consiste en captar las sustancias químicas u odorantes disueltos en la mucosa a través de receptores transmembrana presentes en el cilio, para luego transformar la señal en impulsos eléctricos mediante la activación de una regulada cascada de eventos que finalmente lleva al intercambio de iones entre el medio extra e intracelular, produciendo variaciones en el potencial de membrana de las neuronas. En el cilio, las proteínas receptoras reconocen los diversos odorantes y generan una cadena de reacciones en las cuales el calcio iónico ( $\text{Ca}^{2+}$ ) juega un rol fundamental, tal como se muestra en el esquema de la Figura 2, por lo que se hace indispensable identificar claramente su incidencia en este proceso.





**Figura 2. Transducción de la señal en el cilio.**

El mecanismo de transducción comienza con la unión del odorante al receptor transmembrana, activando la enzima adenilato ciclasa con la consecuente producción de AMPc dentro del cilio, el cual produce la activación de canales activados por nucleótidos cíclicos (canales CNG) por los cuales ingresa  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  a la célula. La apertura de estos canales representa el inicio de la generación de la señal eléctrica, induciendo un cambio en el potencial de membrana, el que se transmitirá a lo largo de la neurona olfatoria. El ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$ , a su vez, regula negativamente al canal CNG, evitando la entrada excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$ , y activa otro tipo de canales iónicos, lo que causa la amplificación de la corriente generada debido a la salida de iones cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) del sistema, con lo que se logra producir cambios importantes en el potencial de membrana, el cual en estado basal posee un valor cercano a los  $-70$  mV. Finalmente, el  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresó al cilio es retirado mediante sistemas de extrusión, tales como la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de ATP (PMCA), el intercambiador  $\text{Na}^+$ -  $\text{Ca}^{2+}$  (NCX), por difusión hacia el soma de la neurona, o bien por su unión a diversas proteínas que ligan  $\text{Ca}^{2+}$ . Todos estos mecanismos permiten el retorno de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a los niveles basales.

Experimentos recientes sugieren que los distintos canales y transportadores antes señalados se encuentran en pequeñas agrupaciones llamadas microdominios (1) (Figura 3), y no aleatoriamente a lo largo del cilio como se suponía previamente. Los microdominios de calcio se conocen en otros sistemas biológicos (excitación-contracción del músculo cardíaco, vesículas sinápticas, etc), todos con una dinámica de acción muy similar. La idea de la existencia de microdominios en el cilio olfatorio se basa en la observación de que las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  producidas por el ingreso de estos iones a través de un canal CNG son puntuales a lo largo del cilio. Esto sugiere que los transportadores y canales involucrados en la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  no pueden situarse muy alejados de un canal CNG, ya que no lograrían captar las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que éste genera.

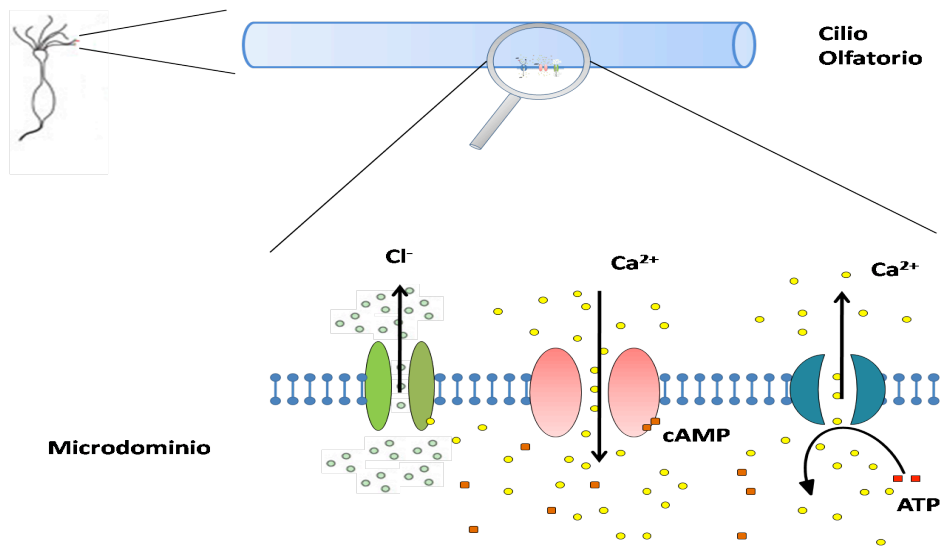


Figura 3. Microdominio del cilio olfatorio.

Es de especial importancia señalar que el transporte de iones es un proceso de naturaleza estocástica, ya que en cada instante de tiempo hay una probabilidad de que una vía de conducción determinada se encuentre abierta, cerrada, o en un estado intermedio, dependiendo esta probabilidad de variables tales como el voltaje y la concentración de las moléculas que intervienen en su funcionamiento. El origen estocástico de estos procesos de intercambio de moléculas se debe a que los distintos ligandos que activan o inhiben a cada uno de los transportadores son en realidad partículas que poseen movimiento browniano, por lo que se mueven de manera azarosa en el espacio, creando enlaces igualmente aleatorios con sus respectivos transportadores.

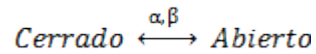
Los modelos propuestos para explicar la dinámica del calcio existentes en la literatura, generalmente se realizan para un gran número de canales, por lo que es posible aproximar la actividad de los canales o transportadores mediante una función determinista, que corresponde a la suma de la actividad de múltiples canales en función de la concentración del agonista, en el caso de canales activados por ligando. La función que describe el flujo  $J$  de la sustancia a transportar, es la llamada curva de Hill, que tiene la siguiente forma:

$$J = \frac{J_{max} * [A]^n}{[A]^n + K_{0.5}^n}$$

Donde  $J_{max}$  es el flujo máximo alcanzado,  $[A]$  es la concentración del activador,  $K_{0.5}$  es la concentración de ligando para la cual se registra un flujo  $J = J_{max}/2$  y  $n$  es la constante de afinidad del transportador al ligando.

Como el número de canales CNG en el microdominio es pequeño, la aproximación anterior no es válida, ya que ahora el efecto estocástico de los canales juega un rol fundamental. Es por esto que se necesita un modelo probabilístico. La aproximación para describir el comportamiento de un canal iónico que ha mostrado ser más precisa es modelar cada uno de sus estados mediante procesos de Markov.

Para describir el comportamiento de un canal particular se utiliza un modelo cinético que represente las transiciones entre cada uno de sus posibles estados mediante ecuaciones de reacción, las que pueden ser reversibles o irreversibles, según sea el caso (2). Por ejemplo, para un canal cualquiera que tenga sólo los estados “abierto” y “cerrado”, su mecanismo es el siguiente:



Donde  $\alpha$  y  $\beta$  son las constantes cinéticas de apertura y cierre, respectivamente. Este mecanismo varía dependiendo del canal que se desee describir, incorporando la presencia de estados adicionales. A partir del mecanismo que cada transportador presente, se escriben las ecuaciones de probabilidad en función del tiempo para cada uno de los estados.

Por medio del modelo de Markov es posible recuperar la actividad estocástica de los canales, obteniendo curvas oscilantes en el tiempo, y no suaves como en el caso de los flujos macromoleculares. Las oscilaciones representan el cierre y apertura probabilísticos del canal.

En el presente trabajo se intentará realizar un modelo de la dinámica del calcio en un microdominio del cilio olfatorio, en donde las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  son mucho más significativas en comparación a las zonas del cilio en las que hay ausencia de canales CNG. Para esto, se considerará la naturaleza estocástica de los canales y las distintas variables que juegan un rol importante en este proceso. Utilizando supuestos pertinentes, se espera verificar y explicar algunos comportamientos experimentales que se han logrado observar en investigaciones recientes sobre el cilio olfatorio.

## Capítulo II    Antecedentes

### 2.1    Neuronas Receptoras del Olfato

Los seres humanos son capaces de distinguir más de 10.000 tipos de olores, los que son detectados por las neuronas receptoras del olfato que se ubican en la parte superior de la nariz. Este tipo de neuronas posee en su extremo una gran cantidad de filamentos llamados cilios (Figura 4), los cuales generan una mayor área de contacto entre la mucosa, hacia la cual difunden los odorantes, y la membrana de éstos. El axón, transmite la señal eléctrica hacia centros de integración cuando las neuronas son activadas.

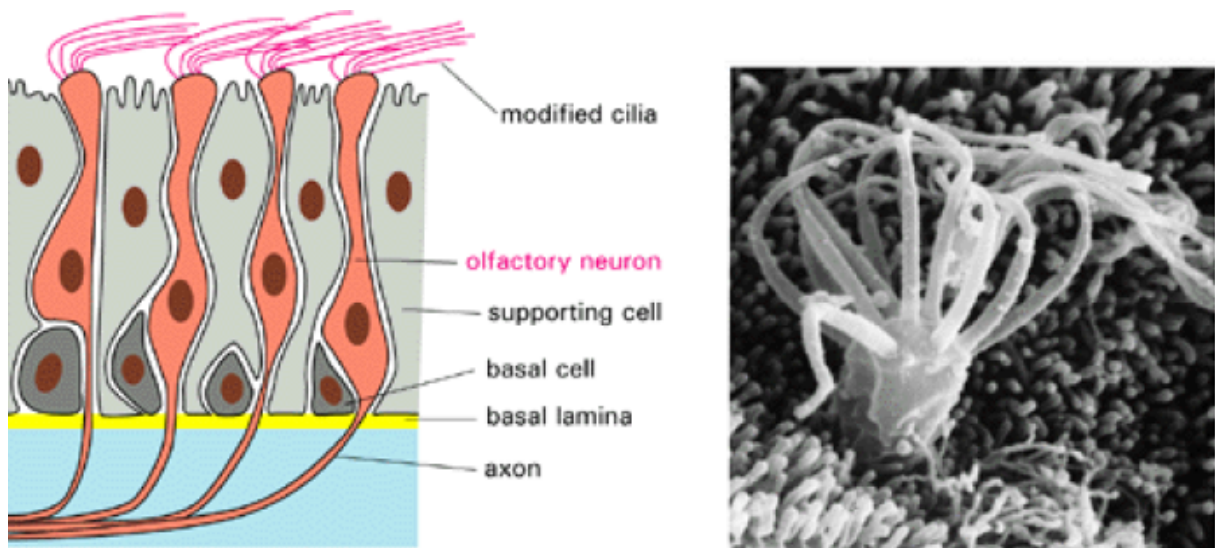


Figura 4. Neuronas receptoras del olfato.

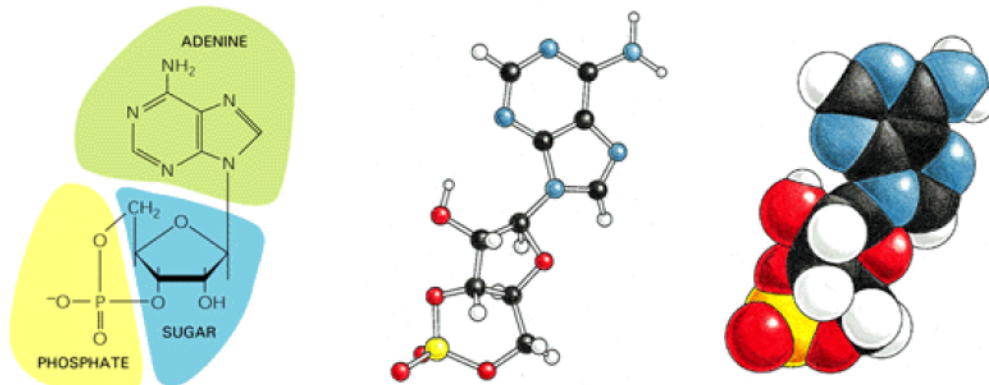
### 2.2    Cilio Olfatorio y Microdominio

El cilio olfatorio es la estructura en la cual se realiza la transducción de la señal química, en forma de moléculas odorantes provenientes del medio ambiente, a una señal eléctrica, la que es conducida por la neurona olfatoria hacia centros de integración, para ser posteriormente procesada en el cerebro, permitiendo la percepción olfativa.

Las neuronas receptoras del olfato poseen entre 10 y 20 cilios (dependiendo de la especie) en el extremo de su dendrita. En la membrana de éstos se encuentran los receptores que son capaces de ligar sustancias químicas. Los cilios olfatorios tienen la forma de pequeños cilindros de entre 5 a 100  $\mu\text{m}$  de largo y 0.2  $\mu\text{m}$  de radio aproximadamente.

En mamíferos se han descrito cientos de tipos de receptores del olfato, los cuales reconocen, cada uno, familias específicas de odorantes. Cada tipo de receptor transmembrana es codificado por un gen diferente. Aún no es claro si cada neurona receptora del olfato contiene sólo un tipo de receptor o no.

Al unirse el odorante a su receptor, se activa una proteína G específica, la cual básicamente es un trómero cuya función es activar la enzima adenilciclase, generando la producción de Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPC) al interior del cilio (Figura 5).



**Figura 5. Fórmula química y estructura tridimensional del AMPC (3).**

Así como la adenilciclase es la responsable de la producción de AMPC a partir de ATP, también se produce degradación de este compuesto por la enzima AMPC-fosfodiesterasa, que cataliza la formación de AMP mediante la hidrólisis de AMPC, tal como se aprecia en la Figura 6.

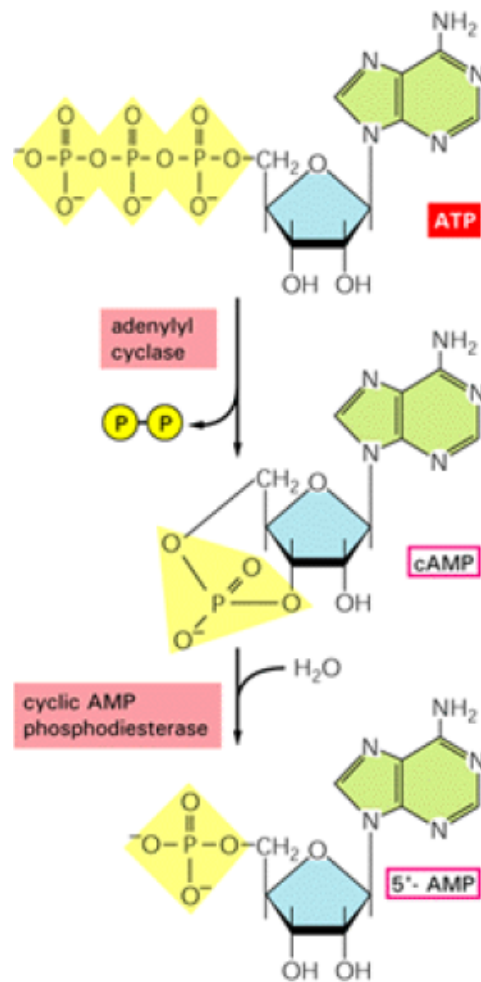


Figura 6. Síntesis y degradación del AMPc en el cilio (3).

El AMPc es de gran importancia en el sistema olfatorio, ya que su presencia activa el funcionamiento de canales iónicos que permiten la entrada de cationes al interior del cilio, especialmente  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  (canal CNG).

En la Figura 7 se puede observar el esquema de un corte transversal del cilio. Antes de que los receptores ligan las moléculas de odorantes, no se genera AMPc, y por ende, los canales iónicos se encuentran cerrados. En el instante en que se gatilla la producción de AMPc, éste activa los canales catiónicos, generando una corriente de entrada que despolariza el cilio. Esta señal se transmite al resto de la neurona olfatoria en dirección al cerebro, donde posteriormente la señal eléctrica será procesada como un olor determinado.

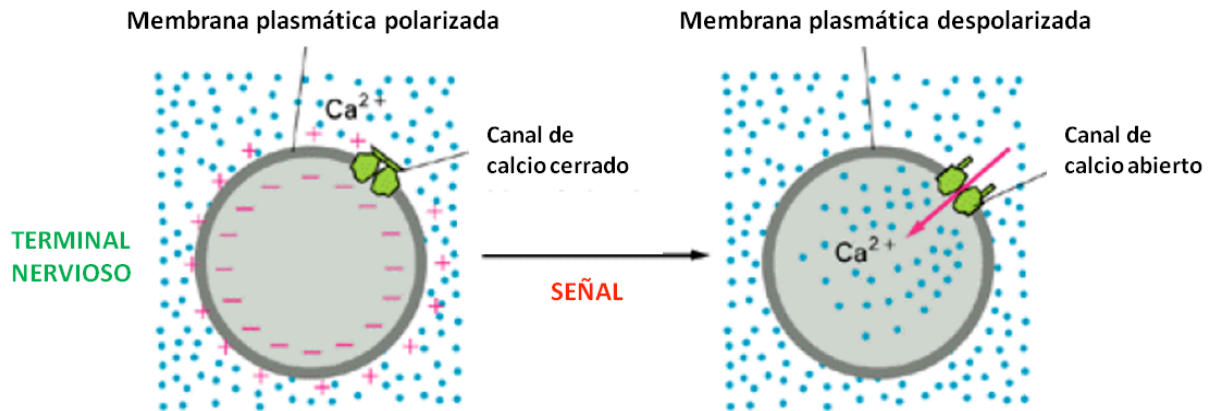


Figura 7. Generación de la señal eléctrica en el cilio (3)

Si bien la entrada de cationes genera una despolarización de la membrana del cilio, este proceso es insuficiente, ya que el cambio de potencial no es lo suficientemente alto para inducir la descarga de un potencial de acción. De acuerdo a esto, la entrada de cationes por el canal CNG funciona también como activador de canales de cloruro dependientes de calcio. Estos canales, activados por el  $Ca^{2+}$  intracelular, permiten la salida de iones cloruro ( $Cl^-$ ), generando una corriente que es responsable de más del 80% de la corriente total de despolarización.

Dado que el calcio induce la activación de varios procesos celulares, éste puede ser tóxico en altas concentraciones, por lo que la célula cuenta con sistemas de extrusión que permiten que la neurona recupere su estado basal y sea capaz de responder nuevamente a odorantes. Se conocen dos mecanismos que actúan en el cilio: la bomba de  $Ca^{2+}$ -ATPasa (PMCA) y el intercambiador Na-Ca (NCX). Ambos transportadores son activados por la presencia de  $Ca^{2+}$ , pero mientras la bomba PMCA utiliza energía proveniente de la hidrólisis de ATP en el proceso, el intercambiador NCX la obtiene del gradiente electroquímico del sodio. Un modelo que muestra cómo ambos mecanismos de transporte participan en el retorno al estado basal de la neurona está esquematizado en la Figura 8.

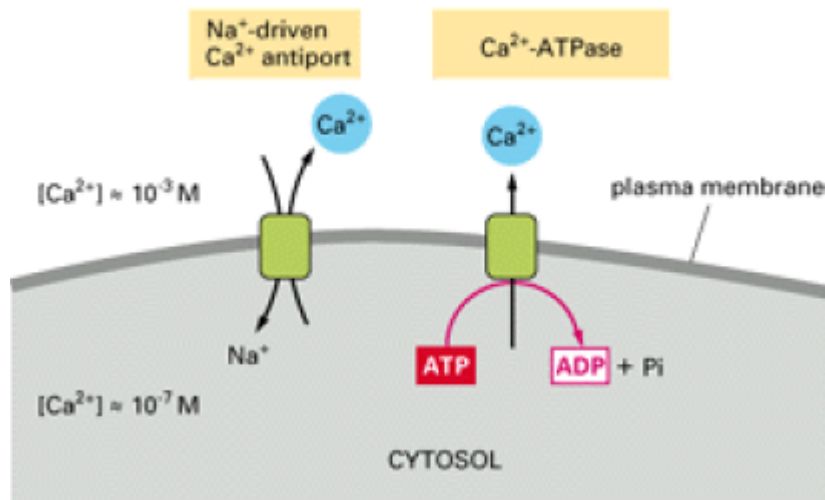
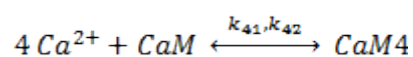


Figura 8. Efecto de la bomba PMCA y el intercambiador NCX en la  $[Ca^{2+}]$  (3).

Como se puede apreciar, la activación de un receptor es amplificada en varios órdenes de magnitud por una cascada de reacciones en la célula. Esto es característico de todos los sistemas gatillados por proteínas G unidas a receptores transmembrana. Cada paso de la cascada permite la amplificación de la señal, y a la vez la generación de un proceso altamente regulado. Así, cuando una molécula de odorante se une a su receptor específico, la proteína G asociada permanece activa por varios segundos, permitiendo a la adenilciclase generar un gran número de moléculas de AMPc. De esta forma, es posible generar concentraciones micromolares de AMPc a partir de concentraciones nanomolares de odorantes, permitiendo al sistema olfatorio ser más sensible en la detección de olores. Este proceso de amplificación de señales es controlado por mecanismos de retroalimentación que permitan autorregular la cascada, tales como la calmodulina y el mismo calcio.

### 2.2.1 Calmodulina (CaM)

En el cilio, el calcio que ingresa actúa como inhibidor de su propio canal iónico cuando se une a una proteína llamada calmodulina (CaM). La calmodulina es una proteína citosólica soluble, que actúa como buffer de calcio. Cuando CaM se une a 4 moléculas de  $Ca^{2+}$  funciona como regulador de la cascada olfatoria, controlando la entrada de calcio al cilio. En la Figura 9 se muestra la estructura de esta proteína, la cual posee dos extremos globulares, en cada uno de los cuales se unen dos moléculas de  $Ca^{2+}$ . El complejo formado se llama calcio-calmodulina (CaM4 o CaCaM). De esta forma, la cinética de la unión de  $Ca^{2+}$  a CaM es la que sigue:



Donde  $k_{41}$  y  $k_{42}$  son las constantes cinéticas de formación y degradación de CaM4 respectivamente. El complejo CaM4 funciona como inhibidor del canal CNG, regulando la entrada de  $Ca^{2+}$



al cilio. Para lograr el efecto inhibitorio sobre el canal CNG, CaM4 reconoce un péptido objetivo de éste, cambiando su conformación (Figura 9).

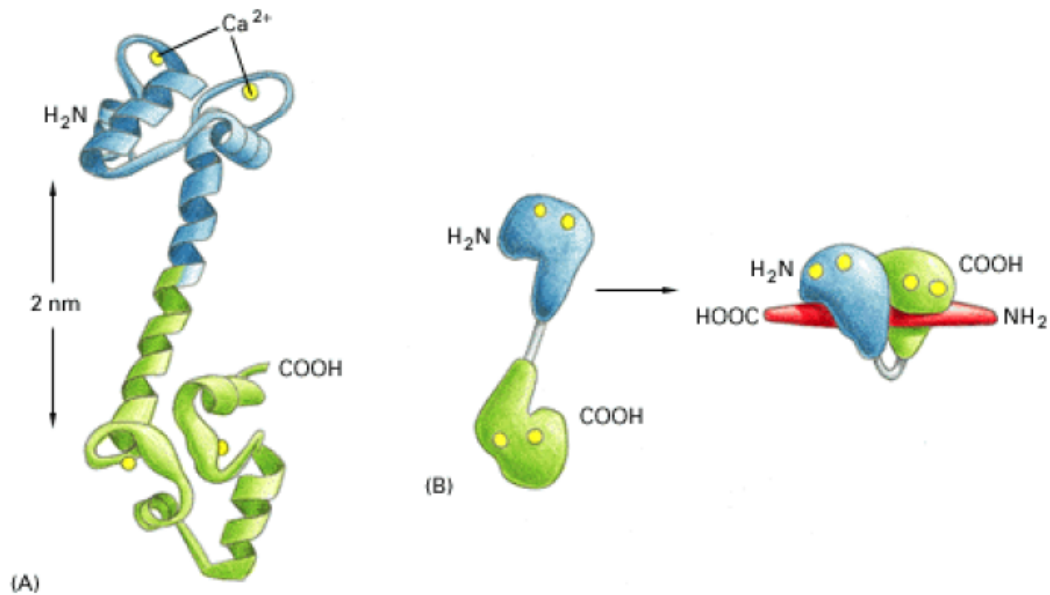


Figura 9. Estructura de la calmodulina y su acción como buffer de Ca<sup>2+</sup> (3)

### 2.2.2 Canal CNG

El canal CNG (Canal activado por nucleótidos cíclicos) es la principal fuente de entrada de cationes al cilio. Por este ingresan principalmente los iones Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>. El canal se activa mediante AMPc. La conductancia unitaria de un canal CNG es de aproximadamente 45 pS (en ausencia de iones divalentes, para así evitar la inhibición por calcio), con un potencial de inversión cercano a 5 mV.

La relación  $I_{cng}$  v/s V (gráfico de corriente en función del voltaje) es lineal entre los -80 y los +80 mV (4), tal como se muestra en la Figura 1, donde se observa también que la probabilidad de que el canal se encuentre abierto no se ve afectada por el voltaje (Gráfico pequeño).

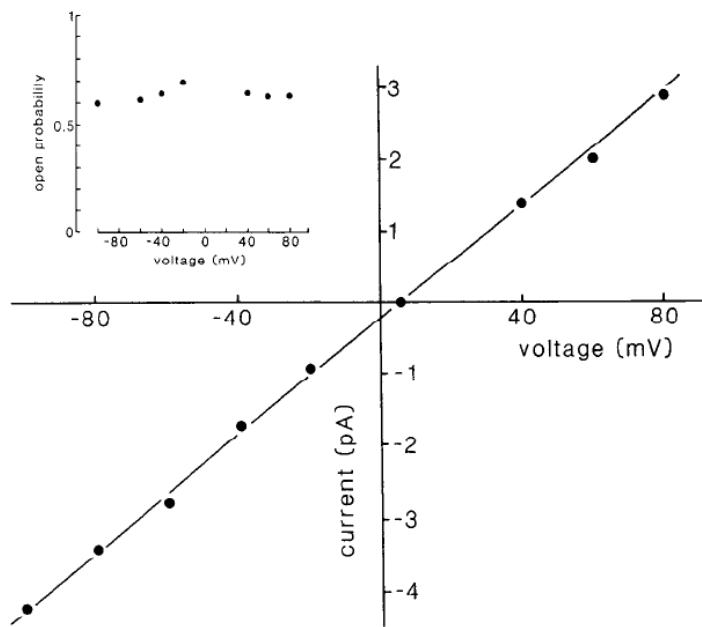


Figura 10. Relación entre corriente y voltaje del canal CNG

La curva de flujo de iones en función de la concentración de AMPc se ajusta a una función de Hill con coeficientes  $K_{0.5}$  igual a  $20 \mu M$  y un  $n$  mayor a 2, sugiriendo la acción de al menos 2 moléculas de AMPc para lograr la apertura del canal (4).

El tiempo promedio de apertura del canal mediante la acción de AMPc a concentración saturante es de 1.3 ms (5). A continuación, se muestra la actividad típica de este canal en función del tiempo, en ausencia (control) y presencia de AMPc, a un potencial de membrana de -60 mV.

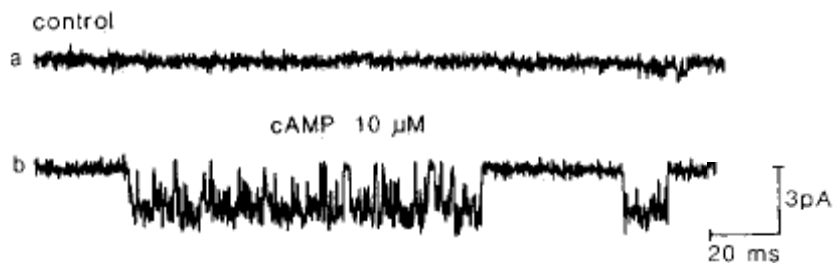


Figura 11. Actividad del canal CNG a 0 y 10  $\mu M$  de AMPc (4)

Como CaM4 se forma a partir de la unión de calmodulina con cuatro iones  $Ca^{2+}$ , el canal es regulado indirectamente por el mismo  $Ca^{2+}$  que ingresa a través de él. Esta inhibición por  $Ca^{2+}$  afecta directamente el tiempo promedio del estado cerrado, el cual cambia de 1.8 a 31.0 ms cuando se varía la concentración de  $Ca^{2+}$  de 0.1 a 3.0  $\mu M$  respectivamente (5).

### 2.2.3 Canal de Cl<sup>-</sup> dependiente de Ca<sup>2+</sup> ( Cl(Ca) )

El canal de cloruro dependiente de Ca<sup>2+</sup> es el principal generador de la despolarización en el cilio olfatorio. Este se activa por la presencia de Ca<sup>2+</sup> intracelular, generando una corriente positiva gracias a la salida de iones Cl<sup>-</sup>, siendo así el responsable de más del 80% de la corriente total de despolarización generada en el cilio, variando según la especie.

En pruebas de laboratorio se ha determinado que una vez que el canal se abre, el tiempo promedio que éste permanece abierto es de aproximadamente 0.742 ms.

Además, la corriente macroscópica normalizada de una población de canales Cl(Ca) en función de la concentración de calcio se puede determinar a partir del gráfico de la Figura 12, el cual se ajusta a una función de Hill con  $K_{1/2} = 2.1 \mu\text{M}$  y  $n = 2.8$  para un voltaje de -40 mV (6).

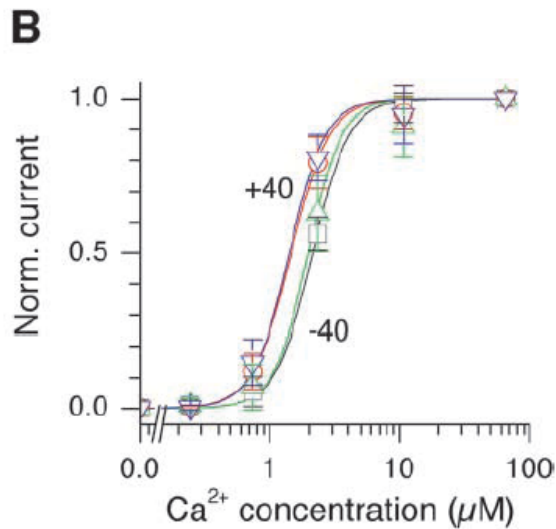


Figura 12. Corriente Normalizada del canal Cl v/s [Ca<sup>2+</sup>] a -40 y 40 mV (6)

La línea azul representa la curva obtenida para mediciones realizadas a -40 mV. La conductancia máxima que el canal alcanza es de aproximadamente 43 pS, y al igual que para el canal CNG, la relación corriente-voltaje es lineal en el rango de interés (entre 0 y -70 mV) (6). Esto sugiere que ambos canales, CNG y Cl(Ca), obedecen la Ley de Ohm.

## 2.2.4 Bomba de $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (PMCA)

La bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa o PMCA, es una proteína transmembrana que se encuentra presente en el cilio olfatorio. Esta posee un tamaño cercano a los 130 kDa y tiene la función de remover el  $\text{Ca}^{2+}$  del interior del cilio, para así volver al estado basal después de una respuesta olfatoria. Durante este proceso de remoción, se requiere de la hidrólisis de ATP, ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  es retirado en contra del gradiente de concentración (7). La actividad de la bomba PMCA se ve potenciada por la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $K_{\text{pmca}_1} = 0.67 \mu\text{M}$ ) y por la acción de la Calmodulina (CaM) ( $K_{\text{pmca}_2} = 0,031 \mu\text{M}$ ).

El flujo de la bomba se considerará del orden de  $10^3$  iones por segundo, valor estimado para una bomba de este tipo, el cual es pequeño comparado con los aproximadamente  $10^7$  iones por segundo que transporta un canal.

## 2.2.5 Intercambiador Na-Ca (NCX)

El intercambiador Na-Ca es un transportador que tiene como principal función restablecer los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, al igual que la bomba PMCA. El tamaño del intercambiador es de aproximadamente 135 kDa (8). En su funcionamiento, el intercambiador utiliza la energía electroquímica del sodio, transportando 2 iones de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el exterior y 3 iones de  $\text{Na}^+$  hacia el citosol. Como resultado, NCX genera una corriente positiva por cada intercambio que éste realiza. Sin embargo, las corrientes generadas por NCX y PMCA son despreciables en el microdominio en comparación con la generada por los canales y la difusión.

Como la relación corriente-voltaje no es lineal para NCX (9), no es posible aplicar la ley de ohm para describir su funcionamiento.

## 2.2.6 Difusión en el Microdominio

La difusión de calcio dentro del cilio es uno de los principales moduladores de la dinámica de este ión. Se ha observado que en un espacio de tiempo de al menos dos milisegundos, la concentración de calcio decae a prácticamente a cero a una distancia de 100 nm de la boca del canal CNG (10). La rápida difusión de calcio en el cilio se ve acrecentada por la presencia de buffers.

Aunque lo que más interesa en el presente informe es la difusión del calcio iónico, todas las moléculas, cargadas o no, experimentan difusión de acuerdo a la ley de Fick. Sin embargo, las partículas cargadas, considerando que se encuentran en un medio acuoso, también interactúan entre ellas de acuerdo a las leyes de la electrodinámica, afectando el potencial local. De esta forma, considerando a los distintos iones como partículas con una carga determinada, se aprecia que en la difusión del calcio también influye la concentración de otros iones como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

### **2.2.7 Fluoróforo (Fluo 4)**

Para poder observar el comportamiento del calcio en un microdominio, es necesario marcar los iones de calcio con algún compuesto que sea posible distinguir mediante alguna característica especial. Fluo 4 es una molécula que interactúa con los iones de calcio, indicando su unión con éste mediante fluorescencia. Para los experimentos se utilizó Fluo 4 debido a la brillante fluorescencia que proporciona, absorbiendo principalmente luz a 488 nm de longitud de onda. El  $K_{1/2}$  de este fluoróforo en su interacción con calcio es de aproximadamente 0.3  $\mu\text{M}$  (11).

## 2.3 Mediciones experimentales de las fluctuaciones de $\text{Ca}^{2+}$ en el cilio

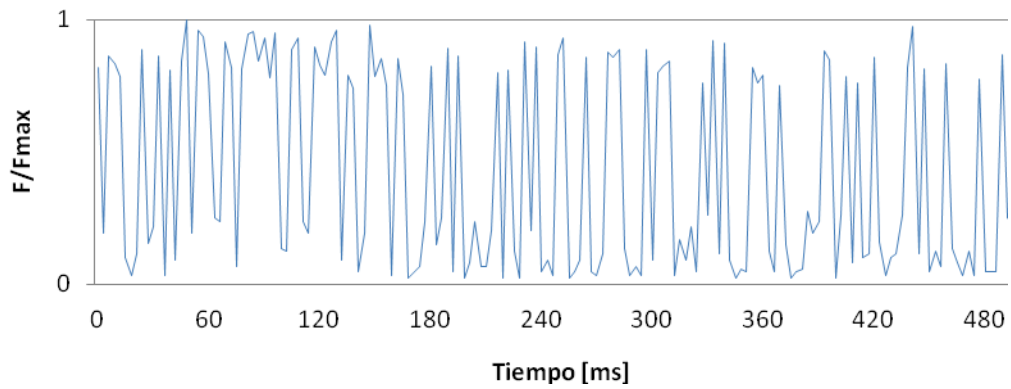
A continuación se muestran los resultados obtenidos experimentalmente en "*Ca<sup>2+</sup> Microdomain in Olfactory Cilia Support Low Signalling Amplification of Olfactory Transduction*" (1). Estas mediciones proporcionan evidencia de la dinámica temporal y distribución espacial de las señales de calcio al interior de un cilio olfatorio. Para iniciar la actividad del canal CNG las células fueron incubadas previamente con AMPc enjaulado, el que es posible liberar posteriormente de manera instantánea mediante irradiación de la célula con luz UV. Se mostró además que tales señales se observaron en puntos específicos a lo largo del cilio ("hot spots"), y no uniformemente como se creía previamente, sugiriendo la presencia de microdominios de calcio. A partir de las mediciones de fluorescencia del indicador Fluo-4 en función del tiempo se puede estudiar la evolución temporal de la señal del complejo calcio-fluoróforo (CaFluo) en un microdominio, el cual representa de alguna manera la concentración de calcio iónico libre.

Se realizaron mediciones de la señal fluorescente en función del tiempo en un mismo microdominio para tres condiciones distintas. El experimento control es con el cilio operando con todos sus transportadores y canales. Luego, para observar el efecto de la bomba PMCA y del intercambiador NCX en las oscilaciones de CaFluo, se inhibió la acción de éstos en los respectivos experimentos –PMCA y –NCX. Algunos de los resultados se presentan a continuación.

Un hallazgo sorprendente fue que la señal de fluorescencia en cada microdominio fluctúa rápidamente entre los valores 0 y Fmax (que depende de la concentración de fluoróforo inyectado en la célula), lo que es muy similar a la actividad eléctrica de un canal. Esto sugiere que la concentración de calcio intracelular en un microdominio puede reflejar directamente la apertura y cierre de un canal CNG.

Para las tres condiciones se realizaron mediciones durante cuatro segundos aproximadamente. Sin embargo, al ser este tiempo muy largo para observar de forma gráfica las oscilaciones del complejo CaFluo, en las siguientes figuras se muestra la actividad en el microdominio durante los primeros 500 ms de las mediciones realizadas.

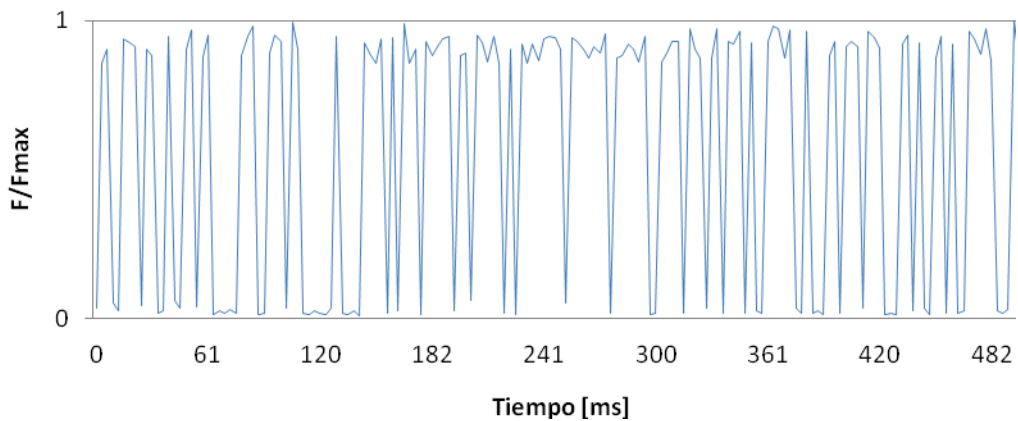
En la Figura 13 se muestra la fluorescencia normalizada en función del tiempo.



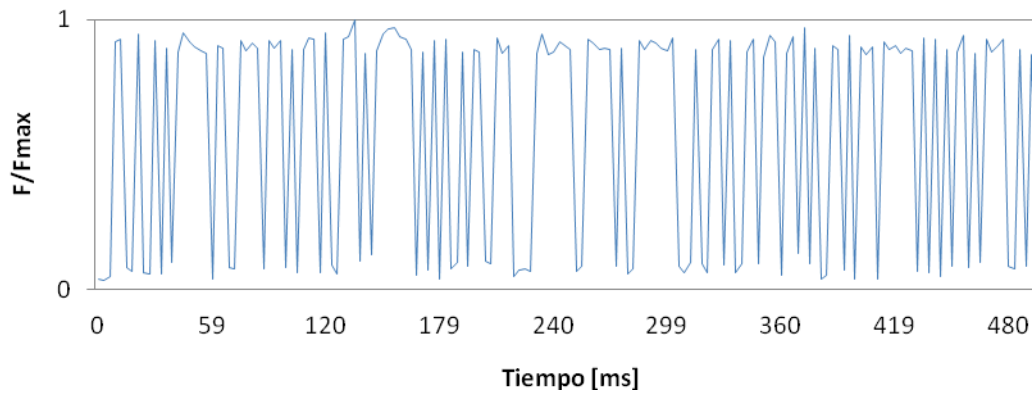
**Figura 13. Canal CNG en función del tiempo (Control)**

Para el experimento control se obtuvo una probabilidad de permanencia del calcio en el microdominio de 0.41 (en un 41% de los 4 segundos de la medición había presencia considerable de calcio en el punto del cilio analizado), suponiendo que la concentración de calcio iónico es directamente proporcional a la concentración de CaFluo.

En las Figura 14 y 15 se muestra la variación de CaFluo en función del tiempo para el caso en que se ha inhibido la bomba PMCA o el intercambiador NCX, respectivamente.



**Figura 14. Fluorescencia normalizada en función del tiempo (-PMCA)**



**Figura 15. Fluorescencia normalizada en función del tiempo (-NCX)**

Para -PMCA y -NCX la probabilidad de encontrar concentraciones apreciables de CaFluo (cuando la fluorescencia normalizada es cercana a 1) en el microdominio fue de 0.55 y 0.62 respectivamente.

Para tener una mejor comprensión de los procesos involucrados en estas observaciones experimentales, surge la idea de realizar un modelo teórico de un supuesto microdominio en el cilio olfatorio y verificar si las fluctuaciones de calcio dentro de éste poseen el mismo comportamiento que el observado empíricamente. Este modelo debe replicar la estocasticidad de las mediciones experimentales, por lo que obligatoriamente la resolución del problema debe incorporar la apertura y cierre de los canales iónicos, especialmente del CNG, que es por donde ingresa el calcio al cilio.



## Capítulo III Modelo Teórico

### 3.1 Cilio Olfatorio y Microdominio

El cilio olfatorio es ideal para el modelamiento matemático de la dinámica del calcio ya que no posee organelos internos y tiene forma similar a la de un cilindro, facilitando el análisis de los procesos difusivos que puedan ocurrir dentro de él. Además, como la idea del presente trabajo es modelar sólo un microdominio, éste se considerará como un punto en el espacio comparado con el tamaño del cilio, por lo que es posible utilizar ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO's) como una buena aproximación de la dinámica del calcio iónico.

Debido a que en el experimento a simular, el AMPc enjaulado se libera de manera instantánea a través de la emisión de luz UV, se considerará la concentración de AMPc constante en el tiempo, esto es:

$$[AMPc] = A \cdot H(t - t_0)$$

Donde A es la concentración intracelular de AMPc y H la función Heaviside o Escalón. De esta forma, es posible ignorar la dinámica de formación y descomposición del AMPc, debido a que las tasas de decrecimiento y generación son despreciables para el tiempo considerado en los experimentos. Por la misma razón, toda la cascada previa a la generación de AMPc no será considerada.

Del mismo modo, la concentración de ATP y de otros iones (intra y extracelulares) distintos al calcio, será considerada constante en el tiempo, ya que aunque pueden existir ciertas variaciones en sus valores, estas son mínimas y no afectan los resultados. Por el contrario, los cambios en el voltaje producidos por las corrientes de otros iones (tales como el cloruro y el sodio) si serán tomados en cuenta.

Debido a que se ha estimado que el diámetro de un microdominio es de alrededor de 40 nm (1), se considerará un dominio de trabajo del volumen de una semiesfera con ese valor para su diámetro.

Como el volumen de un microdominio es muy pequeño comparado con el del cilio, el primero puede ser considerado como un punto en el espacio, por lo que es válido intentar resolver el problema con EDO's. De acuerdo con esta aproximación, toda corriente de calcio que ingrese a través de los canales se supondrá que difundirá uniformemente y de manera instantánea dentro del microdominio, elevando la concentración del ión. Esta aproximación es válida, ya que a sólo 100 nm de la boca del canal CNG, la concentración de calcio es varios órdenes de magnitud menor que en un punto cualquiera de éste (12).

### 3.2 Calmodulina (CaM)

De la cinética de interacción entre CaM y el ión  $Ca^{2+}$  (2.2.1) se desprende que la concentración del complejo calcio-calmodulina (CaM4) varía en el tiempo según la siguiente ecuación:

$$\frac{d[CaM4]}{dt} = k_{41}[Ca^{2+}]^2[CaM] - k_{42}[CaM4]$$

Donde  $[CaM]$  es la concentración de calmodulina libre,  $[CaM4]$  representa la concentración del complejo calcio-calmodulina, y  $k_{41}$  y  $k_{42}$  son las constantes de formación y degradación del complejo respectivamente. Cada una de las concentraciones involucradas es función del tiempo.

Sin embargo, la ecuación anterior es reemplazada de acuerdo a la observación experimental (13) a la siguiente expresión:

$$\frac{d[CaM4]}{dt} = k_{41}[Ca^{2+}]^2[CaM] - k_{42}[CaM4]$$

Es válido considerar una cinética de orden cuadrático con respecto a la concentración de calcio ya que en la calmodulina hay dos sitios de unión para calcio (en cada uno de los cuales se adhieren 2 moléculas de este ión). Además, se supondrá que no hay degradación ni creación de calmodulina, por lo que la concentración total de esta permanece constante en el tiempo, cumpliéndose que:

$$[CaM]_{tot} = Constante = [CaM](t) + [CaM4](t) \quad \forall t > 0$$

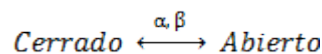
Donde  $[CaM]_{tot}$  es la concentración total de calmodulina en el medio.

Finalmente, la ecuación para el complejo CaM4 es:

$$\frac{d[CaM4]}{dt} = k_{41}[Ca^{2+}]^2([CaM]_{tot} - [CaM4]) - k_{42}[CaM4]$$

### 3.3 Modelos Cinéticos de los Canales y Probabilidad de Ocurrencia

Para describir el comportamiento de un canal o transportador particular se utilizará un modelo cinético que describa cada uno de sus posibles estados mediante ecuaciones de reacción, las que pueden ser reversibles o no, según sea el caso (2). Por ejemplo, para un canal cualquiera que tenga sólo los estados “abierto” y “cerrado”, su mecanismo es el siguiente:



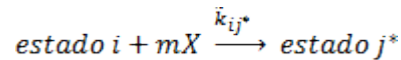
Con  $\alpha$  y  $\beta$  las constantes cinéticas de transición que describen el cambio de estados del canal ( $\alpha$  describe el paso de cerrado a abierto y  $\beta$  el paso de abierto a cerrado). El tiempo promedio  $\tau$  que el canal permanece en cada estado es:

$$\begin{aligned}\tau(\text{abierto}) &= 1/\beta \\ \tau(\text{cerrado}) &= 1/\alpha\end{aligned}$$

Para un sistema más general de  $n$  estados, el tiempo promedio que el canal permanece en un estado  $i$  cualquiera es:

$$\tau(\text{estado } i) = \frac{1}{\sum_{j \neq i} k_{ij}} \quad \text{Con } i \in \{1, 2, \dots, n\}$$

Donde  $k_{ij}$  es la variable de transición del estado  $i$  al  $j$ . Si el paso del estado  $i$  a uno  $j^*$  determinado requiere de la unión de  $m$  moléculas de ligando  $X$  al canal, esto es:



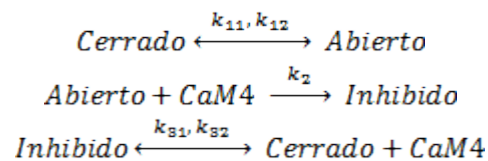
$k_{ij}^*$  se escribe como:

$$k_{ij}^* = \tilde{k}_{ij}^* \cdot [X]^m$$

Con  $\tilde{k}_{ij}^*$  la constante transición del estado  $i$  al  $j^*$  en unidades de  $\text{ms}^{-1}\text{M}^{-m}$ . Si no se requiere unión de ningún ligando para la transición, entonces simplemente  $k_{ij}^* = \tilde{k}_{ij}^*$ .

### 3.3.1 Canal CNG

El canal CNG posee tres estados básicos: abierto, cerrado e inhibido. La interacción entre ellos se puede describir a partir de las siguientes ecuaciones (13):



Se sabe que el AMPc es necesario para la activación del canal CNG, necesitándose de 2 a 3 moléculas para lograr el estado abierto. Sin embargo, la activación por este compuesto no se incluye en el presente modelo debido a que en los experimentos a simular es posible suponer un valor estable en la concentración de AMPc.

Estas ecuaciones cinéticas se pueden expresar como un ciclo que describe la interacción entre los distintos estados, tal como se muestra en el siguiente esquema:

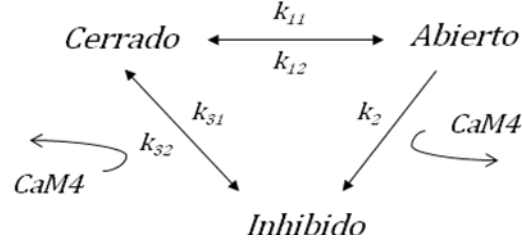


Figura 16. Esquema del modelo markoviano para el canal CNG

Del esquema es posible observar que el canal CNG, para pasar de “inhibido” a “abierto”, necesita primero adoptar el estado “cerrado”, liberando CaM4 en el proceso.

Luego de haber interpretado la cinética del canal como un mecanismo de reacción, es posible asignar a cada estado una probabilidad de ocurrencia en función del tiempo, la cual depende explícitamente de los ligandos respectivos y de las constantes de transición. Así, la probabilidad de que el canal se encuentre en un estado determinado en el tiempo  $t+\Delta t$  dependerá de lo que haya ocurrido en el instante anterior (tiempo  $t$ ) (2). Para el canal CNG, las probabilidades de ocurrencia se escriben:

$$P_{t+\Delta t}^c = P_t^c(1 - k_{11}\Delta t - k_{31}[CaM4]\Delta t) + P_t^a k_{12}\Delta t + P_t^i k_{32}\Delta t$$

$$P_{t+\Delta t}^a = P_t^a(1 - k_{12}\Delta t - k_2[CaM4]\Delta t) + P_t^c k_{11}\Delta t$$

$$P_{t+\Delta t}^i = P_t^i(1 - k_{32}\Delta t) + P_t^c k_{31}[CaM4]\Delta t + P_t^a k_2[CaM4]\Delta t$$

Donde  $P_t^c$ ,  $P_t^a$  y  $P_t^i$  son las probabilidades de encontrar el canal CNG en el estado “cerrado”, “abierto” e “inhibido” en el tiempo  $t$ , respectivamente.

Luego, si  $\Delta t \rightarrow 0$ , se tiene que:

$$\frac{dP_t^c}{dt} = -k_{11} - k_{31}[CaM4] + P_t^i k_{32} + P_t^a k_{12}$$

$$\frac{dP_t^a}{dt} = -k_{12} - k_2[CaM4] + P_t^c k_{11}$$

$$\frac{dP_t^i}{dt} = 1 - k_{32}\Delta t + P_t^c k_{31}[CaM4] + P_t^a k_2[CaM4]$$

A partir de las ecuaciones discretas para la probabilidad de cada uno de los estados, se puede escribir la matriz de probabilidad  $Q_{CNG}(t)$ . En el caso del canal CNG esta es:

$$Q_{CNG}(t) = \begin{pmatrix} 1 - (k_{11} + k_{31}[CaM4])\Delta t & k_{12} \Delta t & k_{32} \Delta t \\ k_{11}\Delta t & 1 - (k_{12} + k_2[CaM4])\Delta t & 0 \\ k_{31}[CaM4]\Delta t & k_2 [CaM4] \Delta t & 1 - k_{32} \Delta t \end{pmatrix}$$

Así, es posible describir la probabilidad de cada estado del canal CNG en un tiempo dado ( $t + \Delta t$ ) en función de las probabilidades en el tiempo  $t$ .

$$\begin{pmatrix} P_{t+\Delta t}^c \\ P_{t+\Delta t}^a \\ P_{t+\Delta t}^i \end{pmatrix}_{CNG} = Q_{CNG}(t) \begin{pmatrix} P_t^c \\ P_t^a \\ P_t^i \end{pmatrix}_{CNG}$$

Finalmente, la corriente total a través del canal CNG se escribe como

$$I_{CNG}(t) = g_{CNG}(t) (V_{CNG} - V(t))$$

Donde  $V(t)$  la diferencia de voltaje entre el intra y extracelular,  $V_{CNG}$  es el voltaje de reversión del canal CNG y  $g_{CNG}(t)$  es la función conductancia, definida como:

$$g_{CNG}(t) = \begin{cases} g_{CNG} & \text{si el canal se encuentra en el estado "abierto" en } t \\ 0 & \text{si el canal se encuentra en el estado "cerrado" o "inhibido en } t \end{cases}$$

Donde  $g_{CNG}$  es la conductancia unitaria del canal CNG.

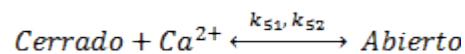
El flujo de  $Ca^{2+}$  a través del canal CNG se escribe en unidades de  $\mu Ms^{-1}$  y depende de la corriente  $I_{CNG}(t)$  de la siguiente forma:

$$I_{CNG}(t) = \frac{frac\_Ca \cdot I_{CNG}(t)}{2 \cdot F \cdot vol}$$

Donde  $frac\_Ca$  es la fracción de calcio que el canal lleva en su flujo,  $F$  es la constante de Faraday y  $vol$  el volumen estimado de un microdominio.

### 3.3.2 Canal de $Cl^-$ dependiente de $Ca^{2+}$ (Cl(Ca))

El canal Cl(Ca) permite aumentar la corriente despolarizante hacia el interior del cilio. Puesto que su apertura es activada mediante la acción del ión  $Ca^{2+}$ , una forma de describir su mecanismo es la siguiente



Si bien el mecanismo anterior se ajusta bastante bien al comportamiento del canal, su funcionamiento podría ser más complicado. Sin embargo, no se poseen datos definitivos sobre su funcionamiento debido a la dificultad de obtener registros de canal único.

Luego, la matriz de probabilidad del canal Cl(Ca) es la que sigue:

$$Q_{Cl} = \begin{pmatrix} 1 - k_{51}[Ca^{2+}]dt & k_{52} dt \\ k_{51}[Ca^{2+}]dt & 1 - k_{52} dt \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} P_{t+\Delta t}^c \\ P_{t+\Delta t}^a \end{pmatrix}_{Cl} = Q_{Cl}(t) \begin{pmatrix} P_t^c \\ P_t^a \end{pmatrix}_{Cl}$$

Se supondrá que en el microdominio hay alrededor de 5 canales de cloruro dependientes de  $Ca^{2+}$  (1). El número de canales puede ser ajustado posteriormente obedeciendo al porcentaje de la corriente total que experimentalmente se sabe es de  $Cl^-$ .

Luego, la corriente de  $Cl^-$  se escribe como:

$$I_{Cl}(t) = \sum_{i=1}^{n_{canales_{cl}}} g_{Cl}^i(t) (V_{Cl} - V(t))$$

Es importante notar que la probabilidad de que los canales de  $Cl^-$  se encuentren abiertos depende de la concentración de  $Ca^{2+}$  en el microdominio, de modo que la probabilidad es igual para todos ellos. Sin embargo, por tratarse de procesos estocásticos, las funciones  $g_{Cl}^i(t)$  serán diferentes para cada canal.

### 3.4 Bomba de ATP (PMCA)

La bomba de  $Ca^{2+}$ -ATPasa, que participa en la remoción de calcio del interior del cilio, funciona en contra del gradiente de concentración del  $Ca^{2+}$ , por lo que necesita de la hidrólisis de ATP, con el consecuente gasto de energía, para funcionar. Como la concentración de ATP se considera constante durante el tiempo del experimento, la ecuación para el flujo de  $Ca^{2+}$  depende solamente de la concentración de este mismo. Luego, el flujo para una gran cantidad de bombas PMCA es el que sigue (7):

$$J_{PMCA} = J_{PMCA}^{max} \frac{[Ca^{2+}]^2}{[Ca^{2+}]^2 + K_{PMCA}^2}$$

Como no se sabe con exactitud cuál es el flujo unitario de una bomba PMCA, se utilizará esta fórmula para describir la cinética de un sólo transportador. Es claro que una ecuación determinista no

puede reflejar el flujo de una, o unas cuantas bombas PMCA, pero esto se hará con el único propósito de tener una idea aproximada del valor de flujo máximo requerido para replicar los resultados experimentales.

### 3.5 Intercambiador Na-Ca (NCX)

El intercambiador NCX posee una doble regulación de su funcionamiento. La regulación alostérica se debe a que NCX es una proteína con sitios de unión para  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . El intercambiador posee una regulación de origen electroquímico que depende de forma no lineal del voltaje (14). Así, el flujo  $J_{\text{NCX}}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del intercambiador puede ser descrito como sigue:

$$J_{\text{NCX}} = J_{\text{NCX}}^{\text{max}} f_{\text{alostérico}} f_{\text{electroquímico}}$$

Donde:

$$f_{\text{alostérico}} = \frac{[\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{ncx}}}}{([\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{ncx}}} + K_{\text{NCX}}^{n_{\text{ncx}}})}$$

$$f_{\text{electroquímico}} = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \exp\left((v-1) \frac{F}{RT} V\right) - \alpha \exp\left(v \frac{F}{RT} V\right)}{(1 + \gamma [\text{Ca}^{2+}]) \left(1 + K_{\text{sat}} \exp\left((v-1) \frac{F}{RT} V\right)\right)}$$

$J_{\text{NCX}}^{\text{max}}$  es el flujo máximo de calcio, R es la constante de gases ideales, T es la temperatura en grados K (se considerará T=298 K),  $\alpha, v, \gamma$  son constantes de ajuste y  $n_{\text{ncx}}$  es el coeficiente de Hill de la regulación alostérica por calcio. Reescribiendo la ecuación para el flujo del intercambiador (válida sólo para muchos NCX),

$$J_{\text{NCX}} = J_{\text{NCX}}^{\text{max}} \frac{[\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{ncx}}}}{([\text{Ca}^{2+}]^{n_{\text{ncx}}} + K_{\text{NCX}}^{n_{\text{ncx}}})} \frac{[\text{Ca}^{2+}] \exp\left((v-1) \frac{F}{RT} V\right) - \alpha \exp\left(v \frac{F}{RT} V\right)}{(1 + \gamma [\text{Ca}^{2+}]) \left(1 + K_{\text{sat}} \exp\left((v-1) \frac{F}{RT} V\right)\right)}$$

Al igual que en el caso de la bomba PMCA, como no se sabe con exactitud cuál es el flujo unitario de un intercambiador NCX, se utilizará esta fórmula para describir la cinética de un sólo transportador. Nuevamente, es claro que una ecuación determinista no puede reflejar el flujo de uno, o unos pocos NCX, pero esto se hará con el único propósito de tener una idea aproximada del valor de flujo máximo de uno requerido para replicar los resultados experimentales.

### 3.6 Difusión en el Cilio

Cuando en el cilio olfatorio se produce una corriente de iones a través de los distintos canales y transportadores, se genera un gradiente de concentración producto de la difusión de los mismos. La difusión de iones se puede describir como una combinación de los procesos difusivos de partículas con movimiento aleatorio (Ecuación de Fick) y la electrodinámica. A esta unión de fenómenos se le llama electrodifusión y se encuentra descrita por la ecuación de Nernst-Planck (15) para la densidad de corriente, que es de la forma:

$$I_s(\vec{x}) = -z_s F D_s \left( \nabla c_s(\vec{x}) + \frac{F z_s c_s(\vec{x})}{RT} \nabla \Psi(\vec{x}) \right)$$

Donde  $I_s$  es la densidad de corriente del ión  $s$  por un canal determinado,  $c_s$  es la concentración del ión,  $z_s$  su valencia,  $D_s$  la constante de difusión y  $\Psi$  es el potencial puntual.

Parte del calcio que ingresa al microdominio a través del canal CNG difunde al resto del cilio, por lo que consideraremos una constante de difusión  $D_{Ca}$ . Como el problema abordado se resolverá mediante Ecuaciones Diferenciales Ordinarias, es necesario introducir un término de difusión que no dependa del espacio. La forma más apropiada es hacer la difusión proporcional a la concentración de Calcio en el microdominio. Así, el flujo  $J_{Ca}$  debido a la difusión puede escribirse como:

$$J_{Ca} = D_{Ca} \cdot [Ca^{2+}]$$

Se sabe que mediante las variaciones del voltaje, las concentraciones de los demás iones presentes en el microdominio afectan también la dinámica del calcio. El voltaje se ve afectado principalmente por las corrientes a través de los canales. Además, como consecuencia de la difusión que existe hacia el soma de la neurona, se produce una corriente  $I_{dif}$  (16), que se supondrá proporcional a la diferencia de voltaje, por lo que básicamente se puede ajustar a una curva de la forma:

$$I_{dif}(t) = g_{dif}(V_{dif} - V(t))$$

Donde  $g_{dif}$  representa la conductancia efectiva de la corriente de difusión. La corriente  $I_{dif}$  básicamente considera la electrodifusión de todos los iones (incluido el calcio), así como alguna corriente de fuga desconocida que pueda existir en el microdominio producto de algún transportador o canal que no haya sido considerado. De esta manera,  $I_{dif}$  permite alcanzar el potencial basal dentro del microdominio ( $\sim -70$  mV).



### 3.7 Voltaje

El voltaje en el dominio dependerá de todas las corrientes significativas involucradas en el proceso. Se puede escribir la ecuación para el voltaje en función del tiempo como:

$$\frac{dV(t)}{dt} = \frac{1}{cap} (I_{CNG}(t) + I_{Ci}(t) + I_{dif}(t))$$

Donde *cap* es la capacitancia de la membrana plasmática en el cilio olfatorio. Esta ecuación se deduce a partir de la analogía del cilio a un circuito de tipo RC, donde la membrana plasmática juega el rol de condensador y los canales iónicos el de resistencias (la resistencia de un canal es igual al inverso del valor de su conductancia).

### 3.8 Fluoróforo (Fluo 4)

Como no se poseen datos de la dinámica del fluoróforo, se supondrá que la cinética de interacción de éste con el calcio es mucho más rápida que la apertura y cierre del canal CNG. Luego, la concentración del complejo  $Ca^{2+}$ -Fluo4 en función de  $[Ca^{2+}]$  se puede ajustar a una función de Hill:

$$[CaFluo] = \frac{[Fluo]_{tot} [Ca^{2+}]}{K_{Fluo} + [Ca^{2+}]}$$

Con  $K_{Fluo} \sim 0.3 \mu M$  (11)

### 3.9 Calcio ( $Ca^{2+}$ )

La ecuación para la variación de calcio en el tiempo considera todos los flujos de este ión a través de la membrana plasmática, la difusión hacia el resto del cilio y la unión a calmodulina. De esta forma, la señal de calcio en el microdominio sigue la siguiente ecuación:

$$\frac{d[Ca^{2+}]}{dt} = J_{CNG} - J_{NCX} - J_{PMCA} - D_{Ca}[Ca^{2+}] - 4k_{41}[Ca^{2+}]^2[CaM] + 4k_{42}[CaM4]$$

## Capítulo IV Modelo Numérico

Para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales se utilizó el software de modelamiento matemático MATLAB. Este programa de cálculo numérico está orientado a resolver problemas con matrices, por lo que es ideal para el propósito del presente trabajo.

Como los canales poseen un comportamiento estocástico en el tiempo, no es posible utilizar un paquete de resolución de EDO's predeterminado. Es por esto que las ecuaciones han sido discretizadas y resueltas en cada instante de tiempo mediante el método de Montecarlo, el que consiste en utilizar números aleatorios para definir el estado de un canal.

### 4.1 Método de Montecarlo aplicado a canales iónicos

Sea un canal  $C$  con  $m$  estados distintos. Este canal se puede asociar a un vector  $P_t$  que define la probabilidad de ocurrencia de cada estado en un tiempo dado como:

$$\overline{P}_t = (P_t^1, P_t^2, P_t^3 \dots P_t^{m-1}, P_t^m),$$

Con  $P_t^k$  la probabilidad de ocurrencia del estado  $k$  en el tiempo  $t$  ( $k=1,2, \dots, m$ ). Debido a que  $\overline{P}_t$  es un vector probabilidad, este debe cumplir que:

$$\sum_{i=1}^n P_t^i = 1 \quad \forall t$$

Como el problema se desea resolver numéricamente para un tiempo total  $T$ , se asigna un intervalo de tiempo  $\Delta t$  tal que  $T = n \cdot \Delta t$ , con  $n$  muy grande. Luego, para cada  $\Delta t$ , se asigna un número aleatorio  $f$  en una distribución uniforme  $U(0,1)$  y se compara con  $\overline{P}_t$ . De esta manera, el valor de  $f$  obtenido para un tiempo  $t^* = l \cdot \Delta t$ , con  $l \in \{1 \dots n\}$ , debe cumplir que:

$$\exists k \text{ tal que } \sum_{i=1}^{k-1} P_t^i < f < \sum_{i=1}^k P_t^i$$

En este caso, se dice que el canal  $C$  se encuentra en el estado  $k$ , con lo que se redefine el vector  $\overline{P}_{t^*}$  como

$$\overline{P}_{t^*} = (0 \dots 0, 1, 0 \dots 0)$$

Donde el valor 1 se encuentra en el  $k$ -ésimo lugar. Esto quiere decir que  $C$  se encuentra en el estado  $k$  en  $t = t^*$ .

## 4.2 Resolución Numérica

Para abordar el problema de forma numérica se utilizará el programa MATLAB. En primer lugar se deben definir todos los parámetros y variables. A cada parámetro se le asigna su valor obtenido o derivado a partir de la bibliografía. Cada variable del problema se define inicialmente como un vector nulo de largo  $n$ , con  $n = T/\Delta t$ , donde  $T$  es el tiempo total del experimento a simular y  $\Delta t$  es un intervalo de tiempo suficientemente pequeño comparado con la unidad de resolución temporal del problema (ms), de modo que la discretización de las ecuaciones diferenciales sea válida.

Para resolver el problema en cada intervalo de tiempo, se construye un loop que comienza en 1 y finaliza en  $n-1$ . Este loop permite realizar una operación que se repetirá para algún índice determinado. En el programa, esto se hace como sigue:

```
for i = 1:1:n-1
```

Donde el primer valor indica el valor inicial del índice, el segundo el paso y el tercero el valor final en el que se desea evaluar una o más expresiones.

Así, cuando el problema se resuelve para un  $i \in \{1, 2, 3 \dots n - 2, n - 1\}$  determinado, lo que se encuentra dentro del loop se vuelve a resolver para  $i + 1$  y así sucesivamente

A continuación, se define la matriz  $Q_{cng}$  como:

```
Qcng = [1-(k11+k31*CaM4(i))*dt    k12*dt    k32*dt    ;
        k11*dt                    1-(k12+k2*CaM4(i))*dt    0    ;
        k31*CaM4(i)*dt            k2*CaM4(i)*dt            1-k32*dt];
```

Luego, se genera el número aleatorio correspondiente  $f_{cng}$  y se resuelve la matriz para  $i + 1$

```
f_cng = random('unif',0,1);
Pt_cng = Qcng*[Pc_cng(i);Po_cng(i);Pi_cng(i)];
```

La función `random('unif',0,1)` indica que el número aleatorio de debe obtener de una distribución uniforme en el intervalo  $[0,1]$ . Finalmente, se realiza la comparación de las probabilidades de ocurrencia de cada estado con el número aleatorio, para así definir en qué conformación se encontrará el canal para el intervalo de tiempo  $(i \cdot T)/n$ .

```
if f_cng > Pt_cng(1) && f_cng <= Pt_cng(1)+Pt_cng(2)
    f_cng = g_cng;
    Po_cng(i+1) = 1;
    Pc_cng(i+1) = 0;
    Pi_cng(i+1) = 0;
```

```

else
    if f_cng <= Pt_cng(1)
        f_cng      = 0;
        Po_cng(i+1) = 0;
        Pc_cng(i+1) = 1;
        Pi_cng(i+1) = 0;
    else
        f_cng      = 0;
        Po_cng(i+1) = 0;
        Pc_cng(i+1) = 0;
        Pi_cng(i+1) = 1;
    end
end
end

```

El paso anterior tiene la función de comparar el número aleatorio generado con la probabilidad de ocurrencia de cada estado. Según el valor de  $f\_cng$ , se determinará qué estado adoptará el canal para ese tiempo  $t$ .

Posteriormente, se efectúa el mismo procedimiento para el canal Cl(Ca), con la diferencia de que esto se hace para un número  $n\_canales\_cl$  de canales, por lo que se construye un nuevo loop con de largo  $n\_canales\_cl$ . En primera instancia, se considerarán 5 canales de Cl(Ca).

```

f_cl = zeros(1,n_canales_cl);

for j=1:n_canales_cl

    Qcl=[1-k51*Ca(i)*dt      k52*dt ;
         k51*Ca(i)*dt      1-k52*dt];

    Pt_cl=Qcl*[Pc_cl(j,i);Po_cl(j,i)];
    f_cl(j) = random('unif',0,1);
    Pt1_cl(j,i+1)=Pt_cl(1);
    Pt2_cl(j,i+1)=Pt_cl(2);

    if f_cl(j) > Pt_cl(1)
        f_cl(j)      = g_cl;
        Po_cl(j,i+1) = 1;
        Pc_cl(j,i+1) = 0;
    else
        f_cl(j)      = 0;
        Po_cl(j,i+1) = 0;
        Pc_cl(j,i+1) = 1;
    end
end
end

```

Por último, ya con los estados definidos de cada canal, es posible resolver el sistema de ecuaciones discretizado. Para esto las derivadas totales con respecto al tiempo de una variable  $X$  se aproximan a la definición de derivada:

$$\frac{dX}{dt} \approx \frac{X(t + \Delta t) - X(t)}{\Delta t}$$

Si  $\Delta t$  es lo suficientemente pequeño, esta aproximación es válida. El sistema de ecuaciones en el lenguaje de MATLAB se presenta a continuación:

```
Icng(i) = f_cng*(Vcng-V(i));

Icl(i) = f_cl*Ca(i)^2/(Ca(i)^2+4.8^2)*(Vcl-V(i))*
ones(1,n_canales_cl)';

Iother(i) = g_other*(Vother-V(i));

Jcng = 10^(-3)*Icng(i)*frac_Ca/(2*F*Vol);

Jpmca = Jpmca_max*Ca(i)^2/(Ca(i)^2+Kpmca^2);

Jncx = Jncx_max*Ca(i)^n_ncx/(Ca(i)^n_ncx+Kncx^n_ncx)*
(Ca(i)*exp((nu-1)*F/R/T*V)-alpha*exp(nu*F/R/T*V))
/((1+gamma*Ca(i))*(1+Ksat*exp((nu-1)*F/R/T*V)));

CaM4(i+1) = CaM4(i)+dt*(k41*Ca(i)^2*(CaMtot-CaM4(i))-k42*CaM4(i));

Ca(i+1) = Ca(i)+dt*(Jcng-Jpmca-Jncx-Dca*Ca(i)-4*k41*Ca(i)^2*(CaMtot-
CaM4(i))+4*k42*CaM4(i));

CaFluo(i+1) = Ca(i)*Fluo_tot/(Kfluo+Ca(i));

V(i+1) = V(i)+dt/cap*(Icng(i)+Icl(i)+Iother(i));
```

Luego, para observar el comportamiento temporal de cada variable, se utiliza la función `plot`. Por ejemplo, si se desea graficar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en función del tiempo se utiliza:

```
plot(delta:delta:tiempo,Ca(1,delta/dt:delta/dt:n));
```

Para comparar los resultados numéricos con los valores experimentales, se grafican los puntos con la misma resolución temporal que la de los datos experimentales (2 ms aproximadamente). La máxima resolución a la cual se pueden observar los resultados de las simulaciones es de  $\Delta t$ . Para que el problema numérico pueda ser resuelto de manera exitosa, el valor de  $\Delta t$  debe ser del orden de micro o nano segundos.

## Capítulo V Resultados

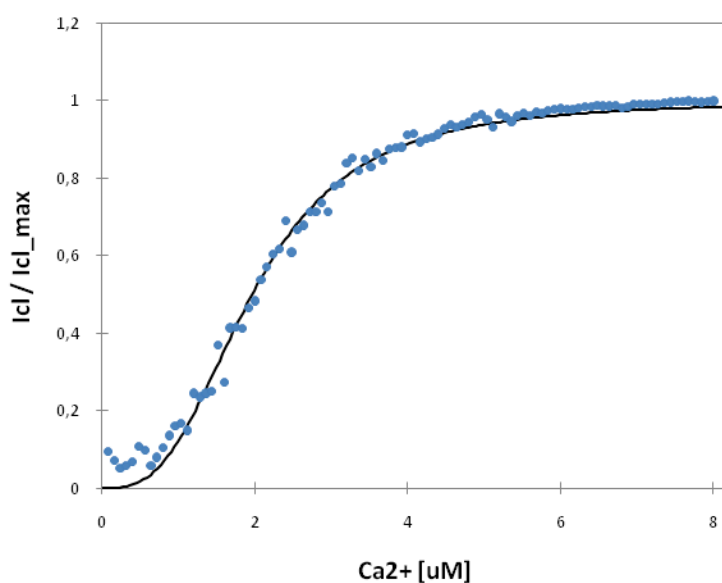
Después de haber abordado la teoría del problema y su resolución numérica, es necesario ajustar todos los parámetros del modelo para poder obtener los resultados deseados. En la Tabla 1 se muestran todos los parámetros utilizados, así como los valores iniciales de las variables  $Po_{cng}(t)$ ,  $Po_{cl}(t)$  y  $V(t)$ . Todas las otras variables fueron inicializadas en cero.

**Tabla 1. Valores de los parámetros utilizados**

CaMtot	2	[uM]
cap	$5 \cdot 10^{-3}$	[nF] (17)
Dca	140	[1/ms] (10)
F	$9.65 \cdot 10^{10}$	[pC/umol]
Fluo_tot	10	[uM]
frac_Ca	0.7	-
g_cl	$43 \cdot 10^{-3}$	[nS]
g_cng	$46 \cdot 10^{-3}$	[nS]
g_other	9.8	[nS]
Jncx_max	1.66	[uM/ms]
Jpmca_max	1.66	[uM/ms]
k11	0.55	[1/ms] (5)
k12	0.79	[1/ms] (5)
k2	0	[1/(ms*uM)]
k31	2.8	[1/(ms*uM)]
k32	$3.6 \cdot 10^{-2}$	[1/ms]
k41	$1.1 \cdot 10^{-6}$	[1/(ms*uM <sup>2</sup> )] (13)
k42	$2.5 \cdot 10^{-3}$	[1/ms] (13)
k51	0.14	[1/(ms*uM)]
k52	1.35	[1/ms]
Kfluo	0.3	[uM] (11)
Kncx	6.3	[uM]
Kpmca	0.67	[uM] (8)
Ksat	0.01	- (16)
n_cl	3	- (6)
n_ncx	1	- (16)
R	8.31	[J/(mol K)]
T	298	[K]
Vcl	0	- (17)
Vcng	0	[mV] (17)
vol	$1.34 \cdot 10^{-19}$	[L]
Vother	-70	[mV] (17)
$\alpha$	0.08	- (16)
$\gamma$	3.38	- (16)
$\nu$	0.02	- (16)
Po_cng(t=0)	1	-
Po_cl(t=0)	1	-
V(t=0)	-70	[mV]

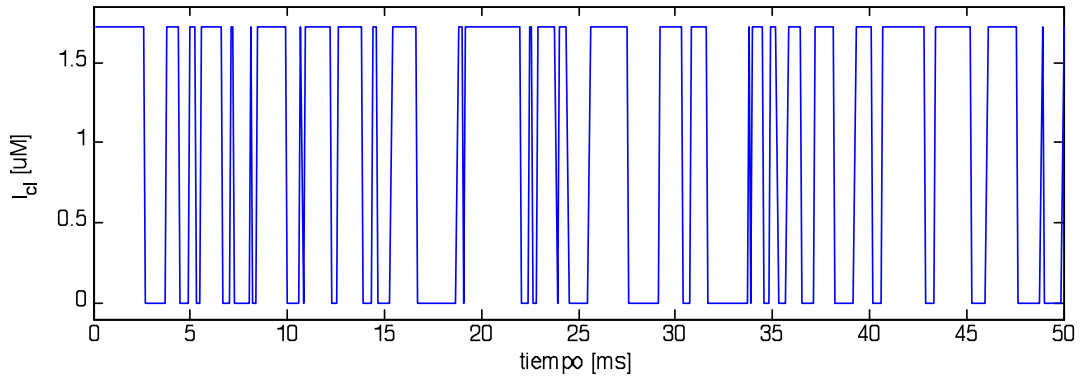
## 5.1 Canal Cl(Ca)

Para verificar el comportamiento de varios canales Cl(Ca) actuando al mismo tiempo se diseñó el programa "I<sub>Cl</sub>\_vs\_Ca.m" (Anexos 5.1), el cual compara el flujo promedio de n canales Cl(Ca) en función de la concentración de calcio. Los parámetros cinéticos del canal se ajustaron de forma apropiada para concordar con los datos experimentales. En la Figura 17 se muestra el resultado generado por el programa. La corriente normalizada (para un total de 20 canales con actividad durante un tiempo de 100 ms) en función de la concentración de Ca<sup>2+</sup>, se ajusta a una curva de Hill con  $K_{1/2}=1.96$  y  $n=2.92$  para un voltaje fijo de -40 mV. El ajuste de los puntos se realizó mediante una regresión no lineal con el programa "XLSTAT 2010", herramienta de análisis estadístico que utiliza Microsoft Excel como plataforma (Macro).



**Figura 17. Corriente Normalizada del canal Cl(Ca) en función de la concentración de Ca<sup>2+</sup>. Ajuste de los datos mediante regresión no lineal a una función de Hill.**

La corriente de un solo canal Cl(Ca) oscila entre los 1.7 pA cuando se encuentra abierto y 0 cuando está cerrado, para un voltaje fijo de -40 mV, tal como se observa en la Figura 18. Este resultado se generó con el archivo "Cl\_channel.m" (Anexos 5.1).

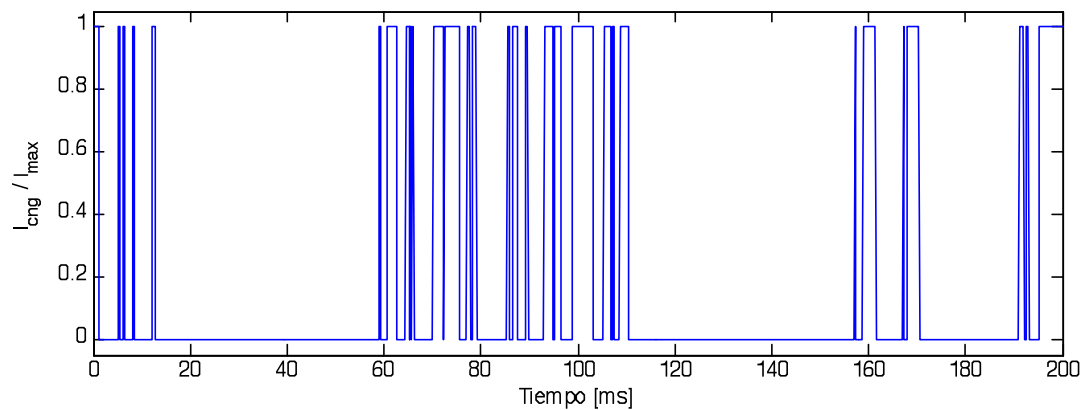


**Figura 18 . Corriente  $I_{Cl}$  de un canal individual Cl(Ca) en función del tiempo para un voltaje fijo de  $-40$  mV durante 40 ms**

Mediante un análisis estadístico con XLSTAT se ajustó el tiempo de vida del estado abierto a una función de probabilidad de tipo exponencial, obteniéndose una media de 0.812 ms.

## 5.2 Canal CNG

Similar a lo efectuado con el canal Cl(Ca), se resolvió numéricamente el modelo teórico del canal CNG (Anexos 5.3). Para una simulación de 2 s con  $3 \mu M$  de  $Ca^{2+}$  se ajustaron los parámetros de modo de obtener un tiempo duración medio de 1.2 ms para el estado abierto y de 34.4 ms para el cerrado. En el estado cerrado no se consideran los eventos de menos de 10 ms para así observar el efecto del inhibidor (5). En la Figura 19 se muestra el comportamiento del canal en los 200 ms iniciales.

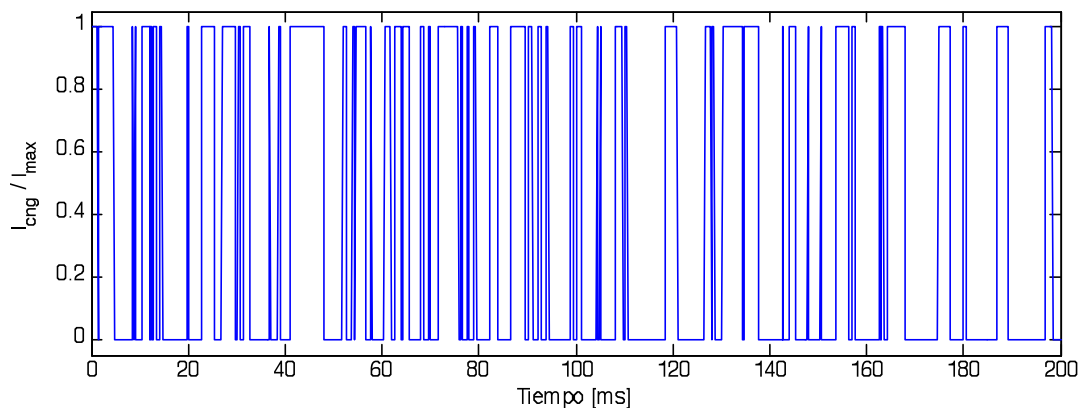


**Figura 19. Corriente normalizada del canal CNG en función del tiempo para  $3 \mu M$  de  $Ca^{2+}$**

Para una simulación de 2 segundos con  $0.1 \mu M$  de  $Ca^{2+}$  se ajustaron los parámetros para obtener un tiempo de duración medio de 1.3 ms para el estado abierto y de 1.9 ms para el cerrado, que es muy



similar lo observado experimentalmente. En este caso, para el estado cerrado, se consideraron los eventos de todo largo. En la Figura 20 se muestra el comportamiento del canal en los 200 ms iniciales.



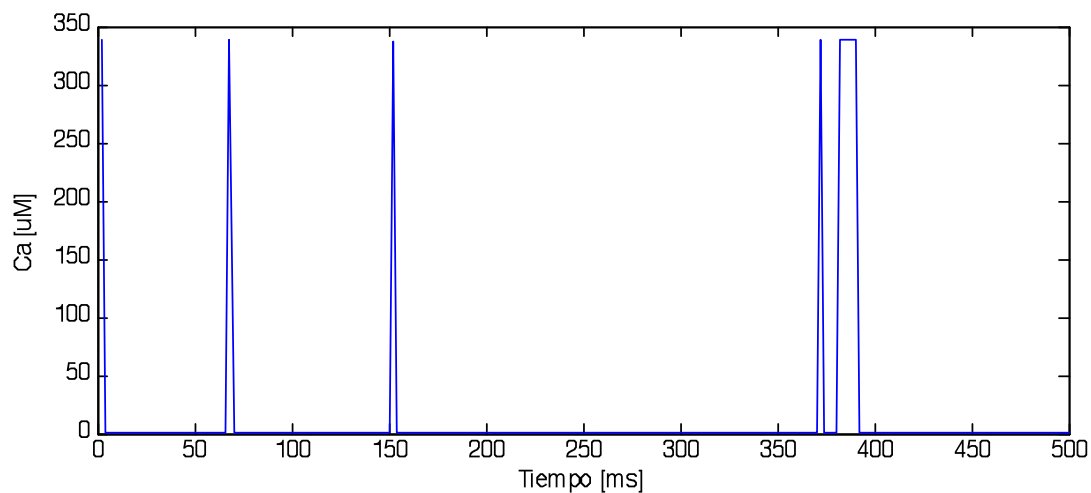
**Figura 20. Flujo normalizado del canal CNG en función del tiempo para 0.1  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$**

De esta manera, modificando los parámetros de forma adecuada, fue posible obtener valores aproximados para las constantes cinéticas del canal CNG a partir de la información bibliográfica.

### 5.3 Microdominio

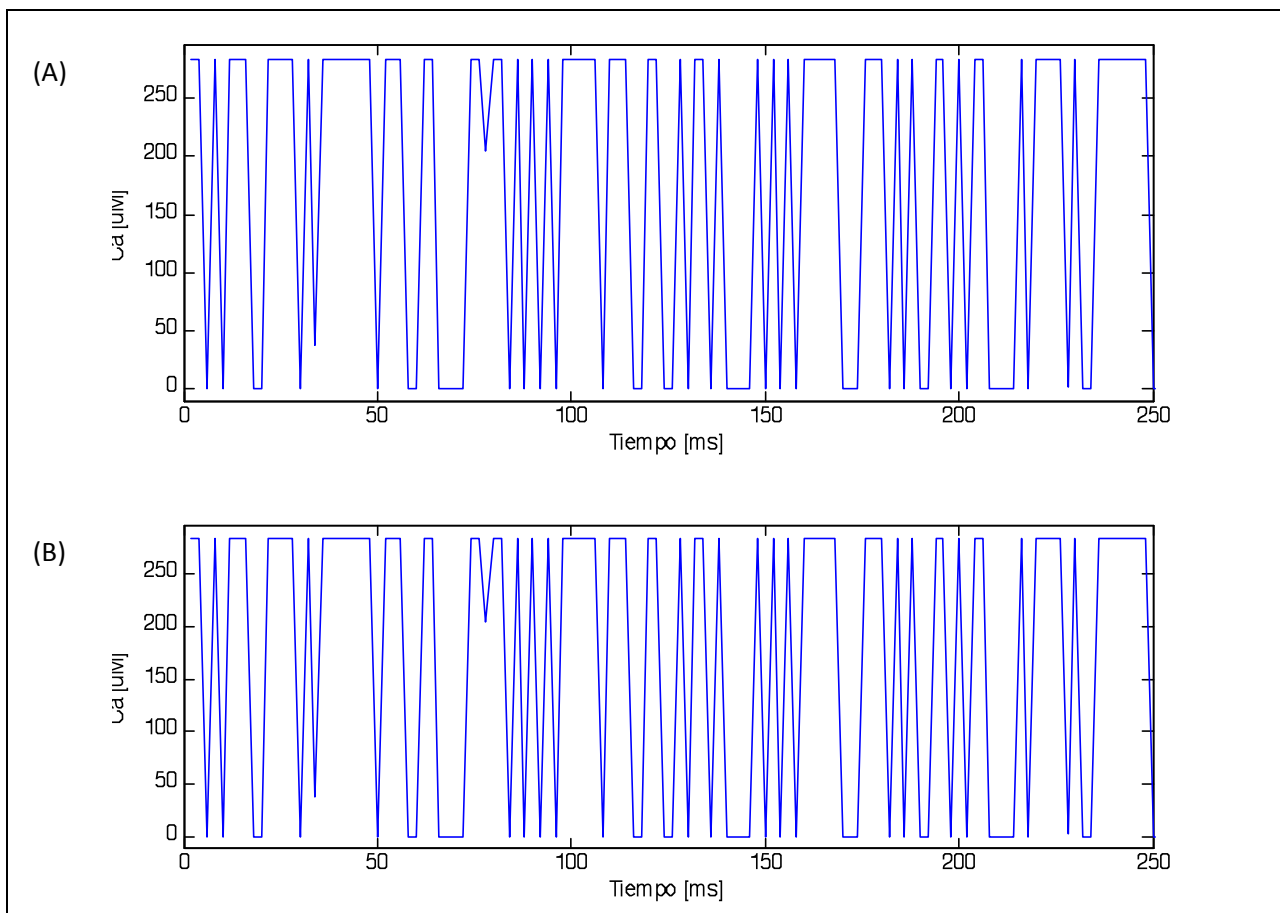
A continuación se presentan los resultados del modelo del microdominio para distintas condiciones.

En la Figura 21 se muestran las fluctuaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  para el modelo con los parámetros obtenidos o derivados a partir de la bibliografía (Tabla 1).



**Figura 21. Concentración de calcio en función del tiempo (modelo control)**

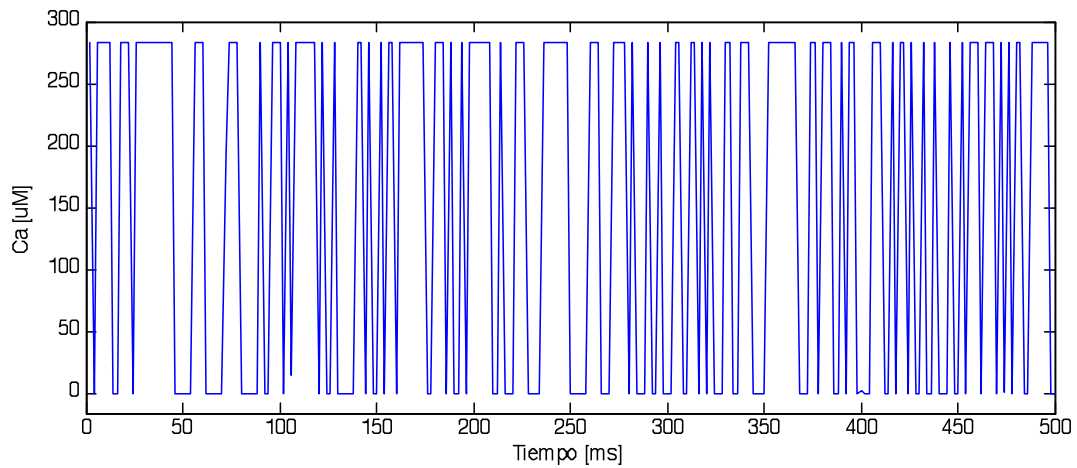
Posteriormente se modificaron los valores de algunos parámetros del modelo para. **Se utilizó un valor de la constante de transición del estado cerrado al abierto del canal CNG ( $k_{11}$ ) igual a  $4.44 \text{ ms}^{-1}$ ; y el paso del estado inhibido al cerrado ( $k_{32}$ ) se cambió a  $1.4 \text{ ms}^{-1}$** , obteniendo así resultados concordantes con las mediciones experimentales (sección 2.3). A este caso se le llamará “modelo control ajustado”. Esto ocasiona que la probabilidad de que el canal adopte el estado abierto en cada instante de tiempo aumente considerablemente, tal como se muestra en la Figura 22, donde además es posible observar la comparación entre la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y la de CaFluo (sólo esta última es posible observar experimentalmente).



**Figura 22. Fluctuaciones de la concentración de calcio modelo control (ajustado). (A) Concentración de calcio iónico en función del tiempo. (B) Concentración de CaFluo en función del tiempo.**

Para la simulación del modelo control (ajustado) se obtuvo una probabilidad de permanencia del calcio en el microdominio de 0.45 (en un 45% del tiempo total de simulación había presencia considerable de CaFluo). La concentración de calcio llega a valores cercanos a los  $300 \mu\text{M}$  en el microdominio.

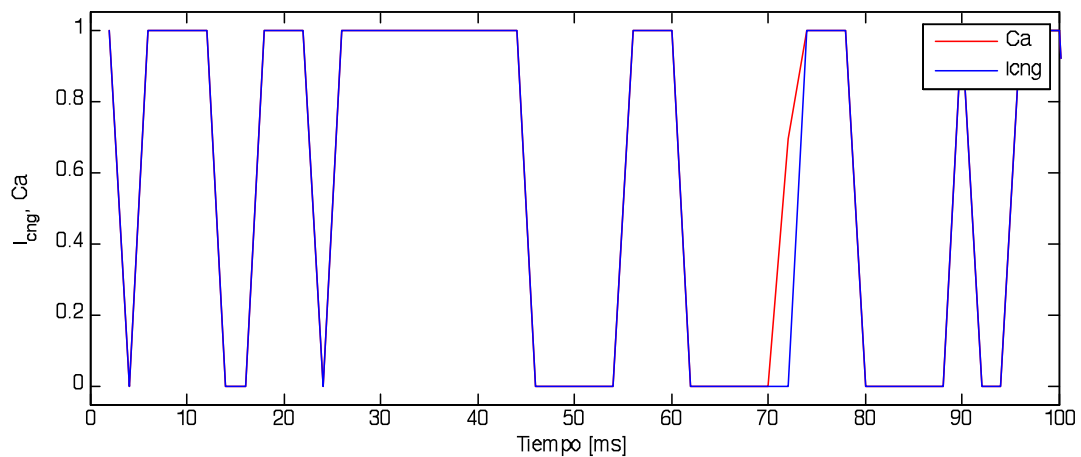
En la Figura 23 se realiza la simulación con los mismos valores que los del modelo control ajustado, pero eliminando el efecto de PMCA o NCX. Como para ambos casos se estimó el mismo valor de flujo para el transportador, los experimentos -PMCA y -NCX no tienen diferencias apreciables.



**Figura 23. Concentración de CaFluo en función del tiempo (-NCX o -PMCA).**

Así, para -PMCA y -NCX la probabilidad de encontrar concentraciones apreciables de CaFluo (cuando la fluorescencia normalizada es cercana a 1) en el microdominio fue de aproximadamente 0.48. Este valor es levemente mayor al obtenido en el modelo control ajustado.

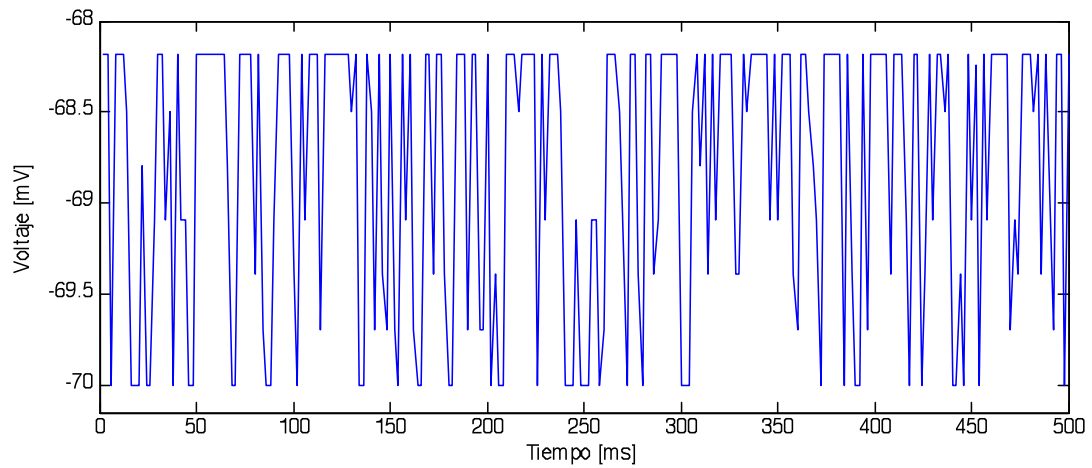
A continuación, en la Figura 24 se realiza una comparación entre la corriente en el canal CNG y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio.



**Figura 24. Comparación entre la corriente en el canal CNG y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microdominio (ambas normalizadas).**

A simple vista es posible apreciar que la concentración de calcio en el microdominio es gobernado por la corriente del canal CNG, habiendo sólo pequeñas diferencias entre estas dos variables.

Finalmente, en la Figura 25 se muestra la variación del voltaje en función del tiempo para el experimento control ajustado.



**Figura 25. Voltaje en función del tiempo para el caso control (ajustado) con 5 canales Cl(Ca).**

# Capítulo VI Discusiones

## 6.1 Modelo Teórico y Simulación

El modelo teórico que se muestra en el presente informe tiene como propósito representar un microdominio de un cilio olfatorio basándose principalmente en los resultados de J. Bacigalupo, D. Restrepo y K. Castillo (1). Los resultados obtenidos en la sección 2.3 **Error! Reference source not found.** muestran como varía el calcio en función del tiempo en puntos específicos del cilio olfatorio, siendo precisamente esto lo que el modelo numérico generado intenta replicar, considerando las principales variables del problema.

Para simular las rápidas fluctuaciones de la concentración de calcio en el microdominio se requiere considerar la apertura y cierre estocástico de los canales. Con este fin, los canales CNG y Cl(Ca) se modelaron como procesos de Markov continuos en el tiempo (18). Para ajustar el modelo teórico a los datos bibliográficos se realizaron previamente simulaciones individuales de cada uno de los canales y transportadores presentes en el cilio, teniendo así la certeza de que cada parte del modelo funciona de acuerdo a la observación experimental.

Actualmente, en la literatura, no existe demasiada información sobre la actividad de un solo transportador, ya que las técnicas para realizar un patch de tan pequeña escala (temporal y espacial) se han empezado a utilizar con mayor frecuencia en los últimos años. Esta es la razón por la cual no se pudo generar modelos estocásticos para PMCA y NCX.

### 6.1.1 Canal Cl(Ca)

Si bien para el canal Cl(Ca) se consideró un modelo bastante simple, en mediciones experimentales sin publicar realizadas por el profesor Ricardo Delgado (Departamento de Fisiología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) se ha estimado el tiempo  $\tau$  de duración del estado cerrado y abierto, observándose dos condiciones. Así, el  $\tau(\text{cerrado})$  es igual a 0.65 ms en un 76% de los casos y a 8.89 ms en un 24%. Para el estado abierto se tiene algo similar, con un  $\tau(\text{abierto})$  igual 0.74 ms en un 64% de los casos a 11.47 ms en un 36%. De ninguna manera es posible replicar las ráfagas (bursts) de apertura y cierre observadas experimentalmente con un modelo de dos estados. El hecho de que haya distintos tiempos de duración para ambos estados, sugiere una dinámica de funcionamiento más complicada para el canal Cl(Ca), posiblemente con agentes inhibidores o cooperatividad en la unión de las 2 o 3 moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  que se cree se necesitan para activar al canal. Para efectos del modelo, se consideró sólo el  $\tau(\text{abierto})$  con mayor probabilidad.  $\tau(\text{cerrado})$  se determinó de forma indirecta (Anexos, parte 3), ya que no se conocen las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  con las cuales se realizaron las mediciones experimentales.

Como los canales de Cl(Ca) que se encuentran en el microdominio aportan con más del 80% de la corriente total generada a partir de un estímulo olfatorio, éstos poseen gran importancia en las variaciones del potencial local de membrana que se puedan generar en el microdominio.

### 6.1.2 Canal CNG

La importancia del canal CNG en la dinámica del calcio es indiscutible, ya que es el principal responsable de la entrada de este ión al cilio olfatorio. El hecho de que el canal sea regulado negativamente por el calcio intracelular es el factor decisivo en la dinámica observada dentro de un microdominio. Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  con las cuales un canal CNG puede llegar a inhibirse son bastante bajas (menores a  $3 \mu\text{M}$ ), por lo que los buffers presentes en el cilio, además de los efectos difusivos, son los que permiten disminuir la concentración efectiva de calcio para que así el canal tenga una probabilidad apreciable de abrirse nuevamente en el instante de tiempo siguiente.

Para poder concordar con la observación experimental, se debió quitar el paso del estado abierto al inhibido (constante de transición  $k_2$ ), ya que esto hace a  $\tau(\text{abierto})$  dependiente de la concentración de CaM4. Teniendo en cuenta esta consideración, se prosiguió con el ajuste de los parámetros del canal CNG. El modelo replica los bursts observadas experimentalmente (5). Al igual que en Cl(Ca), se debió recurrir a  $K_{1/2}$  para ajustar las constantes cinéticas. De esta forma, el modelo más simple de inhibición replica satisfactoriamente las características del canal CNG. El modelo corrobora la observación hecha de que es posible que la inhibición por CaM4 sea alostérica competitiva con AMPc. Esto se desprende directamente del modelo markoviano descrito para el canal CNG. Si la inhibición por CaM4 fuera no competitiva, no habría sido necesario haber eliminado el paso del estado abierto al inhibido.

De esta forma, el canal Cl(Ca) afecta de gran manera la dinámica del calcio, ya que junto a la difusión son los mayores reguladores del voltaje en el microdominio.

### 6.1.3 Difusión

La difusión efectiva en el cilio, que corresponde a la acción de los buffers de calcio más el fenómeno de difusión, juega un rol muy importante en la dinámica de este ión. El modelo es muy sensible a esta variable, determinando completamente el comportamiento del microdominio. Es por esto que la concentración de los buffers de calcio posee gran importancia. La frecuencia de oscilación del canal CNG depende en gran medida de la difusión. Cuán rápida sea ésta es crítico en el modelo.

Al ser los pulsos de calcio tan localizados en el tiempo, la distancia entre los canales pasa a cobrar especial relevancia, ya que unas cuantas decenas de nanómetros pueden modificar en un orden de magnitud la concentración efectiva de calcio iónico. Sin embargo, como un modelo en EDO's no considera las variables espaciales, la aproximación lineal de la difusión sólo dependiente de la concentración de la especie a difundir puede no ser del todo acertada.

Finalmente, como hay gran presencia de buffers en el microdominio, el uso de fluo-4 (que pasa a ser un buffer más) no debiera modificar en demasía la dinámica del calcio.

## 6.2 Relación del modelo con los datos experimentales

Con respecto a las simulaciones de las fluctuaciones de calcio en el microdominio, se observa que al eliminar los transportadores involucrados en la remoción del calcio (Figura 23), el tiempo de permanencia de este en el microdominio aumenta (la probabilidad de encontrar calcio en el microdominio es mayor si se inhibe PMCA o NCX), tal como se ha verificado experimentalmente. Sin embargo, la diferencia entre las simulaciones no es tan apreciable como la observada en las mediciones experimentales. Esto sugiere que el flujo a través de NCX y PMCA puede ser mayor que el estimado, o bien dentro de un microdominio puede haber más de un transportador de cada tipo.

Por otro lado, la dinámica de apertura y cierre del canal CNG y la concentración de calcio en función del tiempo en el microdominio tienen formas similares (Figura 24). Esto indica que la cinética del canal CNG es el principal determinante de las variaciones en las señales de calcio dentro del cilio olfatorio.

Como los datos experimentales en los que se basó la resolución no dan cuenta de las concentraciones intracelulares de calcio de manera directa (sólo de la fluorescencia, conociéndose sólo una concentración aproximada de fluoróforo con la que se trabajó) y debido a la gran sensibilidad del modelo a la difusión efectiva, lograr un análisis cuantitativo más preciso requeriría de mediciones adicionales y de considerar la variable espacial en la resolución del problema. Una limitante importante en este último caso es el tiempo de resolución que tomaría la simulación numérica, ya que para la solución mediante EDO's la simulación en un computador normal demora horas.

Como se muestra en el Capítulo V, algunos parámetros de la cinética del canal CNG debieron ser modificados para obtener oscilaciones de calcio concordantes con las mediciones experimentales. Esto se puede deber a que los experimentos de canal único de CNG, al ser de casi 20 años de antigüedad, no consideraban la concentración de CaM como factor en la regulación negativa del canal (5).

## 6.3 Posibles aplicaciones

A partir del modelo propuesto, y teniendo conocimiento previo de las características de los principales canales iónicos involucrados en la dinámica del calcio, es posible determinar las constantes cinéticas de un canal utilizando una combinación entre los análisis para canales individuales y los valores de las corrientes macroscópicas provocadas por una gran cantidad de éstos. Lo anterior se debe a que el problema para  $n$  canales es lineal, ya que cada canal por separado se considera independiente de la

acción de los demás. Esta determinación de parámetros se puede realizar de forma iterativa si es que se modifican adecuadamente los programas diseñados (Anexos 5).

Como el ruido aparece naturalmente con el tratamiento estocástico de los canales iónicos, el presente modelo también puede aportar significativamente en análisis de este tipo.

Por último, es necesario recalcar el hecho de que las concentraciones de calcio sean tan puntuales en el cilio (espacial y temporalmente hablando) ayuda a que un modelo en EDO's adquiera gran validez.

## **6.4 Mejoras y otras consideraciones**

Como el modelo del microdominio descrito en este informe tiene como principal aplicación lograr explicar de manera más robusta algunos de los fenómenos observados en (1), en donde el AMPc se libera de manera instantánea a través de la excitación con luz ultravioleta, no se consideró la cascada previa, desde la llegada del odorante y activación de la proteína G, hasta la dinámica de formación de AMPc. Considerar estos pasos anteriores puede generar mayores aplicaciones al modelo, tales como el comportamiento del microdominio frente a estímulos de odorantes de distinto tipo (por ejemplo, pulsos o escalones).

Lo más lógico para un modelo más acucioso del microdominio es continuar con modelo en dos dimensiones espaciales, representando la membrana como un plano. Tres dimensiones espaciales no debería otorgar mucha información adicional ya que la mayoría de los procesos ocurren en la membrana y la difusión hacia el centro del cilio no parece afectar en demasía lo que acaece en el borde de este (no se ha considerado la presencia de corrientes de convección al interior del cilio). Con un modelo en dos dimensiones es posible generar un algoritmo que permita identificar las distancias promedio entre los transportadores o la distribución de estos dentro del cilio olfatorio.



## Capítulo VII Conclusión

El trabajo realizado en la presente memoria de título tuvo como objetivo fundamental replicar las observaciones experimentales sobre las fluctuaciones de calcio en el cilio olfatorio (1). Realizando un modelo hipotético que involucró los principales componentes y efectos que podrían aparecer en un microdominio, se llega a resultados cualitativos de gran similitud entre el modelo teórico en que están basadas las simulaciones y los datos experimentales.

El modelo es muy sensible a las constantes cinéticas de los canales y a la constante de difusión  $D_{Ca}$ . Modificando estas variables de manera apropiada dentro de los rangos permisibles fue posible llegar a valores cuantitativos que se encuentran dentro del rango de lo observado experimentalmente.

Si bien, el modelo propuesto no considera las variables espaciales dentro del cilio olfatorio en detalle, este responde apropiadamente como primera aproximación a la dinámica del calcio intracelular, sugiriendo de manera inequívoca que en un microdominio hay presencia de canales CNG que interactúan con las demás variables del sistema propuesto.

Se observó claramente que el principal modulador de las señales de calcio en el microdominio es el canal CNG, existiendo una dependencia directa entre la probabilidad de apertura del canal y la concentración intracelular de calcio.

De esta manera, el presente modelo es claramente un primer estudio teórico de la dinámica del calcio en los microdominios del cilio olfatorio, teniendo como principal ventaja la consideración de la componente estocástica de los canales iónicos involucrados en este proceso.

## Referencias

1. K. Castillo, D. Restrepo and J. Bacigalupo (2010) *Ca<sup>2+</sup> Microdomain in Olfactory Cilia Support Low Signalling Amplification of Olfactory Transduction*. European Journal of Neuroscience .
2. B. Sakmann and E. Neher. *Single-Channel Recording*. Plenum Press, 1995.
3. Bruce Alberts. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, Fourth Edition, 2002.
4. Frank Zufall, Stuart Firestein, and Gordon Shepherd (1991) *Analysis of single cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor cells*. The Journal of Neuroscience, 11, 3573-3580.
5. Frank Zufall et al (1991) *Inhibition of the olfactory cyclic nucleotide gated ion channel by intracellular calcium*. Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences, 246, 225-230.
6. J. Reisert, P.J. Bauer, K.W. Yau and S. Frings (2003) *The Ca-activated Cl Channel and its Control in Rat Olfactory Receptor Neurons*. J of Gen Physiology 122, 349-363
7. Jianfeng Feng. *Computational neuroscience: a comprehensive approach*. Chapman and Hall/CRC, 2004.
8. K. Castillo, D. Restrepo and J. Bacigalupo (2007) *Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase in the cilia of olfactory receptor neurons: possible role in Ca<sup>2+</sup> clearance*. European Journal of Neuroscience, 26, 2524-2531.
9. D. Eisner and W. Lederer (1985) *Na-Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity*. Journal of Physiology, 248, 189-202.
10. Mohammad Naraghi and Erwin Neher (1997) *Linearized Buffered Ca<sup>2+</sup> Diffusion in Microdomains and Its Implications for Calculation of [Ca<sup>2+</sup>] at the Mouth of a Calcium Channel*. The Journal of Neuroscience, 17, 6961-6973.
11. K. R. Gee, K. A. Brown, W-N. U. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray and I. Johnson (2000) *Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup> indicator dyes*. Cell Calcium, 27, 97-108.
12. Angelo Demuro and Ian Parker (2006) *Imaging single-channel calcium microdomains*. Cell Calcium, 40, 413-422.
13. J. Reidl, P. Borowsky, A. Senses, J. Starke, M. Zapotocky and M. Eiswirth (2006) *Model of Calcium Oscillations Due to Negative Feedback in Olfactory Cilia*. Biophysical Journal, 90, 1147-1155.
14. C. R. Weber, K. S. Ginsburg, K. D. Philipson, T. R. Shannon and D. M. Bers (2001) *Allosteric Regulation of Na/Ca Exchange Current by Cytosolic Ca*. Journal of Gen. Physiology, 117, 119-131.
15. B. Hille. *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, 1992.

16. D. P. Dougherty, G.A. Wright and A.C. Yew (2005) *Computational model of the cAMP-mediated sensory response and calcium-dependent adaptation in vertebrate olfactory receptor neurons*. PNAS, 102, 10415-10420.
17. D. Schild And D. Restrepo (1998) *Transduction Mechanisms in Vertebrate Olfactory Receptor Cells*. Vol. 78, 429-466.
18. Christopher P. Fall. *Computational Cell Biology*. Springer, 2002.
19. Badamdorj, Dorjsuren (2008) *Identification of Cl(Ca) channel distributions in olfactory cilia*. Math. Meth. Appl. Sci, 31, 1860-1873.
20. Steven J. Kleene and Robert C. Gesteland (1991) *Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia*. The Journal of Neuroscience , 11, 3624-3629.
21. Johannes Reisert and H.R. Matthews (1998) *Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> Extrusion Governs Response Recovery in Frog Olfactory Receptor Cells*. J. gen. Physiology, 112, 529-535.
22. Jos A. COX (1988) *Interactive properties of calmodulin*. Biochemistry Journal, 249, 621-629.
23. J. White, T. Rubinstein and A. Kay (2000) *Channel Noise in Neurons*. Trends in Neuroscience, 23, 131-137.

# Anexos

## 1. Flujo máximo promedio de la bomba PMCA

Una proteína PMCA tiene un peso de 130 kDa, entonces

$$1 [\mu g \text{ de prot}] = 130 [kDa] \times n = 130000 \times 1.66 \times 10^{-18} [\mu g] \times n$$
$$\Rightarrow n = 4.63 \times 10^{12}$$

Donde n es el número de proteínas por  $\mu g$ . Luego, el flujo máximo promedio unitario de la bomba PMCA es (8):

$$J_{max} = \frac{330 [\mu mol Ca^{2+}]}{[min] \times [\mu g \text{ de prot}] \times vol [L]} = \frac{330 \times 10^{-8} [\mu mol Ca^{2+}]}{6 \times 10^4 [ms] \times 4.63 \times 10^{12} \times 10^{-18} [L]} = 1.2 \left[ \frac{\mu M}{ms} \right]$$

Como la masa de proteínas no se encuentra en peso seco, el valor de flujo está subestimado.

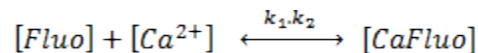
Por otro lado, se sabe que el flujo estimado de una bomba es de aproximadamente  $10^3$  iones por segundo. Realizando la conversión a  $\mu M/ms$ :

$$J_{max} = 10^3 \left[ \frac{i\acute{o}n}{s} \right] = \frac{1}{6.02 \times 10^{23}} \left[ \frac{mol}{ms} \right] = 1.66 \left[ \frac{\mu M}{ms} \right]$$

Este ultimo valor es que se utilizará como referencia.

## 2. Cinética del Fluoróforo Fluo4

Supongamos para el Fluoróforo una cinética del tipo



En estado estacionario (e.e.) las velocidades de creación y extinción del compuesto CaFluo son las mismas, luego:

$$\frac{d[CaFluo]}{dt} = k_1[Fluo][Ca^{2+}] - k_2[CaFluo] = 0$$

$$\Rightarrow [CaFluo] = K[Fluo][Ca^{2+}]$$

$$\text{Con } K = \frac{k_1}{k_2}$$

Por otro lado, la ecuación de conservación del fluoróforo es:

$$[Fluo]_{tot} = [Fluo] + [CaFluo]$$

Por lo que la ecuación anterior queda:

$$K [CaFluo] = ([Fluo]_{tot} - [CaFluo])[Ca^{2+}]$$

Finalmente, reordenando los términos:

$$[CaFluo] = \frac{[Fluo]_{tot} [Ca^{2+}]}{K + [Ca^{2+}]}$$

### 3. Ajuste parámetros Cl(Ca)

Como '*tiempo promedio del estado abierto*' =  $1/k_{52}$ , entonces

$$k_{52} = \frac{1}{0,74} [ms^{-1}]$$

La determinación del valor de  $k_{51}$  no es tan directo debido a que

$$'tiempo de vida promedio del estado cerrado' = 1/(k_{51}[Ca^{2+}]^3)$$

por lo que  $k_{51}$  depende de la concentración de calcio en el medio. Sin embargo, utilizando la información de la Figura 12, y como

$$(K_{1/2})^3 = \frac{k_{52}}{k_{51}}$$

Finalmente,

$$k_{51} = \frac{k_{52}}{(K_{1/2})^3}$$

#### 4. Volumen del microdominio

Para el volumen donde el calcio que entra por el canal CNG se distribuye uniformemente se considera una semiesfera de radio igual a 100 nm. Luego

$$vol = \frac{4\pi r^3}{6} = 2.09 * 10^{-18} [L]$$

#### 5. Programas utilizados

A continuación, se presentan los programas en MATLAB utilizados para obtener los Resultados (Capítulo V)

##### 5.1. Canal Cl(Ca)

Este programa modela el comportamiento del canal Cl(Ca) para un Voltaje y concentración de Ca<sup>2+</sup> fijos (a elección).

---

```
time = 50;           %Tiempo total [ms]
dt = 0.001;         %[ms]
n = time/dt;
delta = 0.1;        %Resolución temporal [ms]

n_canales_cl = 1;   %Número de canales Cl

mean_open = 0.742; %Tiempo promedio de apertura [ms]
n_cl = 3;
k52 = 1/0.742;
k51 = k52/(2.1)^n_cl;
g_cl = 0.043;       %Capacitancia [nS]
Vcl = 0;            %Voltaje de reversa [mV]
V = -40;            %Voltaje de la membrana [mV]
Ca = 2;             %Concentracion intracelular de ión calcio [uM]

Pc_cl = zeros(n_canales_cl,n); %Probabilidad de encontrar Cl en estado
CLOSE
Po_cl = zeros(n_canales_cl,n); %Probabilidad de encontrar Cl en estado OPEN
Icl = zeros(1,n);      %Corriente de Cl [pA]
f_cl = zeros(1,n_canales_cl);
Icl_tot = 0;

for i=1:n-1

for j=1:n_canales_cl
    Po_cl(j,1)=1;
    Qcl=[ 1-k51*Ca^n_cl*dt      k52*dt      ;
          k51*Ca^n_cl*dt      1-k52*dt ];
    Pt_cl=Qcl*[ Pc_cl(j,i) ; Po_cl(j,i) ];
    f_cl(j) = random('unif',0,1);
```

---

---

```

    if f_cl(j) > Pt_cl(1)
        f_cl(j)      = g_cl;
        Po_cl(j,i+1) = 1;
        Pc_cl(j,i+1) = 0;
    else
        f_cl(j)      = 0;
        Po_cl(j,i+1) = 0;
        Pc_cl(j,i+1) = 1;
    end
end

Icl(i+1) = f_cl*(Vcl-V)*ones(1,n_canales_cl)';
Icl_tot = Icl(i+1)+Icl_tot;

end

Icl_tot = Icl_tot/n

F(1) = figure;
figure(F(1));
plot(delta:delta:time,Icl(1,delta/dt:delta/dt:n)); %Gráfico Icl v/s tiempo
xlabel('tiempo [ms]');
ylabel('I_c_l [uM]');

```

---

## 5.2. Icl v/s Ca

---

```
time = 10;           %Tiempo total [ms]
dt = 0.005;         %[ms]
n = time/dt;
delta = 0.1;        %Resolución temporal [ms]

n_canales_cl = 10;  %Número de canales Cl
n_cl = 3;
k52 = 1/0.742;
k51 = k52/(2.1)^n_cl;
g_cl = 4.3;         %Capacitancia [nS]
Vcl = 0;           %Voltaje de reversa [mV]
V = -40;           %Voltaje de la membrana [mV]

Pc_cl = zeros(n_canales_cl,n); %Probabilidad de encontrar Cl en estado
CLOSE
Po_cl = zeros(n_canales_cl,n); %Probabilidad de encontrar Cl en estado OPEN
Icl = zeros(1,n);    %Corriente de Cl [pA]
f_cl = zeros(1,n_canales_cl);
Ca = zeros(1,100);
Icl_tot = zeros(1,100);

for k=1:100

    Ca(k) = k*2/25;    %Concentracion intracelular de ión calcio [uM]

    for i=1:n-1

        for j=1:n_canales_cl
            Po_cl(j,1)=1;
            Qcl=[ 1-k51*Ca(k)^n_cl*dt      k52*dt      ;
                  k51*Ca(k)^n_cl*dt      1-k52*dt ];
            Pt_cl=Qcl*[ Pc_cl(j,i) ; Po_cl(j,i) ];
            f_cl(j) = random('unif',0,1);

            if f_cl(j) > Pt_cl(1)
                f_cl(j) = g_cl;
                Po_cl(j,i+1) = 1;
                Pc_cl(j,i+1) = 0;
            else
                f_cl(j) = 0;
                Po_cl(j,i+1) = 0;
                Pc_cl(j,i+1) = 1;
            end
        end

        Icl(i+1) = f_cl*(Vcl-V)*ones(1,n_canales_cl)';
        Icl_tot(k) = Icl(i+1)+Icl_tot(k);

    end

    Icl_tot(k) = Icl_tot(k)/n;
end

F(1) = figure;
```

---



---

```
figure(F(1));  
plot(Ca(1,1:1:100),Icl_tot(1,1:1:100)); %Gráfico Icl v/s Ca  
xlabel('Ca [uM]');  
ylabel('Icl total');  
  
Icl_tot=Icl_tot';  
Ca=Ca';
```

---

### 5.3. Canal CNG

---

```
tiempo = 200;           %[ms]
dt      = 0.01;        %[ms]
n       = tiempo/dt;
delta  = 0.1;         %Resolución temporal [ms]

Pc_cng  = zeros(1,n);
Po_cng  = zeros(1,n);
Pi_cng  = zeros(1,n);
Pt1_cng = zeros(1,n);
Pt2_cng = zeros(1,n);
Pt3_cng = zeros(1,n);
Icng_tot = zeros(1,50);
Icng     = zeros(1,n); %Corriente CNG [pA]
Jcng     = zeros(1,n); %Flujo CNG [uM/ms]

CaMtot = 2;           %[uM]
Vcng    = 0;          %[mV]
g_cng   = 46*10^(-3); %Conductancia CNG [nS]
frac_Ca = 0.7;        %Porcentaje de ión Ca en la corriente CNG
F       = 9.648*10^(10); %Cte de Faraday [pC/uM]
vol     = 4*3.14/6*100^3*10^(-24); %Volumen considerado [L] (valor al cubo en
[nm])
k11     = 1/1.8;       %[1/ms]
k12     = 1/1.27;     %[1/ms]
k2      = 0;          %[1/(ms*uM)]
k31     = 2.8;        %[1/(ms*uM)]
k32     = 3.6*10^(-2); %[1/ms]
k41     = 1.1*10^(-6); %[1/(ms*uM^2)]
k42     = 2.5*10^(-3); %[1/ms]

V       = -70; %[mV]
Po_cng(1) = 1; %CNG se encuentra en estado OPEN en t=0
Ca_max = 0;
Ca=.1;
CaM4=Ca^2*CaMtot/(Ca^2+k42/k41);

for i = 1:1:n-1
    Qcng = [1-(k11+k31*CaM4)*dt      k12*dt          k32*dt ;
            k11*dt                  1-(k12+k2*CaM4)*dt  0 ;
            k31*CaM4*dt            k2*CaM4*dt       1-k32*dt];
    f_cng = random('unif',0,1);
    Pt_cng = Qcng*[Pc_cng(i);Po_cng(i);Pi_cng(i)];
    Pt1_cng(i+1)=Pt_cng(1);
    Pt2_cng(i+1)=Pt_cng(2);
    Pt3_cng(i+1)=Pt_cng(3);

    %para el canal CNG
    if f_cng > Pt_cng(1) && f_cng <= Pt_cng(1)+Pt_cng(2)
        f_cng = g_cng;
        Po_cng(i+1) = 1;
        Pc_cng(i+1) = 0;
        Pi_cng(i+1) = 0;
    else
        if f_cng <= Pt_cng(1)
            f_cng = 0;
        end
    end
end
```

---

---

```

        Po_cng(i+1) = 0;
        Pc_cng(i+1) = 1;
        Pi_cng(i+1) = 0;
    else
        f_cng      = 0;
        Po_cng(i+1) = 0;
        Pc_cng(i+1) = 0;
        Pi_cng(i+1) = 1;
    end
end

Icng(i) = f_cng*(Vcng-V); %Corriente en CNG [pA]
Jcng(i) = 10^(-3)*Icng(i)*frac_Ca/(2*F*vol);

end

j=1;
closed_time=zeros(1,1000);

for i=delta/dt:n
    if Icng(i)==0 && Icng(i-1)==0
        closed_time(j) = closed_time(j)+1;
    else
        if Icng(i)==0 && Icng(i-1)>0
            j=j+1;
        end
    end
end

over10ms = 0;
mean_closed = 0;

for k=1:1000
    if closed_time(k)*dt>10 %0
        mean_closed = mean_closed+closed_time(k);
        over10ms = over10ms+1;
    end
end

mean_closed = mean_closed*dt/(over10ms)
j2=1;
open_time = zeros(1,1000);
for i=delta/dt:n
    if Icng(i)>0 && Icng(i-1)>0
        open_time(j2)= open_time(j2)+1;
    else
        if Icng(i)>0 && Icng(i-1)==0
            j2=j2+1;
        end
    end
end

mean_open=0;

for k=1:1000
    mean_open = mean_open+open_time(k);
end

```

---

---

```
mean_open = mean_open*dt/j2
```

```
F(1) = figure;  
figure(F(1));  
plot(delta:delta:tiempo,Po_cng(1,delta/dt:delta/dt:n));  
xlabel('Tiempo [ms]');  
ylabel('I_c_n_g / I_m_a_x');
```

---

## 5.4. I<sub>cng</sub> v/s Ca

---

```

tiempo = 200;          %[ms]
dt      = 0.01;       %[ms]
n       = tiempo/dt;
delta   = 0.1;       %Resolución temporal [ms]

Pc_cng  = zeros(1,n);
Po_cng  = zeros(1,n);
Pi_cng  = zeros(1,n);
Pt1_cng = zeros(1,n);
Pt2_cng = zeros(1,n);
Pt3_cng = zeros(1,n);
Ca       = zeros(1,50); %Concentración de Calcio
CaM4     = zeros(1,50); %Concentración de Calcio-calmodulina
Icng_tot = zeros(1,50);
Icng     = zeros(1,n); %Corriente CNG [pA]
Jcng     = zeros(1,n); %Flujo CNG [uM/ms]

CaMtot = 20;          %[uM]
Vcng    = 0;          %[mV]
g_cng   = 46*10^(-3); %Conductancia CNG [nS]
frac_Ca = 0.7;        %Porcentaje de ión Ca en la corriente CNG
F       = 9.648*10^(10); %Cte de Faraday [pC/uM]
vol     = 4*3.14/6*100^3*10^(-24); %Volumen considerado [L] (valor al cubo en
[nm]
k11     = 1/1.8;       %[1/ms]
k12     = 1/1.27;     %[1/ms]
k2      = 0;          %[1/(ms*uM)]
k31     = 2.8;        %[1/(ms*uM)]
k32     = 0.02*k31;   %[1/ms]
k41     = 1.1*10^(-6); %[1/(ms*uM^2)]
k42     = 2.5*10^(-3); %[1/ms]

V       = -70;        %[mV]
Po_cng(1) = 1; %CNG se encuentra en estado OPEN en t=0
Ca_max = 0;

for k = 1:50
Ca(k)    = 3*k/50;
CaM4(k) = Ca(k)^2*CaMtot/(Ca(k)^2+k42/k41);

for i = 1:1:n-1
Qcng = [1-(k11+k31*CaM4(k))*dt      k12*dt      k32*dt ;
        k11*dt                      1-(k12+k2*CaM4(k))*dt  0      ;
        k31*CaM4(k)*dt              k2*CaM4(k)*dt      1-k32*dt];
f_cng = random('unif',0,1);
Pt_cng = Qcng*[Pc_cng(i);Po_cng(i);Pi_cng(i)];
Pt1_cng(i+1)=Pt_cng(1);
Pt2_cng(i+1)=Pt_cng(2);
Pt3_cng(i+1)=Pt_cng(3);

if f_cng > Pt_cng(1) && f_cng <= Pt_cng(1)+Pt_cng(2)
f_cng      = g_cng;
Po_cng(i+1) = 1;
Pc_cng(i+1) = 0;

```

---

---

```

        Pi_cng(i+1) = 0;
    else
        if f_cng <= Pt_cng(1)
            f_cng      = 0;
            Po_cng(i+1) = 0;
            Pc_cng(i+1) = 1;
            Pi_cng(i+1) = 0;
        else
            f_cng      = 0;
            Po_cng(i+1) = 0;
            Pc_cng(i+1) = 0;
            Pi_cng(i+1) = 1;
        end
    end

    end

    Icng(i)    = f_cng*(Vcng-V); %Corriente en CNG [pA]
    Jcng(i)    = 10^(-3)*Icng(i)*frac_Ca/(2*F*vol);
    Icng_tot(k) = Icng(i)+Icng_tot(k);

end

Icng_tot(k) = Icng_tot(k)/n;
end

F(1) = figure; %Concentración de Calcio en función del tiempo
figure(F(1));
plot(Ca(1,1:1:50),Icng_tot(1,1:1:50)); %Gráfico Icl v/s tiempo
xlabel('Ca [uM]');
ylabel('Icng total');

```

---

## 5.5. Modelo Microdominio

---

```

tiempo = 500;           %[ms]
dt      = .0001;       %[ms]
n       = tiempo/dt;
delta   = 2;           %Resolución temporal [ms]

n_canales_cl = 5;      %nro de canales de Cl

Ca       = zeros(1,n); %Concentración de Calcio [uM]
CaFluo   = zeros(1,n); %Concentración de complejo Calcio-fluoróforo [uM]
CaM4     = zeros(1,n); %Concentración de Calcio-calmodulina
Pc_cng   = zeros(1,n); %Probabilidad de encontrar CNG en estado Closed
Po_cng   = zeros(1,n); %Probabilidad de encontrar CNG en estado Open
Pi_cng   = zeros(1,n); %Probabilidad de encontrar CNG en estado Inhibited
Pt1_cng  = zeros(1,n);
Pt2_cng  = zeros(1,n);
Pt3_cng  = zeros(1,n);
Pc_cl    = zeros(n_canales_cl,n); %Probabilidad de encontrar Cl(Ca) en
estado Closed
Po_cl    = zeros(n_canales_cl,n); %Probabilidad de encontrar Cl(Ca) en
estado Open
Pt1_cl   = zeros(n_canales_cl,n);
Pt2_cl   = zeros(n_canales_cl,n);
V        = zeros(1,n); %Voltaje [mV]
Icng     = zeros(1,n); %Corriente CNG [pA]
Jcng     = zeros(1,n);
Icl      = zeros(1,n); %Corriente Cl(Ca) [pA]
Idif     = zeros(1,n); %Corriente de difusión [pA]

Dca      = 300;         %Constante de difusión [1/ms]
CaMtot   = 2;          %[uM]
Fluo_tot = 10;         %[uM]
Vcng     = 0;          %[mV]
Vcl      = 0;          %[mV]

Vdif     = -70;        %[mV]
cap      = 1*10^(-3); %5*10^(-3); %capacitancia de la membrana [nF]
g_cng    = 46*10^(-3); %Conductancia CNG [nS]
g_cl     = 0.043;
g_dif    = 9.8;
frac_Ca  = 0.7;        %Porcentaje de ión Ca en la corriente CNG
F        = 9.648*10^(10); %Cte de Faraday [pC/uM]
vol      = 4*3.14/6*40^3*10^(-24); %Volumen considerado [L] (valor al cubo en
[nm]
Jpmca_max = 0;%100/(6.02*10^(23))/vol; %[uM/ms]
Jncx_max  = 1/(6.02*10^(23-6))/vol; %[uM/ms]
n_ncx    = 1;
n_cl     = 2;
alpha    = 0.08;
Ksat     = 0.01;
nu       = 0.02;
gamma    = 3.38;
Kncx     = 6.3;
Kpmca    = 0.67;
k11      = 8/1.8;      %[1/ms]
k12      = 1/1.27;    %[1/ms]

```

---

---

```

k2      = 0;                % [1/(ms*uM)]
k31     = 2.8;             % [1/(ms*uM)]
k32     = .5*k31;         % [1/ms]
k41     = 1.1*10^(-6);    % [1/(ms*uM^2)]
k42     = 2.5*10^(-3);    % [1/ms]
Kfluo   = 0.3;            % [uM]
k52     = 1/0.742;        % [1/ms]
k51     = k52/(2.1)^n_cl; % [1/(ms*uM)]

V(1)    = -70;            % [mV]
Pc_cng(1) = 1;           % CNG se encuentra en estado OPEN en t=0
Ca_max  = 0;

for i = 1:1:n-1

    Qcng = [1-(k11+k31*CaM4(i))*dt    k12*dt    k32*dt ;
            k11*dt                    1-(k12+k2*CaM4(i))*dt    0 ;
            k31*CaM4(i)*dt           k2*CaM4(i)*dt    1-k32*dt];
    f_cng = random('unif',0,1);
    Pt_cng = Qcng*[Pc_cng(i);Po_cng(i);Pi_cng(i)];
    Pt1_cng(i+1)=Pt_cng(1);
    Pt2_cng(i+1)=Pt_cng(2);
    Pt3_cng(i+1)=Pt_cng(3);

    %para el canal CNG
    if f_cng > Pt_cng(1) && f_cng <= Pt_cng(1)+Pt_cng(2)
        f_cng = g_cng;
        Po_cng(i+1) = 1;
        Pc_cng(i+1) = 0;
        Pi_cng(i+1) = 0;
    else
        if f_cng <= Pt_cng(1)
            f_cng = 0;
            Po_cng(i+1) = 0;
            Pc_cng(i+1) = 1;
            Pi_cng(i+1) = 0;
        else
            f_cng = 0;
            Po_cng(i+1) = 0;
            Pc_cng(i+1) = 0;
            Pi_cng(i+1) = 1;
        end
    end
end

%para el canal Cl(Ca)
f_cl=zeros(1,n_canales_cl);

for j=1:n_canales_cl

    Qcl=[1-k51*Ca(i)^n_cl*dt    k52*dt ;
          k51*Ca(i)^n_cl*dt    1-k52*dt];
    Pt_cl=Qcl*[Pc_cl(j,i);Po_cl(j,i)];
    f_cl(j) = random('unif',0,1);
    Pt1_cl(j,i+1)=Pt_cl(1);
    Pt2_cl(j,i+1)=Pt_cl(2);

```

---



---

```

        if f_cl(j) > Pt_cl(1)
            f_cl(j) = g_cl;
            Po_cl(j,i+1) = 1;
            Pc_cl(j,i+1) = 0;
        else
            f_cl(j) = 0;
            Po_cl(j,i+1) = 0;
            Pc_cl(j,i+1) = 1;
        end
    end
end

Icng(i) = f_cng*(Vcng-V(i));
Icl(i) = f_cl*(Vcl-V(i))*ones(1,n_canales_cl)';
Idif(i) = g_dif*(Vdif-V(i));
Jcng(i) = 10^(-3)*Icng(i)*frac_Ca/(2*F*vol);
Jpmca = Jpmca_max*Ca(i)^2/(Ca(i)^2+Kpmca^2);
%Jncx = Jncx_max*Ca(i)^n_ncx/(Ca(i)^n_ncx+Kncx^n_ncx)*(Ca(i)*exp((nu-
1)*0.039*V)-alpha*exp(nu*0.039*V))/((1+gamma*Ca(i))*(1+Ksat*exp((nu-
1)*0.039*V)));

CaM4(i+1) = CaM4(i)+dt*(k41*Ca(i)^2*(CaMtot-CaM4(i))-k42*CaM4(i));
Ca(i+1) = Ca(i)+dt*(Jcng(i)-Jpmca-Dca*Ca(i)-4*k41*Ca(i)^2*(CaMtot-
CaM4(i))+4*k42*CaM4(i));
CaFluo(i+1) = Ca(i)*Fluo_tot/(Kfluo+Ca(i));
V(i+1) = V(i)+dt/cap*(Icng(i)+Icl(i)+Idif(i));

if Ca_max < Ca(i+1)
    Ca_max = Ca(i+1);
end

end

Ptv_cng = [Pt1_cng;Pt2_cng;Pt3_cng];
P_cng = 0;

for i=delta/dt:delta/dt:n

    if Ca(i)/Ca_max > 0.5
        P_cng=P_cng+1;
    end
end

P_cng = P_cng/(tiempo/delta)
P_t_cng = [Pc_cng;Po_cng;Pi_cng];

%GRÁFICOS
G(1) = figure; %Concentración de Calcio en función del tiempo
figure(G(1));
plot(delta:delta:tiempo,Ca(1,delta/dt:delta/dt:n));
xlabel('Tiempo [ms]');
ylabel('Ca [uM]');

G(2) = figure; %Voltaje en función del tiempo
figure(G(2));
plot(delta:delta:tiempo,V(1,delta/dt:delta/dt:n));
xlabel('Tiempo [ms]');
ylabel('Voltaje [mV]');

```

---

---

```
G(3) = figure; %Concentración de Calcio unido a fluoróforo en función del
tiempo
figure(G(3));
plot(delta:delta:tiempo, (CaFluo(1,delta/dt:delta/dt:n)));%/Fluo_tot);
xlabel('Tiempo [ms]');
ylabel('CaFluo [uM]');

G(4) = figure; %Probabilidad de encontrar el canal CNG en estado OPEN en
función del tiempo
figure(G(4));
plot(delta:delta:tiempo,Po_cng(1,delta/dt:delta/dt:n));
xlabel('Tiempo [ms]');
ylabel('Po_cng');

G(5) = figure; %Comparación entre Ca y Po en función del tiempo
figure(G(5));
plot(delta:delta:tiempo,Ca(1,delta/dt:delta/dt:n)/Ca_max,'r');
hold on
plot(delta:delta:tiempo,Po_cng(1,delta/dt:delta/dt:n));
hold off
xlabel('Tiempo [ms]');
ylabel('I_c_n_g, Ca');
```

---