



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina
Escuela de Ingenierías Industriales

Grado en Ingeniería Biomédica

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Estudio de la dinámica del potencial de
membrana y el Ca^{2+} intracelular en el músculo
liso vascular**

AUTOR:

Alejandra Valle López

TUTORES:

José Ramón López López

Ana Portillo de la Fuente

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Matemática Aplicada

Curso: 2022-2023

TÍTULO: Estudio de la dinámica del potencial de membrana y el Ca²⁺ intracelular en el músculo liso vascular

TITLE: Study of the dynamics of membrane potential and intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle

AUTOR: D.^a Alejandra Valle López

TUTORES: D. José Ramón López López
D.^a Ana Portillo de la Fuente

DEPARTAMENTOS: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Matemática Aplicada

TRIBUNAL

PRESIDENTE: D. José Ramón López López

SECRETARIO: D.^a M^a Teresa Alonso Alonso

VOCAL: D.^a María Teresa Pérez Rodríguez

SUPLENTE: D.^a Ángela Barbero Díez

SUPLENTE: D.^a Pilar Ciudad Velasco

FECHA: 2023

CALIFICACIÓN:

Agradecimientos

A mi familia, gracias por el apoyo incondicional, la paciencia y la comprensión. Gracias a mis padres, a mi hermano, a Chus y a Álex, por motivarme siempre a perseguir todas mis metas y empujarme a dar la mejor versión de mí.

Gracias a la familia que me ha dado esta etapa universitaria. A mis tutores, José Ramón y Ana, gracias por acompañarme y guiarme en este camino, por su confianza y ayuda en todo momento. Gracias también al grupo de investigación, por enseñarme de primera mano el mundo de la ciencia, por aconsejarme y proporcionarme su ayuda durante la estancia de prácticas y a lo largo de todo el desarrollo del Trabajo de Fin de Grado. Gracias a mis profesores, compañeros y amigos, por haber compartido estos cuatro años, completando juntos el reto de ser la primera promoción del grado.

Resumen

La hipertensión es una de las enfermedades asociadas a la disfunción del músculo liso más comunes, con una elevada prevalencia en España y numerosos factores de riesgo asociados. Con el fin de comprender los mecanismos subyacentes a este trastorno, se busca realizar un estudio multidisciplinar acerca de los cambios experimentados en la dinámica del músculo liso vascular. Ya se ha demostrado el aumento en las resistencias vasculares y en la presión arterial en aquellos que padecen hipertensión, pero aún se desconocen con precisión los procesos que ocurren a nivel celular para contribuir a su desarrollo. Actualmente, la mayoría de los estudios realizados en este ámbito involucran modelos animales, generalmente especies de rata y de ratón, simulando experimentos en el laboratorio. Sin embargo, esto supone un proceso muy delicado, costoso y en ocasiones incierto. Además, en este entorno contribuyen numerosas condiciones no fácilmente controlables, lo que impide plantear hipótesis prometedoras, ya que no se pueden tener en cuenta todos los factores que intervienen en el proceso.

En este contexto, surge la necesidad de desarrollar un modelo computacional basado en ecuaciones diferenciales que permita estudiar aspectos relacionados con la hipertensión de manera segura y ágil. Se plantea así un modelo de célula de músculo liso vascular basado en dos modelos matemáticos desarrollados previamente, empleando en su diseño parámetros y variables extraídos de experimentos con ratas y ratones. Este modelo simulará las condiciones de una célula completa, asumiendo ciertas simplificaciones y adaptaciones que permitan analizar los mecanismos de la respuesta contráctil durante tiempos suficientemente largos. Así mismo, se buscará encontrar relaciones y dependencias entre las variaciones del potencial de membrana y de la contracción con algunas variables del modelo, con el fin de modular estas respuestas y plantear ciertas hipótesis. El objetivo general consistirá en reproducir las condiciones reales de una célula de músculo liso vascular, pudiendo adaptar su comportamiento y comparar los resultados obtenidos con dos cepas de ratones con las que generalmente se realizan los experimentos relacionados con la hipertensión: BPN o normotensa y BPH o hipertensa.

A partir del modelo generado se plantean ciertas hipótesis que se comprobarán computacionalmente mediante diversos protocolos. Entre ellos, se realizará un análisis exhaustivo de la respuesta contráctil y el potencial de membrana y su dependencia con factores dependientes de cloruro, como su concentración intracelular y la permeabilidad de sus canales dependientes de calcio. Los resultados se compararán con los extraídos de experimentos reales, así como se plantearán nuevas hipótesis con el fin de ser testadas en futuras investigaciones. Se demostrará la eficacia del modelo para reproducir situaciones reales a niveles cualitativos y cuantitativos, así como se comentarán las limitaciones encontradas en su desarrollo, junto a los aspectos de la realidad que no se han logrado simular correctamente. En definitiva, se pretende resaltar la importancia de modelos de este calibre en la investigación científica actual, siendo de gran utilidad para plantear nuevas dianas que contribuyan en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como la hipertensión.

Palabras clave

Células de músculo liso, Canales iónicos, Potencial de membrana, Contracción, Ecuaciones diferenciales, Simulación numérica, Matlab

Abstract

Hypertension is one of the most common diseases associated with smooth muscle dysfunction, with a high prevalence in Spain and numerous associated risk factors. In order to understand the mechanisms underlying this disorder, we seek to carry out a multidisciplinary study about the changes experienced in the dynamics of vascular smooth muscle. The increase in vascular resistance and blood pressure in patients with hypertension has already been demonstrated, but the processes that occur at the cellular level and contribute to its development are still unknown. Currently, most of the studies carried out in this field involve animal models, generally rats and mice, simulating experiments with them in the laboratory. However, this is a very delicate, costly and sometimes uncertain process. In addition, numerous conditions that are not easily controllable contribute to the environment of the lab, which prevents proposing promising hypotheses, since not all the factors involved in the process can be taken into account.

In this context, the need arises to develop a computational model based on differential equations that allows the study of aspects related to hypertension in a safe and agile environment. Thus, a vascular smooth muscle cell model is proposed based on two previously developed mathematical models, using in its design parameters and variables extracted from experiments with rats and mice. This model will simulate the conditions of a complete cell, assuming certain simplifications and making some adaptations that allow the analysis of the mechanisms of the contractile response for long times. Likewise, it will seek to find relationships and dependencies between the variations of the membrane potential and the contraction with some variables of the model, in order to modulate these responses and propose certain hypotheses. The general objective will consist of reproducing the real conditions of a vascular smooth muscle cell, being able to adapt its behavior and relate the results obtained with two strains of mice with which experiments related to hypertension are generally performed: BPN or normotensive and BPH or hypertensive.

Based on the generated model, certain hypotheses are proposed that will be verified computationally through the application of various protocols. Among them, an exhaustive analysis of the contractile response and the membrane potential and its dependence on chloride-dependent factors will be carried out, especially its intracellular concentration and the chloride permeability of its calcium-dependent channels. The results obtained will be compared with those extracted from real experiments, as well as new hypotheses will be proposed in order to be tested in future lines of research. The effectiveness of the model generated to reproduce real situations at qualitative and quantitative levels will be demonstrated, as well as the limitations found in its development will be discussed, together with the aspects that have not been able to be simulated correctly. In conclusion, it is intended to highlight the importance of this kind of computational models in current scientific research, being very useful to propose new targets that contribute to the diagnosis and treatment of diseases such as hypertension.

Keywords

Smooth muscle cells, Ionic channels, Membrane potential, Contraction, Diferential equations, Numeric simulation, Matlab

Índice general

Agradecimientos.....	4
Resumen	5
Abstract	6
Índice general	7
Índice de figuras	9
Índice de tablas.....	10
Parte 1. Introducción y conocimientos previos	11
Capítulo 1.....	11
1.1. Contexto y motivación.....	11
1.2. Hipótesis y objetivos.....	12
1.3. Metodología	13
Capítulo 2.....	15
2.1. Fundamentos del músculo liso	15
2.2. Mecanismos de contracción del músculo liso	16
2.3. Regulación de la contracción del músculo liso	18
2.4. Disfunción del músculo liso: Hipertensión	19
2.5. Modelización de células de músculo liso	20
Capítulo 3.....	21
3.1. Introducción al modelado y simulación numérica	21
3.2. Generación de un sistema de ecuaciones diferenciales	23
3.3. Resolución de ecuaciones diferenciales con métodos analíticos.....	24
3.4. Resolución de ecuaciones diferenciales con métodos numéricos	25
Parte 2. Trabajo desarrollado.....	31
Capítulo 4.....	31
4.1. Estado del arte de modelos previos.....	31
4.2. Análisis de los requisitos del modelo computacional	33

Capítulo 5.	35
5.1. Diseño del modelo computacional.....	35
5.2. Ecuaciones del modelo computacional.....	37
5.3. Especificaciones del modelo computacional.....	53
Capítulo 6.	61
6.1. Estado estacionario.....	61
6.2. Protocolo A: Cambios en la contracción y en el potencial de membrana ante diferentes $[Cl^-]_i$	63
6.3. Protocolo B: Análisis de la contracción modulado por cloruro.....	66
Parte 3. Discusión y conclusiones.....	71
Capítulo 7.	71
7.1. Discusión de los resultados obtenidos.....	71
7.2. Limitaciones.....	75
Capítulo 8.	77
8.1. Consecución de los objetivos.....	77
8.2. Conclusiones extraídas.....	78
8.3. Líneas futuras de investigación.....	79
Fuentes.....	81
Bibliografía.....	91

Índice de figuras

Figura 1. Representación de la estructura celular del músculo liso y su mecanismo de contracción.	18
Figura 2.Regiones de estabilidad de los distintos métodos BDF (Gander & Wanner, 2020).	29
Figura 3. Diagrama esquemático de los componentes del modelo y las interacciones entre ellos..	36
Figura 4. Dependencia de las corrientes NSC con el potencial de membrana y la concentración de DAG.	42
Figura 5. Justificación del modelado de la corriente I_{ClCa}	44
Figura 6. Esquema de la activación del $\alpha 1$ -adrenoreceptor y formación de DAG e IP_3	48
Figura 7. Representación del modelo cinético de cuatro estados del receptor de rianodina.	51
Figura 8. Esquema de la cinética de la contracción inducida por Ca^{2+}	52
Figura 9. Resultados del modelo en el estado estacionario.....	62
Figura 10. Resultados experimentales en ratones BPN y BPH controles y en condiciones de 0 Cl^- (Unpublished).....	63
Figura 11.Pulso de NE aplicado durante el Protocolo A.	64
Figura 12. Resultados obtenidos con el Protocolo A.	66
Figura 13. Pulsos aplicados durante el Protocolo B.	67
Figura 14. Resultados obtenidos con el Protocolo B.	68
Figura 15. Representación de los parámetros extraídos de la evolución temporal de la contracción y su relación con $[Cl^-]_i$ y P_{Cl}	69
Figura 16. Comparación de los resultados obtenidos con el modelo computacional y con los experimentos reales durante el Protocolo A.	72
Figura 17. Variaciones en la contracción en BPH (rojo) y BPN (azul) en situaciones de 0 Cl^-	74
Figura 18. Expresión relativa de mRNA y Fold Change en BPH.	74

Índice de tablas

Tabla 1. Coeficientes de los métodos BDF (Celaya, n.d.).....	28
Tabla 2. $A(\alpha)$ -estabilidad de los métodos BDF (Celaya, n.d.).....	28
Tabla 3. Parámetros del modelo	56
Tabla 4. Hiperparámetros del modelo.	58
Tabla 5. Condiciones iniciales fijadas a partir del estado estacionario.	62

Parte 1. Introducción y conocimientos previos

Capítulo 1.

Introducción y contexto

1.1. Contexto y motivación

El músculo liso (smooth muscle; SM) es considerado un tejido muscular distribuido principalmente en órganos de forma tubular y huecos en su interior, lo que permite el movimiento direccional de diversos fluidos a la vez que colabora en el mantenimiento de su tono y forma propios (Frismantiene et al., 2018). Las células del músculo liso vascular (vascular smooth muscle cells; VSMC), presentan una forma alargada y disponen de una estructura contráctil específica. Su membrana celular incluye numerosos mecanismos de comunicación intra e intercelular y permite recibir estímulos muy diversos que regulan su funcionamiento y homeostasis. El conjunto de todos ellos logra que las VSMC constituyan el componente principal en la regulación de las resistencias periféricas, las cuáles afectarán al control de la presión arterial de los vasos sanguíneos (Kapela et al., 2008; Tajada et al., 2012).

Por otra parte, la hipertensión constituye el mayor factor de riesgo de enfermedad y de muerte en España, con una prevalencia en la población adulta de entre el 33 y el 43%, teniendo numerosos factores de riesgo asociados a la misma, como pueden ser la edad, la obesidad o los antecedentes familiares (Gorostidi et al., 2022). Esta patología vascular sistémica y crónica cuenta con presión arterial elevada y un aumento en las resistencias vasculares. Provoca diversos cambios fisiopatológicos, dando lugar a una hipertrofia de las VSMC, un aumento de su contractilidad y un remodelamiento de los vasos sanguíneos (Frismantiene et al., 2018), lo que lleva a definir estas células como principales responsables del desarrollo de la enfermedad.

El estudio de patologías vasculares y su investigación se realiza actualmente en laboratorios especializados empleando modelos animales. Sin embargo, la disposición de modelos matemáticos equivalentes que permitan simular y estudiar sistemas complejos, reproduciendo las condiciones in vivo o in vitro de manera computacional, in silico, supone un gran avance en el mundo científico. El uso de estos programas interdisciplinarios en los que se combinan conocimientos de ámbitos como las matemáticas, la física, la biología y la bioquímica reduce la necesidad de repetir experimentos en el laboratorio cuyo resultado es aparentemente incierto, pudiendo así simularlo bajo protocolos matemáticos y ajustar los parámetros o variables antes de trasladarlo a un entorno real.

De esta manera surge la necesidad de realizar el presente trabajo, donde se desarrolla un modelo computacional en el que se describen los principales componentes de la membrana celular de VSMC, adaptados para modelos animales basados en datos de rata y de ratón. El proceso de diseño e implementación del modelo conlleva una serie de etapas realizadas de manera iterativa, donde se analizan las características básicas a incluir y se adaptan en base a las hipótesis a comprobar.

1.2. Hipótesis y objetivos

El desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado propone como hipótesis la generación de un modelo computacional adaptado para parámetros de ratones que permita el estudio de la dinámica del potencial de membrana y del calcio (Ca^{2+}) en el músculo liso vascular. En base a los datos conocidos, se combinarán y adaptarán dos modelos ya desarrollados, planteados en Kapela et al., (2008) y Bennett et al., (2005), ajustando sus ecuaciones y parámetros conforme sea necesario. De esta manera, se pretenden simular distintos experimentos, basados en estimulaciones farmacológicas, y comprender las variaciones apreciables en el modelo, relacionándolas así con la presencia y desarrollo de la hipertensión. Entre ellas, se busca realizar un análisis de los cambios en el potencial de membrana y en la contracción ante diferentes concentraciones de cloruro intracelular, en presencia y en ausencia de cloruro extracelular, simulando los efectos vistos en modelos animales reales de ratones BPN y BPH. Por otra parte, se pretende encontrar la relación de la respuesta contráctil con diversos parámetros del modelo, con el fin de modularla y compararla con resultados obtenidos en experimentos reales.

Por estas razones, el objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado consiste en investigar la dinámica del potencial de membrana y de los mecanismos de contracción de VSMC. Con este fin, se procede a desarrollar un modelo computacional adaptado a las características fisiológicas de ratón que permita simular las condiciones tanto bajo el estado estacionario como ante diversos protocolos de la manera más fiel posible a los datos obtenidos en experimentos reales.

Como objetivos específicos podemos destacar los siguientes:

- I) Realizar una revisión bibliográfica de modelos computacionales enfocados al estudio del Ca^{2+} desarrollados previamente, analizarlos y comprender los requisitos de su diseño.
- II) Comprender las bases fisiológicas del músculo liso y sus mecanismos de contracción, junto a las bases matemáticas de las ecuaciones diferenciales y su aplicabilidad en el diseño y resolución de modelos computacionales basados en sistemas biológicos reales.
- III) Desarrollar un modelo genérico de célula del músculo liso vascular (*smooth muscle cell*, SMC) y adaptarlo mediante un ajuste fino de sus parámetros o ecuaciones, basándose en datos experimentales y simulaciones computacionales. Así mismo, se busca familiarizarse con el entorno de programación de Matlab para la resolución matemática del sistema generado.
- IV) Ajustar dos submodelos a partir del modelo general, adaptados a dos cepas de ratones distintas (BPN y BPH), con el fin de analizar las variaciones en su dinámica como consecuencia de la hipertensión.

- V) Definir ciertos protocolos que permitan validar el comportamiento del modelo en distintas situaciones experimentales, incluyendo el análisis del equilibrio de cada una de sus variables en el estado estacionario.
- VI) Simular sucesivos protocolos de manera precisa y discutir los resultados obtenidos, comprobando la correspondencia de las respuestas computacionales con las esperadas a nivel biológico.
- VII) Extraer conclusiones de los resultados obtenidos, identificar sus posibles limitaciones, así como futuras líneas de investigación complementarias.

1.3. Metodología

El desarrollo del modelo computacional se efectuará en Matlab, basándose principalmente en dos modelos ya publicados por Kapela et al., 2008 y Bennett et al., 2005. Se tomarán las ecuaciones diferenciales descritas en dichos modelos, adaptándolas y simplificándolas en base a los objetivos descritos. Así mismo, se prescindirá de aquellas ecuaciones o parámetros cuya información fisiológica no resulte relevante para los objetivos propuestos. Los parámetros se tomarán de los modelos especificados en la bibliografía, así como se describirán otros de manera experimental.

La manera en la que se construirá el modelo completo será un proceso iterativo, partiendo de modelos generales a los que se les realizarán cambios de manera progresiva. Tras aplicar cualquiera de estas modificaciones, resultará fundamental asegurar la estabilidad del modelo y la correspondencia de las respuestas obtenidas con las reales. Por ello, la propia modelización del sistema ya constituye un objetivo muy ambicioso.

Sobre el modelo final se aplicarán distintos protocolos, enfocados al análisis de aspectos concretos. No obstante, a pesar de analizar elementos específicos del modelo, se requerirá el sistema de la célula completa para asegurar unas condiciones de simulación que representen de manera precisa la situación fisiológica en su conjunto. En todo este proceso se deberá tener en cuenta que el fin principal de cualquier modelo de este tipo consiste en ser capaz de representar un sistema real sobre el que plantear y simular computacionalmente ciertas hipótesis, que después serán testadas con experimentos reales en el laboratorio.

Capítulo 2.

Conocimientos previos

2.1. Fundamentos del músculo liso

El músculo liso es uno de los tres tipos principales de tejido muscular del cuerpo humano, junto con el músculo estriado esquelético y el músculo estriado cardíaco. A diferencia del músculo estriado, caracterizado por su apariencia rayada bajo el microscopio; el músculo liso tiene una apariencia lisa y no presenta sus distintivas bandas transversales. El tejido muscular liso se encuentra en diversas partes del cuerpo, desempeñando funciones vitales en diferentes sistemas. Podemos observarlo en las paredes de los órganos huecos, como el tubo digestivo, los vasos sanguíneos, los bronquios, el útero y la vejiga urinaria. También se encuentra en estructuras como los conductos biliares y los conductos deferentes (Frismaniente et al., 2018; Webb, 2003).

Comparado con el músculo estriado esquelético, que controla los movimientos voluntarios del cuerpo, y el músculo estriado cardíaco, que forma el músculo del corazón y es responsable de su contracción rítmica, el músculo liso tiene características únicas. Mientras que el músculo estriado se caracteriza por la presencia de células largas multinucleadas cuya contracción es voluntaria, el músculo liso se compone de fibras musculares lisas más pequeñas y fusiformes, con un único núcleo central, que modifican su longitud involuntariamente (Webb, 2003). La *Figura (1.A)* muestra una ilustración de la estructura y disposición del músculo liso, en el que se incluye un ejemplo de un corte longitudinal de este tejido.

El músculo liso también se diferencia en su forma de contracción. A diferencia del músculo estriado, que se contrae de manera rápida y voluntaria, el músculo liso presenta una contracción lenta, sostenida y en gran medida involuntaria. Esta contracción suave y continua es esencial para el funcionamiento adecuado de diversos órganos y sistemas. Su alta plasticidad permite que pueda involucrarse en fenómenos fisiológicos muy diversos, como la regulación de flujos de aire a nivel pulmonar, de alimentos en el tracto digestivo o de sangre en las arterias en el caso del músculo liso vascular (Frismaniente et al., 2018).

Este flujo sanguíneo es determinado por el diámetro de los vasos por los que circula, la longitud de los mismos y la viscosidad de la sangre, siendo estos los tres factores más importantes a la hora de controlar la resistencia que presentan los vasos sanguíneos. En concreto, basándonos en la Ley de Poiseuille, la resistencia del vaso será inversamente proporcional a su radio elevado a la cuarta potencia (Touyz et al., 2018). Por ello, cambios de pequeño calibre en el tamaño del vaso pueden generar variaciones muy grandes en la resistencia de los fluidos que circulan por él.

Los mecanismos presentes en estas células son complejos y están altamente regulados por una gran cantidad de factores. Entre ellos encontramos el sistema nervioso autónomo, responsable del control de los procesos de origen involuntario del organismo.

Su componente simpático provoca la contracción del músculo vascular, la reducción del diámetro vascular y el consiguiente aumento de la resistencia y de la presión arterial.

Por el contrario, el sistema parasimpático provoca el efecto opuesto, causando su relajación. Junto a esto, las VSMC pueden ser reguladas por distintos fármacos o sustancias, induciendo cambios en su estado contráctil (Chistiakov et al., 2015).

El correcto funcionamiento de todos los mecanismos involucrados en la regulación del músculo liso vascular resultará fundamental para la salud cardiovascular, ya que cualquier alteración de los mismos podría dar lugar a patologías diversas, desde hipertensión arterial hasta enfermedades cardiovasculares graves (Chistiakov et al., 2015; Webb, 2003).

2.2. Mecanismos de contracción del músculo liso

Las VSMC constituyen el componente principal de las paredes de los vasos arteriales, estando estos compuestos por varias capas concéntricas de las mismas, rodeadas de una capa de células endoteliales y de la adventicia. Por esta razón, las VSMC cuentan con el sistema contráctil propio de los tejidos musculares lisos, cuyo mecanismo de contracción es iniciado por calcio y mediado por los cambios en los filamentos gruesos (Frisman et al., 2018; Touyz et al., 2018).

Los filamentos de actina y miosina son los componentes principales de la maquinaria contráctil en el músculo liso, los cuales están organizados de manera diferente en comparación con el músculo estriado. En el músculo liso, los filamentos de actina están dispersos en todo el citoplasma y se conectan a las estructuras llamadas cuerpos densos, localizadas cerca de la membrana celular. Los filamentos de miosina están intercalados entre los filamentos de actina y se extienden a lo largo de toda la longitud de la célula muscular lisa. Esta disposición desorganizada de los filamentos de actina y miosina es lo que contribuye a la apariencia lisa y no estriada del músculo liso (Frisman et al., 2018).

En este proceso contráctil, la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) tiene un papel fundamental, puesto que un aumento de la misma, producido como respuesta a un estímulo mecánico, humoral o neurológico, permite iniciar la contracción (Miller & Carsten, 1996). A diferencia del músculo estriado, donde el calcio proviene principalmente del retículo sarcoplásmico, en el músculo liso, el calcio puede provenir de diferentes fuentes tanto intracelulares como extracelulares.

Las fuentes intracelulares de calcio incluyen el retículo sarcoplásmico y las mitocondrias, las cuales almacenan calcio en su interior. El retículo sarcoplásmico del músculo liso suele considerarse menos desarrollado en comparación con el músculo estriado, pero aun así desempeña un papel importante en la liberación de calcio durante la contracción muscular. Por otra parte, el calcio extracelular, presente en el líquido intersticial que rodea las células musculares lisas, también puede ingresar al citoplasma a través de canales de calcio. La concentración de calcio extracelular es regulada por diversas proteínas y transportadores presentes en la membrana celular del músculo liso (Camello et al., 2002; Horowitz et al., 1996; Miller & Carsten, 1996).

El calcio puede ingresar al citoplasma del músculo liso a través de canales de calcio dependientes de voltaje o canales activados por receptores. Los canales de calcio dependientes de voltaje se abren en respuesta a cambios en el potencial de membrana, permitiendo la entrada de calcio extracelular; mientras que los canales activados por receptores permiten que entre calcio en respuesta a la unión de ciertos ligandos, como hormonas o neurotransmisores (Horowitz et al., 1996).

Por otra parte, la salida de calcio del citoplasma del músculo liso ocurre principalmente a través de bombas de calcio (ATPasas de Ca^{2+}), que utilizan la energía del ATP para transportar el calcio desde el citoplasma hacia el retículo sarcoplásmico (SERCA) o hacia el espacio extracelular (Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática) (Webb, 2003).

En este proceso no debemos olvidarnos de la calmodulina, una proteína reguladora presente en el músculo liso que se une al calcio cuando este último aumenta su concentración en el citoplasma. La unión del calcio a la calmodulina cambia su estructura, lo que permite que interactúe con diversas proteínas y enzimas de la célula muscular lisa (Webb, 2003; Yang et al., 2003).

Una vez conocidos los principales componentes que intervienen en el mecanismo de contracción, planteamos a continuación su funcionamiento, el cual se inicia ante un aumento de la concentración citosólica del calcio. Es en este momento cuando se produce su unión a la calmodulina, formando el complejo ion-proteína que permite activar la quinasa de cadena larga de la miosina. Esta enzima, a su vez, fosforila la cadena ligera de la miosina, provocando un cambio en su conformación que permite que quede libre para interactuar con el filamento de actina. En este punto se unen miosina y actina y, cuando se ha formado el complejo de miosina-actina, la hidrólisis de ATP por la miosina genera energía para la contracción muscular. La liberación de energía provoca un cambio en la conformación de la miosina, lo que a su vez provoca el deslizamiento de los filamentos de actina a lo largo de los filamentos de miosina (Hai & Murphy, 1988; Sanders, 2008; Webb, 2003).

Este deslizamiento entre los filamentos en el músculo liso resulta en la generación de fuerza y acortamiento del músculo. La magnitud de la fuerza generada y el grado de acortamiento dependen de la cantidad de calcio disponible, la actividad de la MLCK y otros factores que regulan la contracción del músculo liso (Horowitz et al., 1996). El efecto contrario tiene lugar cuando el calcio es liberado hacia el espacio extracelular, provocando la relajación. Para ello, la célula cuenta con canales iónicos, transportadores y bombas que permiten su salida, reduciendo la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y restaurando las concentraciones basales iónicas.

La *Figura (1.B)* ilustra de manera esquemática este proceso. Se muestra la entrada de calcio (Ca^{2+}) desde el líquido extracelular (LEC), junto a su liberación del retículo sarcoplásmico (SR). Una vez en el citosol, Ca^{2+} se une a la calmodulina (CM), activando la quinasa de la miosina de cadena larga (MLCK), que a su vez permite la fosforilación de la miosina (M). La unión final entre actina (A) y miosina fosforilada (M_p), permite generar la contracción.

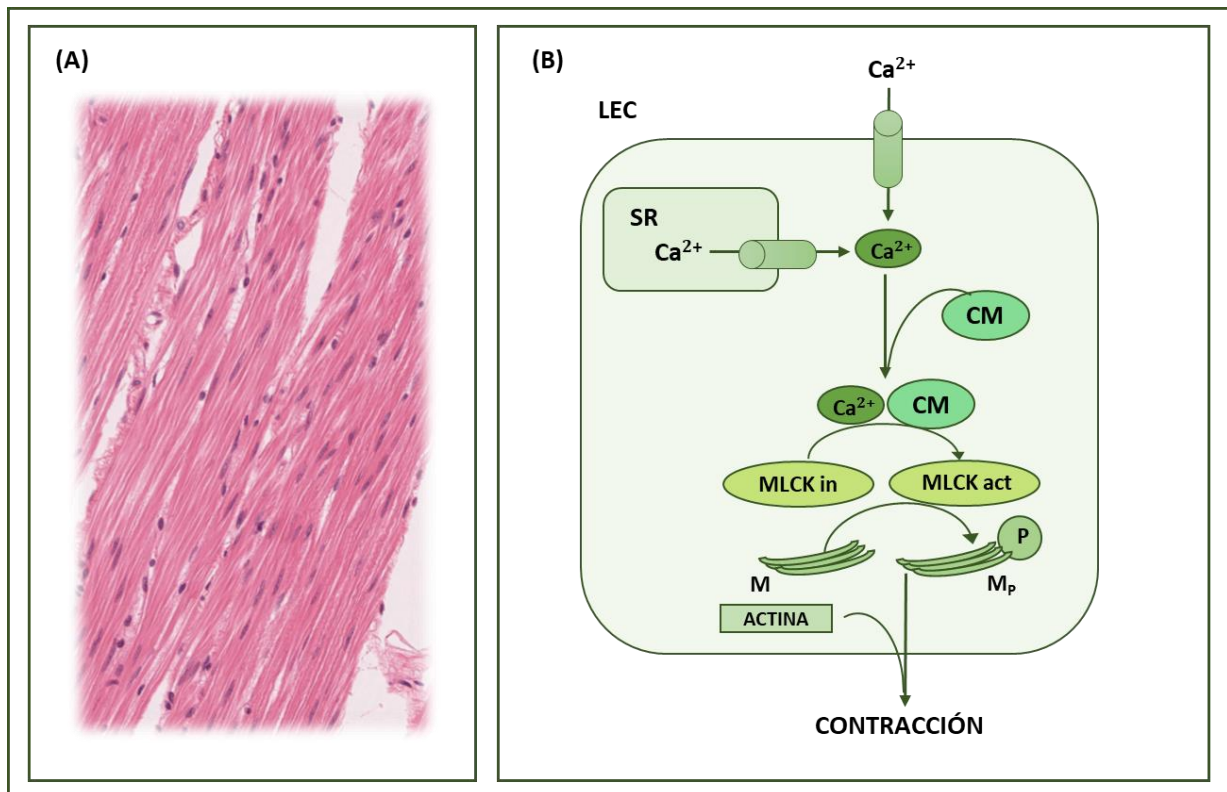


Figura 1. Representación de la estructura celular del músculo liso y su mecanismo de contracción.
 (1.A). Esquema de la estructura del músculo liso: sección longitudinal.
 (1.B). Diagrama esquemático del mecanismo de contracción de la célula de músculo liso.

2.3. Regulación de la contracción del músculo liso

La contracción del músculo liso está modulada por una combinación de factores intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos incluyen la concentración de calcio intracelular, la sensibilidad de los filamentos de actina y miosina a la interacción y la actividad de las enzimas regulatorias, como la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) y la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) (Sanders, 2008).

Los factores extrínsecos son aquellos que provienen del entorno externo al músculo liso y pueden influir en su contracción. Estos incluyen hormonas, neurotransmisores, factores químicos locales, temperatura y estiramiento mecánico. Estos factores pueden modular la contracción del músculo liso al afectar la entrada de calcio y el resto de factores intrínsecos. Por una parte, las hormonas, como la adrenalina, la oxitocina y la vasopresina, pueden unirse a receptores específicos en la membrana celular del músculo liso, activando vías de señalización intracelular que resultan en la liberación de calcio y la contracción muscular. Por otra parte, los neurotransmisores, como la acetilcolina y la noradrenalina, transmiten señales desde las neuronas hasta el músculo liso. Estos neurotransmisores se unen a receptores en la membrana celular del músculo liso, lo que desencadena la apertura de canales de calcio o la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico, lo que resulta en la contracción muscular (Chistiakov et al., 2015; Webb, 2003).

Además, al estudiar la regulación de los mecanismos de contracción del músculo liso, deberemos tener en cuenta fenómenos como la despolarización y la regulación del potencial de membrana. En reposo, el músculo liso tiene un potencial de membrana estable y polarizado. La despolarización de la membrana celular, a menudo causada por la entrada de iones de calcio o la activación de canales iónicos, desencadena la contracción del músculo liso al aumentar la concentración de calcio intracelular. La regulación del potencial de membrana del músculo liso está influenciada por varios factores, como los canales iónicos y los cambios en la concentración de iones como sodio, potasio y calcio. Estos cambios en el potencial de membrana pueden ser iniciados por señales eléctricas o químicas, desencadenando la contracción del músculo liso (Horowitz et al., 1996).

En definitiva, el estudio de los mecanismos de contracción del músculo liso y la regulación de los mismos resultará crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos y terapias dirigidas a trastornos en su función. Comprender cómo se regula la contracción del músculo liso, qué proteínas y enzimas están involucradas, y cómo se alteran estos mecanismos en presencia de diferentes enfermedades, puede ayudar a identificar posibles dianas terapéuticas. Un conocimiento más profundo de los mecanismos de contracción del músculo liso también puede contribuir a la creación de fármacos más selectivos y efectivos que actúen sobre los componentes específicos involucrados en la contracción muscular. Esto, finalmente puede conducir a terapias más eficaces y con menos efectos secundarios.

2.4. Disfunción del músculo liso: Hipertensión

La disfunción del músculo liso puede estar asociada con varias enfermedades y trastornos. Algunas de estas condiciones incluyen trastornos gastrointestinales, como el síndrome del intestino irritable, la enfermedad inflamatoria intestinal y la gastroparesia. Además, el asma, la hipertensión arterial, la disfunción eréctil, los cálculos biliares y los trastornos uterinos son ejemplos de condiciones en las que el músculo liso puede presentar anomalías en su contracción (Gorostidi et al., 2022).

En condiciones fisiológicas, las células del músculo liso se contraen con normalidad, ya sea de forma fásica o tónica, siendo esta segunda indispensable para la regulación del tono muscular del vaso y, por tanto, del flujo sanguíneo. No obstante, ante condiciones patológicas como puede ser la hipertensión, células altamente diferenciadas toman mayor importancia en el proceso y proceden a desdiferenciarse. Este cambio provoca que las células expresen niveles bajos de marcadores contráctiles, dando lugar a situaciones de disfunción vascular y remodelamiento arterial. La proliferación celular se descontrola debido a la presencia de moléculas de señalización de crecimiento celular, fibrosis o migración, generando un ensanchamiento de los vasos sanguíneos y un aumento en su rigidez (Frismantiene et al., 2018; Touyz et al., 2018).

De las enfermedades y trastornos comentados, destacamos la hipertensión arterial como una de las más importantes debido a su prevalencia y las implicaciones que conlleva en la salud de los que la padecen. En estos casos, el músculo liso vascular experimenta una contracción excesiva o una disfunción en la relajación, lo que conduce a un aumento sostenido de la resistencia vascular y de la presión arterial en el sistema circulatorio (Gorostidi et al., 2022).

Algunos fármacos utilizados para el tratamiento de la hipertensión, como los bloqueadores de los canales de calcio o los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), actúan sobre los mecanismos de contracción del músculo liso vascular para reducir la resistencia y normalizar la presión arterial (Gorostidi et al., 2022). Dado que el músculo liso vascular desempeña un papel clave en la regulación de la presión arterial, comprender los mecanismos de contracción y relajación de este tejido es fundamental para el desarrollo de estrategias terapéuticas eficaces en el control de la hipertensión.

2.5. Modelización de células de músculo liso

Una vez conocidas las bases acerca del músculo liso, sus componentes y sus mecanismos de contracción, podemos preguntarnos cuál es la utilidad de modelar VSMC y cómo podemos realizarlo. En este contexto, los modelos matemáticos computacionales ofrecen una herramienta poderosa para el estudio de la hipertensión en VSMC de modelos animales. Estas representaciones permiten simular y analizar de manera precisa los procesos biológicos y las interacciones moleculares involucradas en la regulación del tono vascular y la función de las VSMC.

Mediante la construcción de un modelo matemático que integre los mecanismos clave implicados en la hipertensión, como la regulación del calcio intracelular, la activación de canales iónicos y la respuesta contráctil de las VSMC, es posible obtener información valiosa sobre los mecanismos subyacentes y las alteraciones asociadas con esta enfermedad. De esta manera, podremos comprender cómo los cambios en la expresión y actividad de ciertas proteínas, como los canales iónicos y las bombas de calcio, pueden contribuir al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión. Además, los modelos computacionales permiten explorar el efecto de diferentes intervenciones terapéuticas y estrategias de tratamiento en el sistema cardiovascular, lo que puede ayudar a identificar enfoques más efectivos y personalizados para el manejo de la enfermedad.

En este contexto, se pretende modelar un sistema completo de VSMC que explore las hipótesis planteadas por el grupo de investigación de 'Canales iónicos y fisiopatología vascular' del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), en el que he tenido la oportunidad de realizar las Prácticas de Empresa y colaborar con ellos durante el desarrollo del Trabajo de Fin de Grado. Con este fin, no solo será necesario conocer las bases fisiológicas del músculo liso, sino que se requieren ciertos conceptos acerca de las ecuaciones diferenciales y su resolución, los cuales serán introducidos en el siguiente capítulo.

Capítulo 3.

Descripción del problema

3.1. Introducción al modelado y simulación numérica

Una de las principales ventajas de las matemáticas en general y de las ecuaciones diferenciales en concreto es su aplicabilidad a problemas reales, actuando como importantes herramientas en el diseño y simulación de modelos matemáticos. Esta área combina la aplicación de conceptos teóricos junto con un proceso de simulación exhaustivo que optimice los procesos y mejore la calidad de los resultados. De esta manera, los principales objetivos de cualquier modelo son el estudio, la predicción o el control de un sistema que represente una entidad real (Blanes Zamora et al., 2020).

Dentro de estos conceptos, debemos aclarar que el modelado se refiere al proceso de diseñar un modelo de una entidad real, mientras que la simulación engloba el proceso consistente en realizar experimentos con un determinado modelo, a la vez que se obtienen conclusiones sobre la entidad real representada por el mismo. En definitiva, estas disciplinas permiten estudiar entidades de la realidad, denominadas sistemas, mediante su representación con un modelo.

Todos los modelos, de manera independiente de su naturaleza o ámbito de aplicación, comparten algunas características básicas. Entre ellas, se considera que todo modelo es una representación de una entidad real, tiene una función o un propósito concreto en base al cuál se diseña, emplea la abstracción y omite información del sistema real que no resulta relevante a la hora de construirlo. Por ello, concluiremos que todo modelo siempre altera en cierta medida la realidad. Esta abstracción resulta importante, ya que es el aspecto que permite ignorar elementos no relevantes de la entidad real y obtener representaciones simplificadas cuyo estudio resulte sencillo y facilite su comprensión (Blanes Zamora et al., 2020). Existen numerosos tipos de modelos posibles, los cuáles podemos clasificar en función de su nivel de abstracción en las siguientes categorías (Blanes Zamora et al., 2020):

1. Modelos físicos. Emplean reproducciones físicas del sistema real, pudiendo realizarse al mismo tamaño que el sistema original o a una escala diferente.
2. Modelos análogos. Sustituyen el sistema físico original por otro de diferente naturaleza que permita estudiar ciertas propiedades de manera exhaustiva.
3. Modelos gráficos. Modelan el sistema real mediante una representación gráfica simplificada de la realidad.
4. Modelos computacionales. Emplean programas de ordenador o algoritmos matemáticos para representar el sistema real y modelar su comportamiento en tiempo real.
5. Modelos heurísticos. Definen un conjunto de descriptores a partir de datos de experimentación obtenidos previamente con el modelo real, resultando útiles cuando el sistema incluye ciertas relaciones no modelables mediante ecuaciones matemáticas.

En el ámbito en el que se desarrolla este trabajo, el modelado y la simulación es comúnmente realizada en términos matemáticos con un ordenador, por lo que el modelo elegido será computacional y se implementará en un programa informático. Debido a que el objetivo consiste en modelar un sistema biológico real, deberemos asegurar la causalidad del modelo a desarrollar. Se considera que un modelo es causal cuando el valor de cualquier variable de salida en el instante actual depende únicamente de los valores de las entradas en instantes actuales y anteriores, pero no futuros. Estos modelos causales además pueden clasificarse en distintas categorías (Blanes Zamora et al., 2020).:

1. Modelos deterministas y aleatorios.

- Los modelos deterministas producen salidas idénticas ante las mismas entradas y condiciones de experimentación. Son modelos sin incertidumbre que permiten conocer el resultado de manera puntual.
- Los modelos aleatorios o estocásticos cuentan con incertidumbre, por lo que requieren modelar las entradas y salidas como variables aleatorias dependientes del tiempo.

2. Modelos estáticos y dinámicos.

- Los modelos estáticos son invariables en el tiempo, es decir, sus salidas en un cierto instante de tiempo tan solo dependen de las entradas en ese mismo instante.
- Los modelos dinámicos presentan una evolución temporal. La mayoría de los modelos que consideramos en este ámbito son dinámicos, con el fin de estudiar los cambios de determinadas propiedades a lo largo de un intervalo de tiempo.

3. Modelos lineales y no lineales.

- Los modelos lineales satisfacen las propiedades de aditividad y homogeneidad. La aditividad se aplica si al transformar la entrada del modelo como suma de dos entradas, la salida se corresponde con la suma de las correspondientes salidas de cada entrada. Por otra parte, la homogeneidad es aplicable si al escalar las entradas del modelo por un cierto valor, la salida queda escalada por el mismo valor.
- Los modelos no lineales no satisfacen dichas propiedades de aditividad y homogeneidad.

4. Modelos estacionarios y no estacionarios.

- Los modelos estacionarios cumplen la condición de trasladar sus salidas en el tiempo al aplicar traslados de sus entradas del mismo valor. La estacionariedad permite que cambios en el tiempo de un modelo no provoquen cambios en la forma de su distribución.
- Los modelos no estacionarios no cumplen las condiciones de estacionariedad. La mayor parte de los modelos serán no estacionarios, representando relaciones complejas entre variables.

Existen múltiples clasificaciones de modelos computacionales, por lo que deberemos ser conscientes de las propiedades de cada una de ellas y adaptar nuestro modelo en función de las características de la entidad real que queramos representar. La modelización de este trabajo se realizará mediante ecuaciones diferenciales, por lo que conocer los principios matemáticos de las mismas resultará fundamental para comprender su implementación.

3.2. Generación de un sistema de ecuaciones diferenciales

El problema al que nos enfrentamos es la descripción de un modelo de ecuaciones diferenciales, es decir, un conjunto de expresiones matemáticas que contienen las derivadas de una o más variables dependientes con respecto a una o más variables independientes (A. P. Kartashov, 1980). Como veremos en los siguientes apartados, trabajaremos con 22 ecuaciones, por lo que podemos decir que estas constituyen un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias, debido a que en cada ecuación solo aparecen las derivadas de una o más variables dependientes con respecto a una única variable independiente. El orden de una ecuación diferencial indica el orden de su derivada mayor. De esta manera, podemos representar una EDO de orden n con la siguiente expresión general, donde t denota la variable independiente e y la variable dependiente (Varona, 2011):

$$F\left(t, y, \frac{dy}{dt}, \frac{d^2y}{dt^2}, \dots, \frac{d^ny}{dt^n}\right) = 0. \quad (1)$$

Consideraremos F como una función $F: \Omega \subset \mathbb{R}^{n+2} \rightarrow \mathbb{R}$, con Ω un subconjunto generalmente abierto de \mathbb{R}^{n+2} . Todas las ecuaciones con las que trabajaremos serán de orden 1, por lo que podemos agrupar el conjunto de todas ellas en un sistema de ecuaciones de la forma:

$$\vec{F}\left(t, \vec{y}, \frac{d\vec{y}}{dt}\right) = 0. \quad (2)$$

En nuestro caso, se considerarán las ecuaciones diferenciales expresadas en su forma normal o explícita, donde la derivada de mayor orden aparece despejada. Como todas las ecuaciones serán de orden 1, el sistema tendrá la siguiente forma simplificada:

$$\frac{d\vec{y}}{dt} = \vec{f}(t, \vec{y}). \quad (3)$$

Por lo tanto, generaremos un conjunto de 22 ecuaciones de primer orden expresadas en forma normal, de las cuales buscaremos encontrar su solución. Se dice que una función $\vec{g}(t)$, definida en un intervalo I ($g: I \subset \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}^n$) y con derivada de orden 1, que no contiene parámetros distintos de los que puedan aparecer en la propia ecuación, es una solución particular del sistema de ecuaciones ordinarias $\vec{F}(t, \vec{y}, \vec{y}', \vec{y}'', \dots, \vec{y}^n) = 0$ en I , si verifica el sistema en I , es decir, si $\vec{F}(t, \vec{g}(t), \vec{g}'(t), \vec{g}''(t), \dots, \vec{g}^n(t)) = 0$ en I . La solución general de cada ecuación del sistema será el conjunto de todas sus ecuaciones particulares (Kiseliov et al., 1984).

Junto a estas 22 ecuaciones, necesitaremos definir ciertas condiciones iniciales de las mismas. Cuando nos encontremos con fenómenos de carácter temporal, como es el caso del problema que vamos a abordar, las condiciones complementarias necesarias serán los valores de la solución en un instante inicial t_0 . En estos casos hablaremos de un problema de valores iniciales o problema de Cauchy. Un problema de Cauchy de primer orden tendrá la siguiente forma:

$$\begin{cases} \vec{y}'(t) = \vec{f}(t, \vec{y}) \\ \vec{y}(t_0) = \vec{y}_0 \end{cases} \quad (4)$$

La solución del problema de Cauchy de primer orden será una curva que pase por (t_0, \vec{y}_0) , siendo la pendiente de la recta tangente a esta en cada punto igual a $\vec{f}(t, \vec{y})$.

Una vez conocidos los aspectos básicos acerca de las EDOs de primer orden, profundizaremos en los métodos para su resolución, de manera tanto analítica como numérica, los cuales se emplearán en función de la complejidad y las características de las ecuaciones en cuestión.

3.3. Resolución de ecuaciones diferenciales con métodos analíticos

De manera general, los métodos de resolución de las ecuaciones diferenciales son una generalización del cálculo de sus primitivas, donde resolver una ecuación diferencial de orden n va a depender de n parámetros. Por ello, trabajar con una EDO de primer orden generalmente supone una ventaja en su resolución, ya que dependerá de un parámetro y algunas podrán ser resueltas con métodos analíticos (Gutiérrez Arias & Makárov, 2005; Kiseliiov et al., 1984).

En primer lugar, las ecuaciones con variables separables de la forma $g(t) = h(y) dy/dt$ pueden expresarse como $g(t) dt = h(y)dy$. De esta manera, podemos suponer G como primitiva de g y H como primitiva de h y expresarlo como $G'(t)dt = H'(y) dy$, integrando para llegar a la solución general de la ecuación de la forma $G(t) = H(y) + C$. Este tipo de ecuaciones resultan las más sencillas en cuanto a su integración, por lo que constituyen la base para las siguientes clases, que en algunos casos intentarán obtener ecuaciones con variables separables para poder resolverlas de esta manera (Gutiérrez Arias & Makárov, 2005).

Ligado con lo anterior, las ecuaciones homogéneas de la forma $dy/dt = f(y/t)$ permiten realizar un cambio en la función $y(t)$ por $u(t)$, considerando $y = ut$, con el fin de transformarla en una ecuación con variables separables. Este mismo concepto es aplicable a las ecuaciones reducibles a homogéneas y las homogéneas implícitas (Gutiérrez Arias & Makárov, 2005).

Por otra parte, las ecuaciones expresadas como $P(t, y)dt + Q(t, y)dy = 0$ son exactas en un conjunto abierto A de \mathbb{R}^2 si cumplen con $\partial P/\partial y = \partial Q/\partial t$. Se verifica que existe una función potencial diferenciable en A llamada $F(t, y)$ tal que $dF(t, y) = \partial F/\partial t dt + \partial F/\partial y dy = P dt + Q dy$. Por ello, la solución general será de la forma $F(t, y) = C$ (Gutiérrez Arias & Makárov, 2005).

De igual manera que con las ecuaciones de variables separables, podemos considerar otras ecuaciones diferenciales reducibles a exactas mediante factores integrantes, donde se pretende definir una función $\mu(t, y)$ no idénticamente nula que permita que $\mu(t, y)P(t, y)dt + \mu(t, y)Q(t, y)dy = 0$ sea exacta (Gutiérrez Arias & Makárov, 2005).

También podemos considerar las ecuaciones lineales de primer orden de la forma $dy/dt + g(t)y = h(t)$, las cuales pueden ser resueltas por distintos métodos. Entre estos destacamos la búsqueda de un factor integrante $\mu(t)$ o la resolución de su ecuación homogénea asociada de variables separadas $dy/dt + g(t)y = 0$, para después intentar encontrar una solución particular de la misma. Con esto lograremos escribir su solución general como la solución particular más la solución general de la ecuación homogénea asociada (Gutiérrez Arias & Makárov, 2005).

Por último, las ecuaciones de Bernoulli se expresan como $dy/dt + g(t)y = h(t) y^n$, siendo $g(t)$ y $h(t)$ continuas en un intervalo I de \mathbb{R} y con n distinto de 0 y de 1. Dividiendo la ecuación entre y^n y realizando el cambio de variable $w = y^{1-n}$, se logra llegar a una ecuación lineal que se puede resolver por los distintos métodos indicados (Gutiérrez Arias & Makárov, 2005).

No obstante, existen numerosos tipos de ecuaciones EDOs de primer orden, cuya resolución no se podrá obtener analíticamente. En estos casos, deberemos recurrir a métodos numéricos basados en la discretización del dominio y la aproximación numérica de las soluciones.

3.4. Resolución de ecuaciones diferenciales con métodos numéricos

Los métodos numéricos para EDOs son el conjunto de procedimientos matemáticos empleados con el fin de encontrar aproximaciones numéricas a EDOs. En el ámbito de la ingeniería resulta común su aplicación, ya que las ecuaciones diferenciales que son empleadas para describir las variaciones entre las propiedades físicas y los estados de los sistemas modelados suelen ser no lineales y no resulta sencillo resolverlas de manera analítica. Es por esta razón por la que se recurre a algoritmos basados en aproximaciones suficientemente buenas de la solución, como es el caso de los métodos Runge-Kutta o de los métodos lineales multipaso.

Estos métodos pueden agruparse en distintas categorías, que permitirán aplicar enfoques específicos en función del objetivo o características particulares del problema (LeVeque, 2007; Quarteroni et al., 2007; Strikwerda, 1990):

1. Métodos de un paso y métodos multipaso

- Los métodos de un paso calculan la aproximación de la función en cada punto empleando únicamente la información del paso anterior.
- Los métodos multipaso calculan la aproximación de la función en cada punto empleando la información de varios pasos anteriores.

2. Métodos de paso fijo y métodos de paso variable

- Los métodos de paso fijo emplean el mismo tamaño de paso para calcular las aproximaciones de la solución en cada punto.
- Los métodos de paso variable permiten variar y ajustar el tamaño de paso en cada iteración en función de la precisión requerida y adaptándose al comportamiento del problema en cada zona del intervalo de integración.

3. Métodos explícitos y métodos implícitos

- Los métodos explícitos calculan la aproximación de la función en cada punto empleando únicamente la información de instantes anteriores.
- Los métodos implícitos calculan la aproximación de la función en cada punto empleando la información de instantes tanto anteriores como futuros, por lo que a menudo involucran algoritmos iterativos.

4. Métodos de diferencias finitas y métodos de elementos finitos

- Los métodos de diferencias finitas calculan la aproximación de la ecuación diferencial en los puntos de una malla empleada para discretizar el dominio. Generalmente son modelos más simples y sencillos en su implementación.
- Los métodos de elementos finitos resultan más complejos al dividir el dominio en distintos elementos y calcular las aproximaciones como combinaciones lineales de funciones definidas en cada elemento finito. El beneficio que aportan esta clase de métodos es su mayor flexibilidad.

No obstante, existen otras clasificaciones y enfoques para describir estos métodos. Un aspecto común a todos ellos es su proceso de aplicación para la resolución de un sistema de ecuaciones diferenciales. Independientemente del método elegido, se deberá comenzar formulando un sistema de ecuaciones que describa un comportamiento determinado, basado en leyes físicas, principios matemáticos o aproximaciones teóricas fundamentadas. El siguiente paso consistirá en la discretización del dominio en el que se busca encontrar la solución del sistema, lo que implica dividir el intervalo de interés en un conjunto de puntos o nodos, donde se calcularán los valores aproximados de las variables. La elección del método numérico en cuestión dependerá de factores como la precisión deseada, la estabilidad del método o la complejidad del sistema con el que se trabaje (LeVeque, 2007; Strikwerda, 1990).

3.4.1. Métodos Runge-Kutta

Los métodos Runge-Kutta son un conjunto de algoritmos utilizados para resolver EDO de manera numérica. Fueron desarrollados por los matemáticos alemanes Carl Runge y Martin Wilhelm Kutta a principios del siglo XX y hoy en día son uno de los métodos más populares. Se basan en el cálculo de una serie de incrementos empleando una función que representa una ecuación diferencial, evaluándola en diferentes puntos y combinando estas soluciones para obtener una aproximación de la solución en el siguiente punto de la malla (Hairer et al., 2008; LeVeque, 2007).

El número de etapas de estos métodos indica el número de veces que se evaluará la función determinada en cada paso. Un método Runge-Kutta de m etapas tendrá la siguiente forma:

$$y_{n+1} = y_n + h \sum_{i=1}^m b_i k_i . \quad (5)$$

Siendo h el tamaño de paso y $k_i = f(t_n + hc_i, y_n + \sum_{j=1}^m a_{ij}k_j)$. Los valores t_n representan los valores en los que se discretiza la variable independiente t y los valores y_n las aproximaciones a la solución exacta en t_n . El orden del método será p si los errores globales se comportan como h^p .

Los coeficientes a_{ij} , c_i y b_i son los coeficientes del método. Estos se eligen intentando conseguir el mayor orden posible, a la vez que se procura garantizar otras propiedades que puedan interesar, como la estabilidad o la precisión de sus resultados (Hairer et al., 2008).

Existen numerosas variantes de estos métodos, en función del orden empleado, de si se implementan con paso fijo o variable o de si son explícitos o implícitos. Estos últimos involucran la resolución de ecuaciones no lineales en cada uno de los pasos, proporcionando una mayor estabilidad. Las variantes del método permiten el ajuste del tamaño de paso de acuerdo con el error estimado en cada paso, logrando un balance entre la precisión y la eficiencia computacional al adaptar tamaños de paso superiores ante errores pequeños y tamaños de paso menores ante errores grandes. En definitiva, la gran variedad de estos métodos ofrece flexibilidad y adaptabilidad en la resolución de EDOs, permitiendo ajustar la precisión y eficiencia según las necesidades específicas del problema. Resultará importante seleccionar la variante adecuada en función de las características de las EDOs, los requisitos de precisión y los recursos computacionales disponibles.

3.4.2. Ecuaciones rígidas y estabilidad de los métodos

Las ecuaciones con las que trabajaremos en el desarrollo del modelo son conocidas como ecuaciones rígidas o *stiff*, las cuáles son un tipo particular de EDOs. Se caracterizan, por ejemplo, por presentar una gran diferencia en las escalas temporales de los diferentes términos de la solución, lo cual significa que ciertos de estos términos evolucionan de manera muy rápida en comparación con otros, o que existen oscilaciones muy fuertes de la solución. Como resultado, las ecuaciones rígidas pueden presentar ciertas dificultades en su resolución debido a la sensibilidad al tamaño de paso empleado y su inestabilidad numérica (LeVeque, 2007).

Los métodos que se emplean para resolver problemas rígidos son métodos con una región de estabilidad no acotada, para no estar obligados a tomar espaciados muy pequeños a causa de la estabilidad. Desafortunadamente los métodos explícitos no tienen esta propiedad, por lo que hay que recurrir a métodos implícitos, que tienen un mayor coste computacional en cada paso ya que involucran la resolución de ecuaciones no lineales, pero a cambio permiten dar un menor número de pasos. El método de Euler implícito, el método de Crank-Nicolson y el método de diferenciación hacia atrás son algunos ejemplos de esta clase de métodos (Hairer et al., 2008; LeVeque, 2007). Entre ellos, destacamos el método de diferenciación hacia atrás o *Backward Differentiation Formula* (BDF). Esta clase de métodos se basan en la aproximación de las derivadas temporales utilizando diferencias propagadas hacia atrás. En general, un método BDF de orden k utiliza k puntos previos en el cálculo de la derivada temporal en el siguiente paso. Esto implica establecer una relación entre los valores de las variables en los pasos anteriores y el valor en el paso actual (Cash, 2015).

Las fórmulas BDF se obtienen mediante la aproximación polinomial de los términos de derivadas temporales en función de los puntos previos. Estas fórmulas pueden derivarse a partir de la interpolación de Lagrange o mediante enfoques de ajuste de mínimos cuadrados. Debido a que los métodos BDF son una clase de métodos numéricos implícitos lineales multipaso, en cada paso de integración se requiere la resolución de un sistema ecuaciones no lineales. Este método se define de acuerdo con la siguiente expresión (Cash, 2015; Celaya, n.d.):

$$\sum_{j=0}^k \alpha_j y_{n+j} = h f(t_{n+k}, y_{n+k}). \quad (6)$$

Siendo k el número de pasos, valor que coincide con el orden del método; α_j son los coeficientes del método y h el tamaño de paso. La resolución de estas ecuaciones se puede llevar a cabo mediante métodos iterativos como el método de Newton o el método de punto fijo.

Existen diferentes variantes de los métodos BDF, como el BDF1, BDF2, BDF3, entre otros, que difieren en el número de puntos previos utilizados en la fórmula de interpolación, en la precisión y el orden alcanzados. La elección del método BDF adecuado dependerá de la rigidez de la ecuación, la precisión requerida y la eficiencia computacional.

Los métodos BDF son $A(\alpha)$ -estables, es decir, tienen una región de estabilidad no acotada que se corresponde a una cuña de un ángulo (α). Cuanto mayor es el orden del método, menor será el ángulo de su región de estabilidad (Gander & Wanner, 2020). La propuesta de Celaya, n.d. explica detalladamente las condiciones de estabilidad de los métodos BDF, resumiéndose en la *Tabla (1)* los coeficientes de los mismos, así como en la *Tabla (2)* la $A(\alpha)$ -estabilidad de los métodos BDF. Por último, en la *Figura (2)* (Gander & Wanner, 2020) se muestran las regiones de estabilidad de los métodos BDF desde orden 1 hasta orden 6.

Tabla 1. Coeficientes de los métodos BDF (Celaya, n.d.).

k	α_0	α_1	α_2	α_3	α_4	α_5	α_6
1	-1	1					
2	$\frac{1}{2}$	-2	$\frac{3}{2}$				
3	$-\frac{1}{3}$	$\frac{3}{2}$	-3	$\frac{11}{6}$			
4	$\frac{1}{4}$	$-\frac{4}{3}$	3	-4	$\frac{25}{12}$		
5	$-\frac{1}{5}$	$\frac{5}{4}$	$-\frac{10}{3}$	5	-5	$\frac{137}{60}$	
6	$\frac{1}{6}$	$-\frac{6}{5}$	$\frac{15}{4}$	$-\frac{20}{3}$	$\frac{15}{2}$	-6	$\frac{147}{60}$

Tabla 2. $A(\alpha)$ -estabilidad de los métodos BDF (Celaya, n.d.).

k	1	2	3	4	5	6
$A(\alpha)$	90°	90°	86.03°	73.35°	51.84°	17.84°

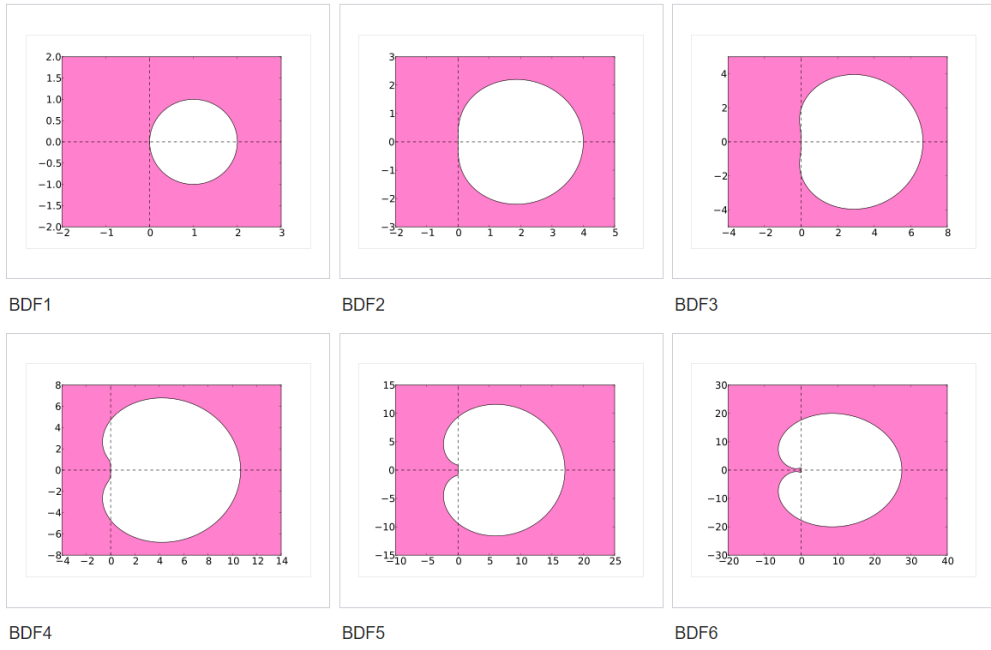


Figura 2. Regiones de estabilidad de los distintos métodos BDF (Gander & Wanner, 2020).

Parte 2. Trabajo desarrollado

Capítulo 4.

Marco teórico

4.1. Estado del arte de modelos previos

La regulación del potencial de membrana en VSMC ha sido simulada en los últimos años gracias al desarrollo de modelos computacionales con enfoques diversos. Sin embargo, es común que estos se limiten al estudio de ciertos transportadores o mecanismos de señalización concretos. Entre ellos, resulta habitual el enfoque hacia las vías moduladoras del $[Ca^{2+}]_i$ debido a la importancia que presenta su concentración en la regulación y mantenimiento del tono vascular. A pesar de que este no constituye un sistema simple de modelar por sus múltiples y complejas dependencias con uniones intra e intercelulares, el desarrollo de programas matemáticos simplifica significativamente su estudio e investigación (Kapela et al., 2008). De esta manera, los modelos cuantitativos se han convertido en una importante herramienta en el análisis de dinámicas celulares de este calibre.

Dentro de este ámbito, los modelos más primitivos definían dos compartimentos de almacén de $[Ca^{2+}]_i$, el primero de ellos dependiente de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) (Low et al., 1992) y el segundo considerado como el mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , mejor conocido por sus siglas en inglés CIRC (*Ca²⁺ induced by Ca²⁺ release*) (Saida, 1981). No obstante, estos eran meramente descriptivos y generalmente no aplicables a células excitables (Putney, 1990).

En 1993, Wong & Klassen publicaron el primer modelo capaz de describir la regulación genérica del calcio en SMC, al ser estimuladas con noradrenalina (NA) o ante una despolarización. Entre sus características, detallaba los procesos de generación de IP_3 regulado por agonistas como la noradrenalina, el mecanismo CIRC o el mantenimiento de las reservas intracelulares de Ca^{2+} (Wong & Klassen, 1993). Este fue depurado y ampliado por los mismos autores 3 años después, incluyendo canales de potasio dependientes de voltaje y añadiendo un estudio de la actividad eléctrica de los cambios inducidos por endotelina (ET1). De esta manera, con esta actualización pretendían explicar mecanismos más complejos, como la potencia vasoconstrictora de ET1 y la conductancia de canales iónicos no selectivos. Además, comenzaron a profundizar en la regulación de los parámetros que influyen en el potencial de membrana, concluyendo que reducciones de la capacitancia fisiológica de la membrana celular ($1 \mu F/cm^2$) resultaban en oscilaciones significativas del potencial de membrana y del Ca^{2+}_i (Wong & Klassen, 1993).

El modelo de Goldbetert et al. (1990) acerca de la vasomoción arterial fue ampliado por Parthimos et al. (1999), ambos basados en los dos compartimentos básicos con el fin de explicar variaciones en la concentración de Ca^{2+}_i .

Sin embargo, Parthimos et al. (1999) determinaron que, si el objetivo a largo plazo de estos modelos matemáticos era describir exhaustivamente el comportamiento celular y reproducir experimentos complejos, estos deberían incluir sistemas no lineales acoplados de interacción tanto a nivel intracelular como con la membrana, que simulen la liberación cíclica de Ca^{2+} desde depósitos del interior de la célula y la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. Por ello, introdujeron variables descriptoras de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y canales de K^+ activados por Ca^{2+} .

A su vez, este modelo fue modificado por Koenigsberger et al. (2004) al eliminar el oscilador de la membrana plasmática. Basándose en otros modelos previos (Christ et al., 1992), acoplaron la importancia de las uniones gap (*gap-junctions*) en la comunicación intercelular entre SMC, considerando estas indispensables en la sincronización de variaciones en el calcio. Así mismo, se consideran en este modelo distintas opciones como responsables de dicha sincronización, entre las que se incluyen el acoplamiento eléctrico, las regulaciones de IP_3 y la difusión de calcio. Tras estudiar el comportamiento celular de cada mecanismo, se determinó que el acoplamiento eléctrico es un potencial determinante de la generación y desincronización de las concentraciones de calcio, así como que el papel del IP_3 no es tan relevante en estos procesos. Estos resultados permitieron concluir que la contracción y el movimiento de los vasos sanguíneos involucrados son dependientes del acoplamiento y sincronización de poblaciones de SMC.

En conjunto, la evolución de estos modelos ya recogía gran parte de la complejidad de los procesos, permitiendo reproducir numerosas condiciones experimentales mediante la aplicación de pequeños cambios en los parámetros involucrados en la electrofisiología de la membrana, la regulación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la fosforilación de la miosina u otras variables de la mecánica celular. Yang et al. (2003) combinaron estos factores electrofisiológicos, bioquímicos y mecánicos en un único modelo, aplicado a SMC de arterias cerebrovasculares de rata. Concentraron la información disponible en estudios anteriores en dos subsistemas separados. El primero de ellos describía un modelo electroquímico, basado en el modelo de membrana de Hodgkin-Huxley y del retículo sarcoplásmico; incluyendo balances de especies iónicas mediante canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, diversos canales de potasio, canales sensibles al estiramiento y bombas como la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ y la $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$. El segundo subsistema incluía dos redes acopladas, encargadas de la fosforilación de la miosina y de la generación y mantenimiento de la fuerza celular. Tras probar cada subsistema por separado y comparar los resultados con datos de experimentos realizados con la técnica de *voltaje-clamp*, se pudo corroborar la precisión del modelo electromecánico en la simulación de oscilaciones en el potencial de membrana y cambios inducidos en las corrientes de Ca^{2+} ; así como un buen ajuste en los resultados obtenidos con el modelo electroquímico.

Un enfoque diferente es aportado por (Bennett et al., 2005), generando un modelo cuantitativo que simula los aspectos más representativos de la contracción de los vasos sanguíneos. A pesar de no incluir demasiados elementos, consigue modelar la respuesta contráctil causada por NA, con la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos por IP_3 , así como la inhibición de los mismos ante el aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Estos componentes resultan suficientes para incluir los mecanismos de contracción inducida por Ca^{2+} en una única SMC y en la pared arterial completa. No obstante, los propios autores indican la necesidad de incorporar en un solo modelo todos los elementos que influyen en el movimiento de calcio entre los espacios intra y extracelulares, con el fin de conseguir una visión completa de la fisiopatología celular al detalle.

Finalmente, Kapela et al. desarrollan en 2008 uno de los modelos computacionales más completos hasta la fecha, describiendo cuatro aspectos principales: la electrofisiología de la membrana plasmática, la toma y liberación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico, el balance iónico de Ca^{2+} , Na^+ , K^+ y Cl^- , así como la formación de IP_3 y guanosin-3',5'-monofosfato cíclico (cGMP) tras la estimulación de SMC de arterias mesentéricas de rata con fármacos como norepinefrina (NE) y óxido nítrico (NO). De esta manera, consiguen reunir en un solo modelo gran parte de los aspectos involucrados en la regulación del potencial de membrana, incorporando los compartimentos necesarios y describiéndolos mediante 27 ecuaciones diferenciales. Con ello, se logra generar un modelo exhaustivo con un gran número de parámetros, los cuales han sido estimados de manera experimental o cedidos de otros estudios previos, obteniendo así un sistema integrado que permite simular numerosas condiciones y protocolos a la vez que se estudian las esperadas respuestas fisiológicas de las células involucradas (Kapela et al., 2008).

No obstante, aún queda mucho trabajo por desarrollar para poder seguir generando modelos más precisos y detallados, puesto que resulta complejo incluir en un solo modelo todas las variables de las que es dependiente la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o el potencial de membrana.

En líneas generales, el modelo de Kapela et al. (2008) recoge gran parte del conocimiento de estos mecanismos, destacando de nuevo la importancia de la comunicación intercelular a través de las *gap junctions*, ya descritas en los modelos más primitivos. Sin embargo, se limita a la estimulación con NE y su análisis en tiempos cortos, provocando un aumento esperado en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y a la reducción de la misma tras aplicar NO, por lo que resultaría interesante generalizar su aplicación y adaptarlo para diferentes fármacos y tratamientos, así como ampliarlo para protocolos de mayor duración.

4.2. Análisis de los requisitos del modelo computacional

La existencia de un modelo computacional adaptado a un área de conocimiento concreto permite predecir, describir y explicar detalladamente ciertos fenómenos o situaciones que resultarían ineficientes o difícilmente reproducibles en la vida real. Por ello, a la hora de diseñarlos, se debe procurar incluir todos aquellos aspectos relevantes que consigan construir un modelo preciso y útil. Esto permitirá aplicarlo de manera eficaz para estudiar relaciones desconocidas, extraer propiedades de las relaciones entre los elementos que lo componen y simular protocolos de manera ágil, reduciendo los tiempos y evitando los costes económicos que supone realizarlo en el laboratorio.

Modelar cualquier sistema es un proceso cíclico similar a la aplicación del método científico. En cada una de las etapas de la construcción del modelo se deben realizar ciertas verificaciones y revisiones de las fases precedentes. La primera fase y la fundamental consiste en el análisis exhaustivo del problema, con el fin de identificar sus características de manera precisa y definir los problemas o preguntas que se pretenden resolver con su simulación.

El modelo a diseñar será un problema determinista, dinámico, no lineal y no estacionario, por lo que el objetivo consistirá en encontrar el conjunto de expresiones matemáticas en forma de ecuaciones diferenciales que simulen las condiciones de una VSMC de ratón.

La formulación del modelo propiamente dicho es la siguiente etapa y será la responsable de la abstracción del sistema. Esta fase involucra tareas como la recogida de datos y la realización de simplificaciones sobre la entidad real. Así mismo, se definirán las ecuaciones y variables involucradas en las mismas, junto con las expresiones matemáticas que gobiernan las relaciones entre ellas. Cuando el modelo genérico ya esté formulado, deberemos implementarlo y resolverlo mediante distintos métodos numéricos apropiados para las características del mismo.

Por último, tras obtener los resultados de la simulación, estos se verificarán e interpretarán, asegurando el buen funcionamiento del modelo. Con el fin de que este pueda ser comprendido y utilizado posteriormente por otros autores, se suele incluir una etapa de documentación, que cubra todas las fases del proceso de modelado. Es común que algunas de estas se desarrollen de manera simultánea, por ejemplo, documentando el modelo desde su inicio. En sistemas tan complejos y completos como el de este trabajo, esto resultará fundamental para poder justificar todas las adaptaciones realizadas, así como para explicar las simplificaciones o suposiciones tenidas en cuenta.

Una vez conocidas las fases generales involucradas en el diseño del modelo general, en los siguientes apartados se desglosarán cada una de las etapas llevadas a cabo, justificando los cambios implementados sobre modelos previamente publicados y explicando las simplificaciones consideradas como parte de la abstracción. No obstante, cabe destacar que uno de los objetivos específicos del trabajo era adaptar dicho modelo general a dos cepas de ratones: normotensa o BPN e hipertensa o BPH. La consecución de este objetivo se enfocó mediante el ajuste de ciertos parámetros, como la conductancia de la célula completa o la permeabilidad de los canales de potasio; con el fin de ajustar la despolarización inicial del potencial de membrana de cada submodelo. De esta manera, se consiguió adaptar un submodelo con un potencial de membrana despolarizado a -55 mV, correspondiente a ratones BPN, y otro modelo ajustado a -60 mV para BPH, tal y como sugerían experimentos de modelos previos (Moreno-Domínguez et al., 2009; Tajada et al., 2012). Sin embargo, tras realizar sucesivas simplificaciones y suposiciones sobre el modelo genérico, se descartó esta idea debido a la complejidad en el ajuste de los parámetros y la falta de precisión en los resultados. La no linealidad y la realimentación de las ecuaciones supusieron una limitación en este proceso. Por esta razón, el trabajo se centró en el diseño de un único modelo computacional sobre el que se aplican y simulan los diversos protocolos, relacionando los resultados obtenidos con el mismo con la posible asociación con ratones BPN y BPH. Este modelo será descrito en profundidad en el siguiente capítulo.

Capítulo 5.

Materiales y métodos

5.1. Diseño del modelo computacional

El diseño del modelo se estructura siguiendo las recomendaciones generales de los modelos previos propuestos por Kapela et al. (2008) y Bennett et al. (2005). De esta manera, se tendrán en cuenta tres componentes o compartimentos principales en nuestro modelo de SMC: la membrana plasmática, el almacenamiento intracelular de calcio y el citosol.

La membrana plasmática de la SMC cuenta con canales iónicos, bombas, intercambiadores y diversos receptores que facilitan el intercambio de iones a través de la bicapa lipídica, los cuales son integrados en el modelo, simulándolos con las diversas ecuaciones diferenciales. De esta manera, se incluyen los flujos de las principales corrientes estudiadas en SMC de arteriolas mesentéricas en modelos de rata, así como sus dependencias e influencias sobre otros parámetros. Entre los canales iónicos, encontramos los siguientes: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOCC), canales de potasio (activados por Ca^{2+} de alta conductancia (BK_{Ca}), dependientes de voltaje (K_v) e independientes de voltaje (*leak*, K_{leak}), canales catiónicos no selectivos (NSC) y canales catiónicos dependientes de almacenamiento (SOC). Así mismo, se tienen en cuenta las bombas $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (NaK) y la $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ (PMCA) de la membrana plasmática. Además, también se describirán las correspondientes relaciones para el intercambiador $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ (NCX) y para una adaptación de un sistema de transporte activo de cloruro (bCl).

El almacenamiento intracelular de calcio se representa fundamentalmente a partir del retículo sarcoplásmico (*sarcoplasmic reticulum*, SR), el cual contiene su bomba $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ propia (SERCA), así como canales de Ca^{2+} receptores de IP_3 (IP_3R) y de rianodina (RyR). Por otra parte, también deberá incluir una corriente de fuga de potasio (*K-leak*) y un sistema tampón de calcio por calsecuestrina (CSQN).

El citosol representa el medio intracelular, en el que se incluirán mecanismos como la formación de IP_3 y diacilglicerol (DAG) a partir de la activación de los α_1 -adrenoreceptores. Estos componentes forman parte del modelo con el fin de poder simular algunos protocolos como la estimulación por un agonista (NE), provocando la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y el flujo de corriente a través de los canales NSC.

A diferencia del modelo original, no se incluirán las ecuaciones que describen la formación de cGMP, ni los efectos de la estimulación con NO, lo que nos permitirá eliminar dos ecuaciones diferenciales de dicho modelo inicial, las correspondientes a la tasa máxima de producción de cGMP (VcGMP) y la del propio cGMP.

Así mismo, se eliminarán las ecuaciones diferenciales correspondientes con los balances iónicos de sodio ($[Na^+]_i$) y potasio ($[K^+]_i$) intracelular, junto con la ecuación del PIP_2 , suponiendo que los valores de estas variables permanecen constantes e inmodificables durante el tiempo. También será necesario fijar la ecuación del cloruro ($[Cl^-]_i$) intracelular durante algunos protocolos.

Por otra parte, se añadirán dos ecuaciones adicionales, extraídas del modelo planteado por Bennett et al., (2005), que permitirán reproducir las condiciones de la contracción a partir de las concentraciones totales de miosina (M) y de actina (A) unida a miosina fosforilada (M_p). De esta manera, nuestro modelo contará con 22 ecuaciones diferenciales, cuyos parámetros deberán ser especificados en base a los datos conocidos hasta la actualidad en modelos de ratón y rata. Así mismo, también deberán definirse las condiciones iniciales del mismo y distintos protocolos o simulaciones que permitan comprobar que el funcionamiento del programa se asemeja a los resultados esperados en experimentos reales.

Un diagrama esquemático de los principales componentes del modelo y las relaciones entre ellos se muestra en la *Figura (3)*.

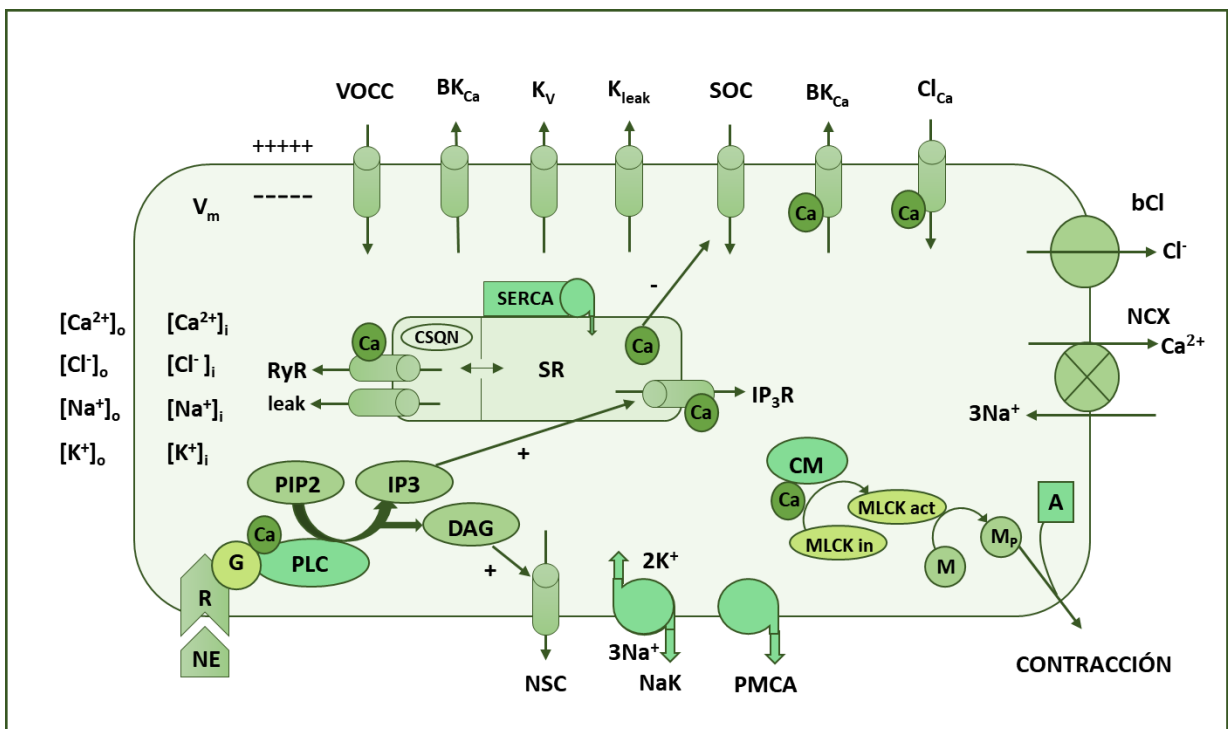


Figura 3. Diagrama esquemático de los componentes del modelo y las interacciones entre ellos.

5.2. Ecuaciones del modelo computacional

El modelo incluye 22 ecuaciones diferenciales, que describen los principales componentes y mecanismos de la SMC. Se plantea a continuación un modelo genérico de expresiones matemáticas, que será adaptado mediante el ajuste de sus parámetros, los cuáles se discutirán posteriormente.

Antes de presentar las ecuaciones generales, se muestran los potenciales de equilibrio de las principales especies iónicas presentes en el citosol, descritos en el modelo de Kapela et al. (2008). Estos se indican al inicio del modelo, ya que intervendrán en algunas de las corrientes y relaciones descritas posteriormente (*Ecuaciones (7-10)*).

$$\begin{aligned} E_K &= \frac{RT}{z_K F} \ln \left(\frac{[K]_o}{[K]_i} \right); E_{Na} = \frac{RT}{z_{Na} F} \ln \left(\frac{[Na]_o}{[Na]_i} \right); \\ E_{Ca} &= \frac{RT}{z_{Ca} F} \ln \left(\frac{[Ca]_o}{[Ca]_i} \right); E_{Cl} = \frac{RT}{z_{Cl} F} \ln \left(\frac{[Cl]_o}{[Cl]_i} \right). \end{aligned} \quad (7-10)$$

5.2.1. Electrofisiología de la membrana

De acuerdo con Kapela et al. (2008), la regulación de la electrofisiología de la membrana celular en SMC se ajusta al modelo de Hodgkin y Huxley, donde se describe el inicio y transmisión de potencial de acción. De esta manera, la primera ecuación diferencial del modelo refleja los cambios en el potencial de membrana (V_m) con la relación expresada en la *Ecuación (11)*.

$$\frac{dV_m}{dt} = -\frac{1}{C_m} (I_{VOCC} + I_{Kv} + I_{BKCa} + I_{Kleak} + I_{NSC} + I_{SOC} + I_{ClCa} + I_{PMCA} + I_{NaK} + I_{NCX}). \quad (11)$$

Se representa la capacitancia (C_m) en el denominador, resultante de la acumulación de potencial eléctrico en la membrana. En el numerador aparecen las corrientes involucradas en la modulación del potencial eléctrico (I_{VOCC} , I_{Kv} , I_{BKCa} , I_{Kleak} , I_{NSC} , I_{SOC} , I_{ClCa} , I_{PMCA} , I_{NaK} , I_{NCX}), las cuales se desglosaran en los siguientes apartados. Cabe resaltar que en la *Ecuación (11)* no se incluyen otras corrientes, como flujos iónicos a través del clásico cotransportador de sodio-potasio-cloruro, puesto que dicho proceso se considera electroneutro y no interviene en la determinación de V_m .

5.2.1.1) Canales de calcio dependiente de voltaje

Las variaciones en las concentraciones de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) son las encargadas de regular los mecanismos contráctiles en las SMC. Por ello, se considera fundamental incluir en el modelo una corriente de calcio operada por voltaje (I_{VOCC}) como una de las responsables de los mecanismos de contracción y del mantenimiento del tono vascular, ya que esta será la principal vía de entrada de Ca^{2+} en las células excitables.

Estos canales pueden modelarse teniendo en cuenta sus posibles configuraciones, partiendo de un estado de reposo, activándose ante despolarizaciones que causan la apertura del canal y permiten la entrada de calcio, para finalmente cerrarse al inactivarse.

De esta manera, se considera que los canales VOCC tipo L se abren de manera rápida ante despolarizaciones del potencial de membrana; mientras que su inactivación constituye un proceso dependiente tanto del voltaje como del calcio presente. Debido a que la proporción de tiempo que estos canales de calcio permanecen en su configuración abierta es regulada por el potencial de membrana, en el modelo de Nelson et al., (1990) ya se indican las probabilidades de estado abierto (*open-state*) como dependientes tanto del tiempo como del voltaje. Sin embargo, en el modelo de Kapela et al. (2008) se indica que la inactivación de los canales para potenciales de membrana positivos se considera independiente de la concentración de $[Ca^{2+}]_i$, por lo que no se incluye esta dependencia en las Ecuaciones (13-16) (Harhun et al., 2000).

Teniendo esto en cuenta, I_{VOCC} se modela como una corriente Goldman-Hodgkin-Katz (GHK), distinguiendo su expresión en aquellos puntos donde se cumpla la condición $V_m = 0$. Por otra parte, las Ecuaciones (17-18) representan las ecuaciones diferenciales que modulan el estado de los canales, siendo d_L representativa del estado de compuerta abierta y f_L de compuerta cerrada.

$$\begin{cases} I_{VOCC} = 10^6 A_m P_{VOCC} d_L f_L V_m z_{Ca} F ([Ca]_o - [Ca]_i) [pA], & \text{para } V_m = 0. \\ I_{VOCC} = 10^6 A_m P_{VOCC} d_L f_L V_m \frac{(z_{Ca} F)^2 [Ca]_o - [Ca]_i \exp(V_m z_{Ca} F / RT)}{1 - \exp(V_m z_{Ca} F / RT)} [pA], & \text{para } V_m \neq 0. \end{cases} \quad (12)$$

$$\bar{d}_L = \left(1 + \exp\left(-\frac{V_m}{8.3 \text{ mV}}\right)\right)^{-1}; \quad \bar{f}_L = \left(1 + \exp\left(\frac{V_m + 42.0 \text{ mV}}{9.1 \text{ mV}}\right)\right)^{-1}. \quad (13, 14)$$

$$\tau_{d_L} = 2.5 \exp\left(-\left(\frac{V_m + 40 \text{ mV}}{30 \text{ mV}}\right)^2\right) + 1.15 [ms]; \quad \tau_{f_L} = 65 \exp\left(-\left(\frac{V_m + 35 \text{ mV}}{25 \text{ mV}}\right)^2\right) + 45 [ms]. \quad (15, 16)$$

$$\frac{dd_L}{dt} = \frac{\bar{d}_L - d_L}{\tau_{d_L}}; \quad \frac{df_L}{dt} = \frac{\bar{f}_L - f_L}{\tau_{f_L}}. \quad (17, 18)$$

5.2.1.2. Canales de potasio activados por calcio

Entre los distintos tipos de canales de potasio que podemos describir en el modelo de SMC encontramos los canales de potasio activados por calcio (BK_{Ca}), cuya activación ha sido demostrado ser causada por $[Ca^{2+}]_i$. La corriente de potasio a través de los canales BK_{Ca} (I_{BKCa}) se describe también como una ecuación GHK (Ecuación (19)), de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de Mistry & Garland, (1998).

Las constantes de activación y la probabilidad de estado abierto de las mismas son extraídas del modelo experimental generado por Benham et al. (1986). Los efectos del cGMP y NO incluidos en modelos como el de Kapela et al. (2008) son excluidos de las ecuaciones planteadas.

$$I_{BKCa} = A_m N_{BKCa} P_{KCa} i_{KCa} [pA]. \quad (19)$$

$$P_{KCa} = 0.17 p_f + 0.83 p_s. \quad (20)$$

$$i_{KCa} = 10^6 P_{BKCa} V_m \frac{F^2 [K]_o - [K]_i \exp(V_m F / RT)}{RT (1 - \exp(V_m F / RT))} [pA]. \quad (21)$$

En este caso, se modela la probabilidad de apertura de los canales en el estado estacionario en la *Ecuación (22)*, siendo esta una expresión dependiente tanto del potencial de membrana como del calcio (incluido en la *Ecuación (23)*). Finalmente, se obtienen las ecuaciones diferenciales representativas de los estados abierto y cerrado de los canales BK_{Ca} en las *Ecuaciones (24, 25)*.

$$\bar{p}_o = \left(1 + \exp\left(-\frac{V_m - V_{1/2KCa}}{18.25 \text{ mV}}\right) \right)^{-1}. \quad (22)$$

$$V_{1/2KCa} = -41.7 \log_{10}([Ca]_i) - 128.2. \quad (23)$$

$$\frac{dp_f}{dt} = \frac{\bar{p}_o - p_f}{\tau_{p_f}}; \quad \frac{dp_s}{dt} = \frac{\bar{p}_o - p_s}{\tau_{p_s}}. \quad (24, 25)$$

5.2.1.3. Canales de potasio dependientes de voltaje

A pesar de la existencia de otros canales, los principales flujos de iones K⁺ desde la célula hacia el espacio extracelular son mediados por canales de potasio dependientes de voltaje (K_v), que a su vez participan en la regulación del potencial de membrana en condiciones de reposo (Lu et al., 2001). La corriente a través de estos canales (I_{Kv}) ha sido representada de diversas maneras en modelos previos, algunos de ellos incluyendo tres componentes en la misma (componente transitorio de inactivación rápida, lenta y componente de no inactivación) (Nelson et al., 1990). En este caso, a la hora de diseñar un modelo específico para SMC, se ha considerado, de acuerdo con la propuesta de Kapela et al. (2008), un único tipo de canales K_v, representados con la *Ecuación (29)*.

Por esta razón, se incluye en el modelo la corriente I_{Kv} (*Ecuación (26)*), junto a las curvas correspondientes a la activación e inactivación en el estado estacionario (*Ecuaciones (27 y 30)*) descritas como ecuaciones de Boltzmann. Las ecuaciones representativas de este subsistema del modelo son tomadas de Kapela et al. (2008), pudiendo observar en ellas la dependencia con el potencial de membrana y con el potencial de equilibrio del potasio (E_K).

Las constantes de inactivación rápida y lenta de los canales, empleadas en las *Ecuaciones (31, 32)* proceden del modelo de Lu et al., (2001) así como el resto de parámetros empleados.

$$I_{Kv} = g_{Kv} p_K (0.45q_1 + 0.55q_2)(V_m - E_K) [pA]. \quad (26)$$

$$\bar{p}_K = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{V_m + 11.0 \text{ mV}}{15.0 \text{ mV}}\right)}; \quad \tau_{p_K} = 61.5 \exp(-0.027 V_m) [ms]. \quad (27, 28)$$

$$\frac{dp_K}{dt} = \frac{\bar{p}_K - p_K}{\tau_{p_K}}. \quad (29)$$

$$\bar{q} = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{V_m + 40.0 \text{ mV}}{14.0 \text{ mV}}\right)}. \quad (30)$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{\bar{q} - q_1}{\tau_{q_1}}; \quad \frac{dq_2}{dt} = \frac{\bar{q} - q_2}{\tau_{q_2}}. \quad (31, 32)$$

5.2.1.4. Fuga de K⁺ sin especificar

Los canales de potasio inhibidos por ATP intracelular se han encontrado en diferentes tipos de tejidos, sugiriendo la presencia de los mismos en SMC. Estos canales adoptan una configuración abierta ante ciertos vasodilatadores responsables de la hiperpolarización de la membrana plasmática (como podrían ser cromakalim, pinacidil o minoxidil), mientras que son inhibidos por ATP citosólico (Nelson & Quayle, 1995). Por ello, se sugiere su contribución en el potencial de membrana en reposo, incluyendo la corriente a través de ellos como una corriente de fuga de K⁺ (I_{Kleak}), tal y como se describe en Kapela et al. (2008).

La ecuación que lo define (*Ecuación (33)*) incluye una conductancia (g_{Kleak}) de carácter lineal, basada en los resultados de Nelson & Quayle, (1995); por lo que I_{Kleak} solo muestra dependencias con dicha conductancia, el potencial de membrana y el potencial de equilibrio de K⁺.

$$I_{Kleak} = g_{Kleak} (V_m - E_K) [pA]. \quad (33)$$

5.2.1.5. Canales catiónicos no selectivos

Los canales catiónicos no selectivos (*non-selective channels, NSC*) son aquellos sensibles a ATP y a ciertos cationes presentes en los medios intra y extracelular, siendo los responsables de la elevación de los niveles de calcio en SMC. Se ha demostrado cómo la estimulación de estas células con NE provoca la activación de dichos canales, despolarizando de la membrana plasmática e induciendo una corriente I_{VOC} , que finalmente provocará el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (Kapela et al., 2008).

Bajo la hipótesis de que las concentraciones de DAG e IP₃ son equivalentes, se incluyen en el modelo las distintas corrientes de los canales NSC como ecuaciones que siguen la cinética de Michaelis-Menten (*Ecuaciones (35-37)*), dependientes del DAG. La suma de las corrientes NSC de sodio, potasio y calcio da lugar a la expresión de la corriente total de los canales NSC (I_{NSC}) (*Ecuación (34)*). También se define la probabilidad de apertura de dichos canales (P_{oNSC}) (*Ecuación (38)*) como una variable dependiente de la probabilidad mínima de apertura de los mismos y del potencial de membrana (Kapela et al., 2008).

$$I_{NSC} = I_{NaNSC} + I_{KNSC} + I_{CaNSC} [pA]. \quad (34)$$

$$I_{NaNSC} = 10^6 A_m \left(\frac{[DAG]}{[DAG] + K_{NSC}} + d_{NSCmin} \right) P_{oNSC} P_{NaNSC} V_m \frac{F^2 [Na]_o - [Na]_i e\left(\frac{V_m F}{RT}\right)}{1 - e\left(\frac{V_m F}{RT}\right)}. \quad (35)$$

$$I_{KNSC} = 10^6 A_m \left(\frac{[DAG]}{[DAG] + K_{NSC}} + d_{NSCmin} \right) P_{oNSC} P_{KNSC} V_m \frac{F^2 [K]_o - [K]_i e^{\left(\frac{V_m F}{RT}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{V_m F}{RT}\right)}} [pA]. \quad (36)$$

$$I_{CaNSC} = 10^6 A_m d_{NSCmin} P_{oNSC} P_{CaNSC} V_m \frac{(z_{Ca} F)^2 [Ca]_o - [Ca]_i e^{\left(\frac{V_m F}{RT}\right)}}{1 - e^{\left(\frac{z_{Ca} V_m F}{RT}\right)}} [pA]. \quad (37)$$

$$P_{oNSC} = P_{minNSC} + \frac{1 - P_{minNSC}}{1 + e^{\left(-\frac{V_m - 47.12 \text{ mV}}{24.24 \text{ mV}}\right)}}. \quad (38)$$

La magnitud y dirección de la corriente a través de estos canales catiónicos no selectivos dependen de varios factores, incluidos el gradiente electroquímico de los iones y el estado de los canales. Tal y como se muestra en las ecuaciones, la apertura de los canales no específicos de los cationes representados es un proceso influenciado por el potencial de membrana. En condiciones de reposo, cuando la célula presenta potenciales de membrana negativos, los canales catiónicos no selectivos tienden a estar cerrados. Sin embargo, al aumentar el potencial de membrana, la corriente a través de ellos crece debido a la apertura de los canales. Cuando se abren, permiten el flujo de iones de carga positiva, como sodio, potasio y calcio, a través de la membrana celular, induciendo cambios en el potencial de membrana.

Otro de los factores que contribuye en la modulación de las corrientes NSC es la concentración de DAG presente. El DAG es un lípido secundario que se forma a partir de la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, capaz de activar ciertas proteínas llamadas quinasas C (PKC) que condicionan la actividad de los canales no selectivos.

El efecto de la dependencia de la corriente a través de los canales NSC con el voltaje, así como con la concentración de DAG se muestra en la *Figura (4)*; aplicando DAG = 0 mM en la *Figura (4.A)* y DAG = 0.04 Mm en la *Figura (4.B)*. Cuando el potencial de membrana es negativo, el gradiente electroquímico favorece la entrada de iones positivos a través de los canales, generando una corriente de entrada negativa. Por otro lado, cuando el potencial de membrana se vuelve positivo, se favorecerá la salida de cationes, generando una corriente de salida positiva.

La forma de las corrientes es similar en ambos casos, a diferencia del rango de variación de sus valores. En el caso en el que el DAG es nulo, las PKC no se activarán y no participará en la modulación de los canales. Por esta razón, la corriente a través de ellos no depende del DAG y será controlada por otros factores, como el potencial de membrana o la probabilidad de apertura. Sin embargo, al aplicar un DAG distinto de 0, las quinasas se activarán y modularán los canales, provocando que una mayor cantidad de corriente pase a través de ellos.

Cabe destacar que la corriente I_{CaNSC} , al no depender de DAG, permanecerá igual en ambas situaciones, siendo muy próxima a 0 pA en cualquiera de los casos.

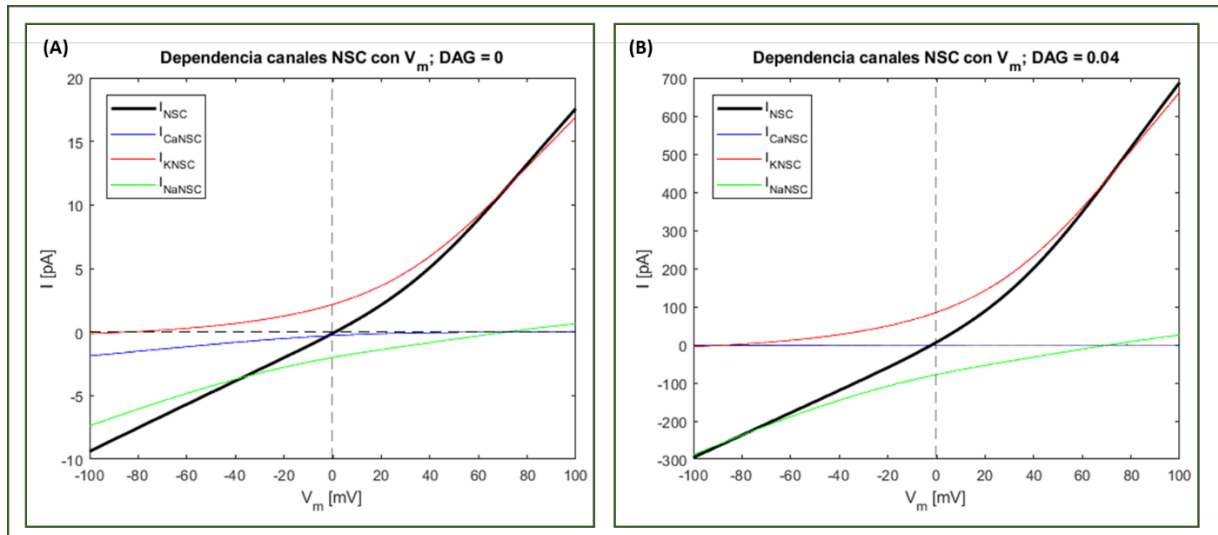


Figura 4. Dependencia de las corrientes NSC con el potencial de membrana y la concentración de DAG.
 (4.A). Variación de las corrientes a través de los canales NSC con el potencial de membrana, para DAG = 0.
 (4.B). Variación de las corrientes a través de los canales NSC con el potencial de membrana, para DAG = 0.04

5.2.1.6. Canales catiónicos no selectivos operados por almacenamiento

Otro de los intercambiadores presentes en SMC son los canales catiónicos no selectivos, permeables a Ca^{2+} , operados por almacenamiento, también conocidos como SOC por sus siglas en inglés (*store-operated channels*). La función de los SOC durante la contracción del músculo liso resultará de especial importancia en nuestro estudio, especialmente durante la exposición a las SMC de agonistas tales como la NE. Cuando esto ocurre, la corriente de Ca^{2+} a través de estos canales aumenta, produciendo un incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y desencadenando los mecanismos responsables de la contracción (Albert & Large, 2003). No obstante, la activación de estos canales solamente resultará significativa en aquellas situaciones en las que el almacenamiento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se encuentre por debajo de los niveles fisiológicos. Es por esto por lo que se indica que estos canales son operados por almacenamiento. Cuando los valores intracelulares son lo suficientemente bajos, debido a la eliminación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ u otras causas, los canales no selectivos serán activados (Albert & Large, 2003; Arnon et al., 2000; Kapela et al., 2008).

El modelo propuesto por Kapela et al. (2008) muestra la representación matemática de la corriente de estos canales (I_{SOC}) como la suma de las corrientes de los cationes Ca^{2+} y Na^{2+} (Ecuaciones (39-41)), basándose a su vez en las conclusiones de Arnon et al. (2000), describiendo el ratio de permeabilidades de Ca^{2+} y Na^{2+} como $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 8.2$. Las correspondientes conductancias de cada componente (g_{SOCCa} , g_{SOCNa}) fueron tomadas de la estimación experimental realizada por Kapela et al. (2008).

Por último, se incluye la probabilidad de apertura de los canales SOC como ecuación diferencial del modelo (Ecuación (44)), descrita como una función sigmoide dependiente de la concentración de calcio en el depósito intracelular, cuya constante de activación media se fija a 100 nM (Arnon et al., 2000; Parekh & Putney, 2005).

$$I_{SOC} = I_{SOCCa} + I_{SOCNa} [pA]. \quad (39)$$

$$I_{SOCCa} = g_{SOCCa} P_{SOC} (V_m - E_{Ca}); \quad I_{SOCNa} = g_{SOCNa} P_{SOC} (V_m - E_{Na}). \quad (40, 41)$$

$$P_{SOC} = \left(1 + \frac{[Ca]_u}{100 \text{ nM}} \right)^{-1}, \quad \bar{P}_{SOC} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[Ca]_u}{K_{SOC}} \right)^{H_{SOC}}}. \quad (42, 43)$$

$$\frac{dP_{SOC}}{dt} = \frac{\bar{P}_{SOC} - P_{SOC}}{\tau_{SOC}}. \quad (44)$$

5.2.1.7. Canales de cloruro activados por calcio

Se ha demostrado la existencia de canales de cloruro activados por calcio y sensibles a cGMP en SMC, tanto dependientes como independientes del cGMP. Estos se diferencian en cuanto a su dependencia con el voltaje y con el tiempo de exposición a distintos inhibidores farmacológicos (Matchkov et al., 2004).

La ecuación que representa la corriente de estos canales (I_{ClCa}) se modela como una ecuación GHK (Ecuación (45)), mostrando la activación de los mismos inducida por Ca^{2+} , pero eliminando la influencia del cGMP presente en modelos previos. Se descarta el uso de la ecuación basada en conductancias presente en el modelo original de Kapela et al. (2008), optando por aplicar la ecuación GHK para poder simular con mayor precisión los cambios en la corriente ante modificaciones en la concentración de $[Cl^-]_i$, ya que el modelo previo asumía un factor constante en la expresión que no se ajusta a las condiciones que se busca simular.

$$I_{ClCa} = C_m P_{Cl} V_m \frac{(z_{Cl} F)^2 [Cl]_o - [Cl]_i \exp(V_m z_{Cl} F / RT)}{RT (1 - \exp(V_m z_{Cl} F / RT))} [pA]. \quad (45)$$

$$P_{Cl} = P_{Cl_i} \frac{([Ca]_i)^{n_{ClCa}}}{([Ca]_i)^{n_{ClCa}} + (K_{ClCa})^{n_{ClCa}}}. \quad (46)$$

Una justificación del modelado de esta corriente se muestra en la *Figura (5)*, donde la *Figura (5.A)* muestra el enfoque adoptado en el modelo de Kapela et al. (2008), aplicando la ecuación de conductancias, mientras que la *Figura (5.B)* muestra las ecuaciones del modelo desarrollado, basado en la ecuación de GHK. Las gráficas representan la variación de las corrientes I_{ClCa} con respecto al potencial de membrana, para distintos valores de cloruro intracelular y extracelular. De esta manera, se demuestra cómo, con la ecuación de conductancias, las corrientes obtenidas tienen un comportamiento lineal que es función de la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio del cloruro.

Esta propuesta funciona de manera correcta únicamente cuando las concentraciones a ambos lados de la membrana son similares, lo cual no permitiría simular experimentos con condiciones de cloruro 0.

Por ello, concluimos que resulta más conveniente modelar la corriente de la forma GHK, con el fin de modularla en función de las concentraciones de cloruro presentes y no del potencial de equilibrio de este anión. Los parámetros elegidos se extraen del modelo presentado por Matchkov et al. (2004), excepto el valor del factor P_{Cl} , el cual se modificará experimentalmente a lo largo de los distintos protocolos.

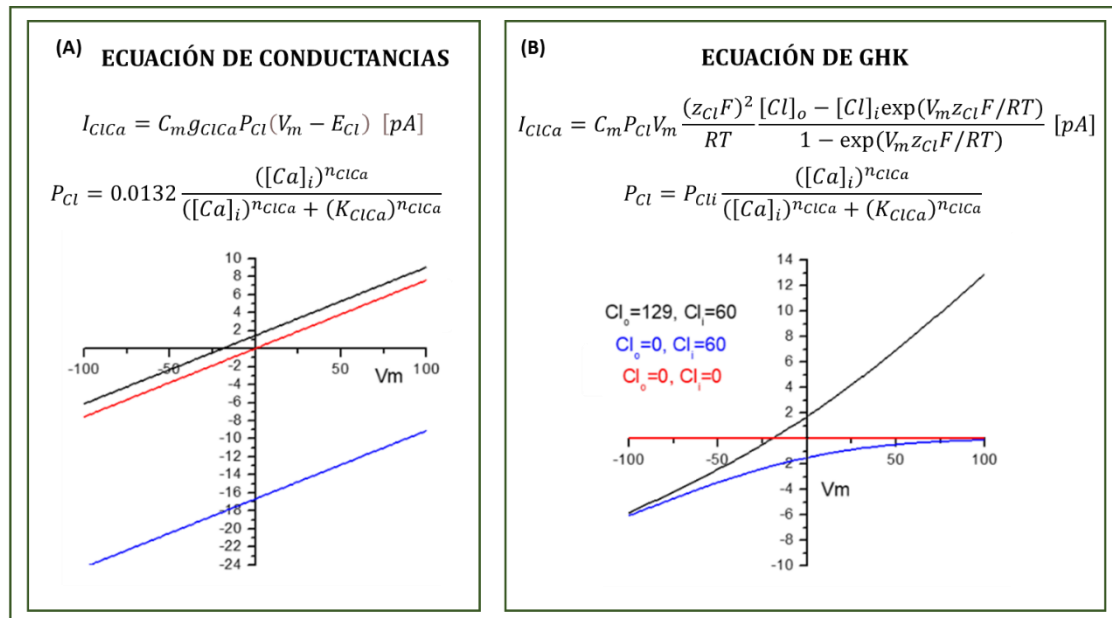


Figura 5. Justificación del modelado de la corriente I_{ClCa} .

(5.A). Modelado de la corriente de los canales dependientes de calcio de acuerdo con la ecuación de conductancias.

(5.B). Modelado de la corriente de los canales dependientes de calcio de acuerdo con la ecuación de GHK.

5.2.1.8. Bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (Ca^{2+} -ATPasa)

Las bombas iónicas son transportadores específicos de la membrana celular que actúan como sistemas de transporte activo primarios, permitiendo el paso de iones en contra de su gradiente electroquímico. Por esta razón, generan un desequilibrio de dichos iones a ambos lados de la membrana, a coste de la hidrólisis de ATP (O'Donnell & Owen, 1994). La bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática, conocida como PMCA por su nombre en inglés (*Plasma Membrane Calcium Pump*), o como Ca^{2+} -ATPasa, se trata de una proteína encargada del transporte de Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el exterior celular. No debemos confundir esta bomba, presente en la membrana plasmática, con su correspondiente en el retículo sarcoplásmico. A pesar de que ambas sean estimuladas por Ca^{2+} y dependientes de Mg^{2+} , las diferencias en su ubicación, estructura y mecanismos de regulación son notables.

Así mismo, la bomba de la membrana plasmática es también estimulada por calmodulina, lo que hace que esta sea su diferencia más relevante (O'Donnell & Owen, 1994). La unión de calmodulina provoca la activación de la bomba, así como la interacción con fosfolípidos ácidos en la membrana; generando un flujo de Ca^{2+} hacia el exterior. Por ello, la Ca^{2+} -ATPasa es un importante condicionante de la concentración de Ca^{2+} intracelular y, consecuentemente, de la contracción de la célula.

La regulación de la bomba Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática es simple y puede modelarse de manera sencilla mediante una ecuación de Michaelis-Menten, describiendo la dependencia de su corriente (I_{PMCA}) con la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Ecuación (47)). De esta manera, reflejamos cómo permite el paso de un ion Ca^{2+} hacia el exterior de la célula, siendo un proceso dependiente de ATP y el principal responsable de la salida de Ca^{2+} desde el interior celular.

La corriente I_{PMCA} constituye así un mecanismo de salida de Ca^{2+} de alta afinidad, manteniendo los niveles bajos de calcio citosólico. En nuestro caso, asumiremos una alta afinidad para el Ca^{2+} (constante de Michaelis, $K_{m,\text{PMCA}}$), debido a concentraciones celulares saturadas de calmodulina, provocando una alta activación de la bomba (Kapela et al., 2008; O'Donnell & Owen, 1994).

$$I_{\text{PMCA}} = \bar{I}_{\text{PMCA}} \frac{[\text{Ca}]_i}{[\text{Ca}]_i + K_{m,\text{PMCA}}} \quad (47)$$

5.2.1.9. Intercambiador de Na^+ - Ca^{2+} de la membrana plasmática

El intercambio de Na^+ y Ca^{2+} en la membrana plasmática tiene lugar gracias a la ayuda de un cotransportador específico bidireccional, permitiendo el flujo de un ion Ca^{2+} hacia el exterior mediado por la entrada de 3 Na^+ , o por el efecto contrario, dando lugar a la salida de 3 Na^+ a cambio de flujo hacia el citosol de un ion Ca^{2+} . De aquí podemos deducir que su estequiometría es $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$ (Matlib et al., 1985).

En base a esto, se ha demostrado que la entrada de calcio hacia el interior celular se ve aumentada cuando se impone un gradiente hacia fuera de Na^+ , ya sea eliminando este ion del espacio extracelular o exponiendo las células a inhibidores específicos (O'Donnell & Owen, 1994).

Este intercambiador ha mostrado una alta selectividad para los iones transportados, además de ser electrogénico y sensible al potencial de membrana. No obstante, ya indicamos que la bomba Ca^{2+} -ATPasa era la principal responsable de la salida de Ca^{2+} hacia el exterior, por lo que el papel del intercambiador Na^+ - Ca^{2+} no resulta tan relevante en situaciones basales. Sí que cobrará importancia ante la presencia de concentraciones $[\text{Ca}^{2+}]_i$ superiores a $1.0 \mu\text{M}$, siendo aquí más significativa su actuación frente a la de la bomba (Kapela et al., 2008; O'Donnell & Owen, 1994).

El modelado de la corriente de este transportador se realiza a partir de la planteada en el modelo de Lindblad et al. (1996) (Ecuación (48)), tras aplicar una reducción del factor de escala (g_{NCX}). Además, la dependencia con el cGMP reflejada en el modelo general de Kapela et al. (2008) es suprimida de las ecuaciones de nuestro transportador.

$$I_{\text{NCX}} = g_{\text{NCX}} \frac{[\text{Na}]_i^3 [\text{Ca}]_o \phi_F - [\text{Na}]_o^3 [\text{Ca}]_i \phi_R}{1 + d_{\text{NCX}}([\text{Na}]_o^3 [\text{Ca}]_i + [\text{Na}]_i^3 [\text{Ca}]_o)} \quad (48)$$

$$\phi_F = \exp\left(\frac{\gamma V_m F}{RT}\right), \quad \phi_R = \exp\left(\frac{(\gamma-1)V_m F}{RT}\right) \quad (49, 50)$$

5.2.1.10. Bomba sodio-potasio (Na⁺-K⁺-ATPasa)

La bomba sodio-potasio (Na⁺-K⁺-ATPasa) resulta un elemento indispensable para mantener los gradientes transmembrana de Na⁺ y K⁺ en las SMC, así como en otros tipos celulares. Además, gracias a su naturaleza electrogénica, también contribuye de manera directa en el potencial de membrana (Kapela et al., 2008). Un aumento en la actividad de la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa generará un flujo neto de carga positiva hacia el exterior celular, puesto que su estequiometría libera 3 Na⁺ hacia al exterior, mientras que solo introduce 2 K⁺. Por lo tanto, tendrá lugar una hiperpolarización de la membrana, al estar extrayendo más carga positiva de la que se está introduciendo hacia el interior (O'Donnell & Owen, 1994).

En cuanto al diseño de las ecuaciones de la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa, en el modelo original se toman como referencia las planteadas en el modelo de Nakamura et al. (1999), así como los parámetros de las mismas. La modelización de la corriente de la bomba sodio-potasio (I_{NaK}) se expresa como una ecuación de Hill (*Ecuación (51)*), describiendo su dependencia con las concentraciones intracelulares [K⁺]_i y [Na⁺]_i. No obstante a la expresión obtenida de este primer modelo se le añade la dependencia con el voltaje de los resultados del modelo propuesto por Yang et al. (2003a). Se incluye el coeficiente de temperatura (Q), puesto que el mismo estudio demuestra la dependencia de la amplitud de esta corriente con la temperatura, de manera que una disminución de esta provoca una despolarización de la membrana en SMC. El valor de Q₁₀ establecido es de 1.87 (O'Donnell & Owen, 1994).

$$I_{NaK} = C_m \bar{I}_{NaK} Q \frac{([K]_o)^{n_{HKo}}}{([K]_o)^{n_{HKo}} + (K_{dKo})^{n_{HKo}}} \frac{([Na]_i)^{n_{HNai}}}{([Na]_i)^{n_{HNai}} + (K_{dNaio})^{n_{HNai}}} \frac{V_m + 150 \text{ mV}}{V_m + 200 \text{ mV}} \quad (51)$$

$$Q = Q_{10}^{T \frac{309.15 K}{10}} \quad (52)$$

Se ha demostrado que cambios en la concentración extracelular de K⁺ provocan variaciones tanto en el potencial de membrana como en el tono vascular de SMC. De esta manera, ante un aumento de [K⁺]_o, aumentaría la actividad de la bomba Na⁺-K⁺-ATPasa, provocando una hiperpolarización y relajación del vaso. Por el contrario, si disminuye [K⁺]_o, el mecanismo será el contrario y tendrá lugar la contracción vascular (O'Donnell & Owen, 1994). Así mismo, han surgido varias hipótesis acerca del comportamiento de esta bomba en situaciones de hipertensión. La primera de ellas sugiere que la actividad de la bomba aumenta en con la presión arterial, debido a un aumento en la permeabilidad pasiva de Na⁺; sin embargo la bomba no compensa totalmente esta situación (Friedman et al., 1975). Por ello, otros autores proponen que la actividad de la bomba disminuye en hipertensión, al ser suprimida por un inhibidor circulante o algún defecto de la misma desarrollado a causa de la patología. Esto provocaría el aumento de los valores de sodio intracelular, dando lugar a la contracción y el aumento del tono vascular (Blaustein et al., 1986).

Por estas razones, debido a la falta de unificación en las aportaciones de esta bomba en presencia de la enfermedad, se decide probar su modelado para protocolos con tiempos largos, observando cómo la bomba no es capaz de mantener los valores de sodio y de potasio en el estado estacionario.

En definitiva, es por esta razón por la que se deciden fijan las concentraciones intra y extracelulares de dichos cationes, de manera que el funcionamiento de la bomba no altere el planteamiento del modelo general.

5.2.1.11. Adaptación del cotransportador sodio-potasio-cloruro a un sistema de transporte activo de cloruro

El mecanismo de actuación del cotransportador clásico de sodio-potasio-cloruro ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ o NKCC2) requiere que 1 ion Na^+ (o 2), 1 ion K^+ y 2 iones Cl^- (o 3) se unan simultáneamente al mismo lado del mismo, pudiendo así transportarse desde el espacio extracelular hacia la cara opuesta de la membrana plasmática. Debido a su presencia en prácticamente todos los tipos celulares, entre sus funciones se incluyen el mantenimiento de $[\text{Cl}^-]_i$ a valores superiores que su punto de equilibrio, así como la regulación del volumen celular. No obstante, no se han encontrado evidencias relevantes de su papel en SMC (Kapela et al., 2008; Russell, 2023).

Por esta razón y con el fin de simplificar el modelo, a la vez de enfocarlo en los objetivos concretos propuestos, se plantea sustituir el cotransportador tradicional por una adaptación de transporte activo de cloruro. Podemos modelar el transportador como una ecuación lineal que simplemente dependa de la diferencia entre las concentraciones de cloruro extra e intracelulares, multiplicada por un factor que denominaremos A_b .

Puesto que este proceso resulta electroneutro y que las concentraciones de sodio y de potasio las consideramos como constantes, el comportamiento de la bomba/transportador de cloruro se considera un sustituto óptimo del cotransportador original de Kapela et al. (2008). Además, de esta manera, garantizamos una corriente que balancee la corriente de los canales de cloruro dependientes de calcio, siendo la suma de ambas en el estado estacionario nula. La *Ecuación (53)* refleja la corriente del transportador como I_{bCl} , cuyo factor de escala A_b será calculado de manera experimental para que el valor de esta corriente iguale al valor negativo de la corriente I_{ClCa} .

$$I_{bCl} = A_b([\text{Cl}]_o - [\text{Cl}]_i) \text{ [pA]}. \quad (53)$$

5.2.2. Activación del α_1 -adrenoreceptor y formación de IP_3

Esta parte del modelo incluye varios subsistemas acoplados que dan lugar a la formación de inositol trifosfato (IP_3). La estructura general es tomada del modelo de Bennett et al. (2005), donde se plantea el mecanismo de activación del receptor, fosforilación e internalización.

La *Figura (6.A)* refleja un diagrama esquemático del proceso, junto a un resumen esquemático de los equilibrios establecidos en la *Figura (6.B)*. En líneas generales, se muestra cómo, tras la unión de un transmisor específico (NE) a los receptores (R) metabotrópicos de la membrana plasmática, se genera una cascada de proteína G (G). Una vez activa, la proteína G se une a la fosfolipasa C (PLC) para producir IP_3 y DAG mediante la hidrólisis de fosfatidilinositol bisfosfato (PIP_2). Esto provoca la apertura de canales sensibles al IP_3 del SR, liberando Ca^{2+} hacia el citosol.

5.2.2.1. Activación del α_1 -adrenoreceptor

Tal y como se indica en Bennett et al. (2005), el α_1 -adrenoreceptor puede existir en 5 estados diferentes, en función de si está unido (NER) o no (R) a su ligando (NE en nuestro caso), si está fosforilado (Rp o NER_p) o internalizado (R_i). Sin embargo, con el fin de simplificar el modelo, tan solo consideraremos los dos primeros (NE+R y NER), descartando el resto. Podemos así establecer un equilibrio entre estos dos estados, modulado por $K_{1,G} = k_1^-/k_1^+$ como ratio de los coeficientes de disociación.

Bajo la hipótesis de que este es un proceso rápido en comparación con la fosforilación e internalización, donde NE se une rápidamente a los receptores para formar el complejo NER, podemos establecer la relación reflejada en la Ecuación (54). En este proceso deberemos tener en cuenta el número total de receptores de superficie $[R_T]$, parámetro tomado del modelo de Bennett et al. (2005).

$$[NER] = \frac{[R_T][NE]}{K_{1,G} + [NE]} \quad (54)$$

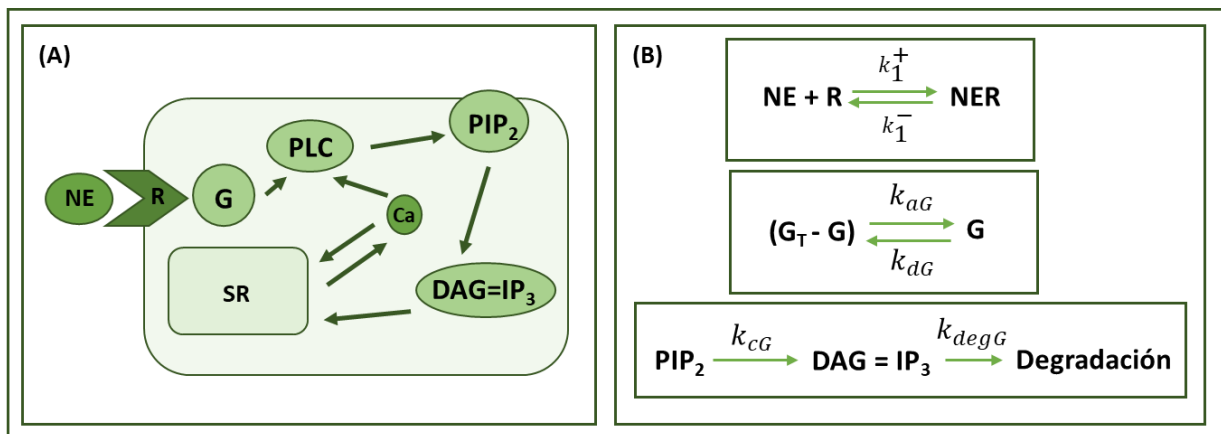


Figura 6. Esquema de la activación del α_1 -adrenoreceptor y formación de DAG e IP₃.

(6.A). Diagrama esquemático de la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (SR).

(6.B). Esquema cinético de los procesos que tienen lugar desde la unión del receptor a NE, hasta la formación y degradación de IP₃ y DAG.

5.2.2.2. Formación de IP₃

Una vez conocemos el mecanismo de activación de los receptores, estudiamos el comportamiento de la proteína G. Esta proteína es activada únicamente por receptores desfosforilados (R y NER), siendo mayor la activación en el caso de unión a receptores NER. No obstante, se asume la existencia de activación ante la unión a receptores R, actuando como la responsable de la concentración basal de IP₃ en el espacio citosólico. El modelado de la concentración de proteína G ([G]) requiere conocer las tasas de activación e inactivación de la misma ($k_{a,G}$ y $k_{d,G}$), el número total de moléculas de proteína G ($[G_T]$), tal y como se muestra en la Figura (6.B).

En esta ecuación, la constante de activación ($k_{a,G}$) de la proteína es función de dos parámetros. En primer lugar, esta parte del modelo considera que no todos los receptores estarán activos y móviles en el proceso, por lo que algunos de ellos no llegarán a participar en la señalización del segundo mensajero. Por esta razón, se incluye la relación entre el número de receptores unidos a ligandos y el número total de receptores multiplicados por el parámetro ξ_G , que representa la fracción de estos que son móviles.

Podemos expresarlo de manera sencilla como $\rho_{r,G} = [NER]/\xi_G[R_T]$, aunque en el modelo diseñado se implementa la ecuación más compleja recogida en la *Ecuación (55)* (Bennett et al., 2005; Kapela et al., 2008).

Así mismo, se incluye el parámetro δ_G , como la razón entre la actividad de las especies unidas al ligando y no unidas al mismo (*Ecuación (56)*), de acuerdo con las expresiones descritas en Bennett et al. (2005) y en Kapela et al. (2008).

$$\rho_{r,G} = \frac{[NE][NER]}{\xi_G[R_T](K_{1,G} + [NE])}. \quad (55)$$

$$\delta_G = \frac{k_{d,G}[G]}{k_{a,G}(G_{T,G} - G)}. \quad (56)$$

$$\frac{d[G]}{dt} = k_{a,G}(\delta_G + \rho_{r,G})([G_T] - [G]) - k_{d,G}[G]. \quad (57)$$

Tal y como se indicó previamente, la proteína G activa desencadena la activación de la PLC, hidrolizando el PIP_2 y formando IP_3 . Este comportamiento puede simularse incluyendo otra ecuación diferencial en el modelo que refleje la formación de IP_3 (*Ecuación (58)*). Para ello, incluimos también otros parámetros, como la tasa de hidrólisis de IP_3 , definiéndola como $r_{h,G}[PIP_2]$, siendo $[PIP_2]$ la cantidad constante de moléculas de PIP_2 en la membrana plasmática.

Otras variables requeridas serán α_G como un parámetro de ganancia de señal efectiva y $K_{c,G}$ como la constante de disociación del sitio de unión de Ca^{2+} a la PLC. Contamos con $k_{deg,G}$ como la tasa de degradación del IP_3 , así como se incluye $\gamma_G = N_{AV} vol_i 10^{-15}$, como el factor de conversión de número de partículas a concentración en unidades micromolares, considerando N_{AV} como la constante de Avogadro y vol_i el volumen de la célula en cuestión.

Las ecuaciones *Ecuaciones (58) y (59)* han sido de nuevo tomadas del modelo propuesto en Bennett et al. (2005).

$$r_{h,G} = \alpha_G \frac{[Ca]_i}{[Ca]_i + K_{c,G}} [G]. \quad (58)$$

$$\frac{d[IP_3]}{dt} = \frac{r_{h,G}}{\gamma_G} [PIP_2] - k_{deg,G}[IP_3]. \quad (59)$$

Una vez estudiado el comportamiento del IP_3 , también debemos considerar su degradación, la cual produce la reposición de PIP_2 en el espacio intracelular. Al igual que en el modelo de Bennett et al. (2005), se asume la existencia de fosfolípidos en el citosol en los que se degrada el IP_3 , para después fosforilarse de nuevo. Una vez devuelto a la superficie celular, obtenemos la concentración de PIP_2 presente en la membrana, la cual ya hemos comentado que consideramos constante, descartando la ecuación diferencial asociada a este parámetro planteada en el modelo original previo.

Sin embargo, finalizamos esta parte del modelo incluyendo otra ecuación diferencial, correspondiente a la concentración de diacilglicerol en el espacio intracelular ($[DAG]$) (Ecuación (60)). Debido a que esta molécula lipídica se sintetiza a partir del IP_3 , su modelado matemático es equivalente, pudiendo igualar ambas ecuaciones diferenciales (Kapela et al., 2008).

$$\frac{d[DAG]}{dt} = \frac{d[IP_3]}{dt}. \quad (60)$$

5.2.3. Retículo sarcoplásmico

El retículo sarcoplásmico puede modelarse como un sistema tubular organizado en pequeñas cavidades funcionalmente independientes, conteniendo en ellas receptores específicos de moléculas como IP_3 y rianodina. Partiendo del modelo planteado por Yang et al. (2003a), se genera un sistema representativo del retículo sarcoplásmico dividido en dos compartimentos.

El primero de ellos se considera el compartimento de captación, incluyendo una bomba SERCA o Ca^{2+} -ATPasa. Las ecuaciones descritas para este primer compartimento son tomadas del modelo de Kapela et al. (2008). La constante de Michaelis ($K_{m,up}$) presente en la corriente de la bomba (I_{SERCA}) (Ecuación (61)). es adaptada a los valores fisiológicos planteados en el modelo de (Miller & Carsten, 1996). Por otra parte, la corriente I_{tr} se incluye con el fin de disminuir la heterogeneidad espacial del depósito intracelular de Ca^{2+} , actuando como un aumento en la permeabilidad entre ambos compartimentos del retículo (Ecuación (62)). Además, se incluye una fuga de calcio en forma de corriente (I_{rel}) para evitar concentraciones excesivas de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico (Ecuación (63)). La Ecuación (64) representa la concentración de calcio en este compartimento de captación.

$$I_{SERCA} = \frac{\bar{I}_{SERCA} [Ca]_i}{[Ca]_i + K_{m,up}}. \quad (61)$$

$$I_{tr} = \frac{([Ca]_u - [Ca]_r)z_{Ca}Fvol_u}{\tau_{tr}}. \quad (62)$$

$$I_{rel} = \frac{(R_{10}^2 + R_{leak})([Ca]_r - [Ca]_i)z_{Ca}Fvol_r}{\tau_{rel}}. \quad (63)$$

$$\frac{d[Ca]_u}{dt} = \frac{I_{SERCA} - I_{tr} - I_{IP3}}{z_{Ca}Fvol_u}. \quad (64)$$

El segundo compartimento considerado es el de liberación, que incluye el subsistema del receptor de rianodina. La ecuación diferencial de este compartimento también es tomada del modelo propuesto en Kapela et al., (2008) (*Ecuación (65)*).

$$\frac{d[Ca]_r}{dt} = \frac{I_{tr} - I_{IP3}}{z_{Ca}Fvol_r} \left(1 + \frac{[CSQN]K_{CSQN}}{(K_{CSQN} + [Ca]_r)^2} \right)^{-1}. \quad (65)$$

5.2.3.1. Receptor de rianodina

El receptor de rianodina incluido en el compartimento de liberación del retículo sarcoplásmico plantea un modelo cinético que consta de 4 fases diferenciadas, definidas en el modelo Yang et al., (2003). Estas fases representan los receptores libres (R_{00}), los receptores con Ca^{2+} unido a zonas de activación (R_{10}), con Ca^{2+} unido a zonas de inactivación (R_{01}), y con Ca^{2+} unido a zonas tanto de activación como de inactivación (R_{11}). Se considera que la probabilidad de apertura de canales de liberación de calcio controlados por el receptor de rianodina depende principalmente de R_{10} . Además, se considera la suma de los cuatro estados o probabilidades igual a 1. Despejando R_{00} de esta expresión obtenemos la *Ecuación (66)*. De esta manera el sistema de cuatro ecuaciones se reduce a uno de tres, donde las *Ecuaciones (67-69)* representan las ecuaciones diferenciales para el resto de estados y la relación entre todas ellas se muestra en la *Figura (7)* (Yang et al., 2003)). Debemos considerar que las tasas de activación e inactivación son dependientes, así como que la unión a los sitios de activación resulta más rápida que a los sitios de inactivación.

$$R_{00} = 1 - R_{01} - R_{10} - R_{11}. \quad (66)$$

$$\frac{dR_{01}}{dt} = K_{r2}[Ca]_i R_{00} + K_{-r1} R_{11} - (K_{-r2} + K_{r1}[Ca]_i^2) R_{01}. \quad (67)$$

$$\frac{dR_{10}}{dt} = K_{r1}[Ca]_i^2 R_{00} - (K_{-r1} + K_{r2}[Ca]_i) R_{10} + K_{-r2} R_{11}. \quad (68)$$

$$\frac{dR_{11}}{dt} = K_{r2}[Ca]_i R_{10} - (K_{-r1} + K_{-r2}) R_{11} + K_{r1}[Ca]_i^2 R_{01}. \quad (69)$$

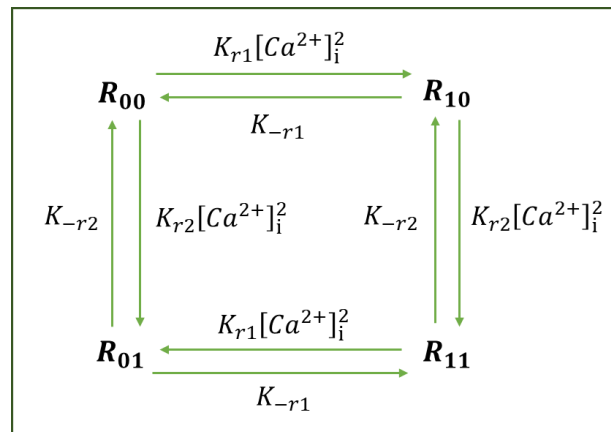


Figura 7. Representación del modelo cinético de cuatro estados del receptor de rianodina.

5.2.3.2. Receptor de IP₃

El IP₃ generado se difunde al espacio intracelular para llegar a sus receptores (IP₃R), localizados en el retículo sarcoplásmico. La corriente inducida por IP₃ (I_{IP_3}) es adaptada por Kapela et al., (2008) a partir del modelo reflejado en Bennett et al. (2005), donde K_{act,IP_3} es la constante de disociación del Ca²⁺ a las zonas de activación del receptor de IP₃. Así mismo, definimos una ecuación diferencial adicional (*Ecuación (71)*), que incluye parámetros como las tasas de unión del Ca²⁺ a la zona inhibitoria del IP₃R (K_{inh,IP_3}) y su tasa constante de disociación correspondiente (K_{inh,IP_3}).

$$I_{IP_3} = \bar{I}_{IP_3} z_{Ca} vol_{Ca} F \left(\frac{[IP_3]}{[IP_3] + K_{IP_3}} \frac{[Ca]_i}{[Ca]_i + K_{act,IP_3}} h_{IP_3} \right)^3 ([Ca]_u - [Ca]_i). \quad (70)$$

$$\frac{dh_{IP_3}}{dt} = k_{on,IP_3} (K_{inh,IP_3} - ([Ca]_i + K_{inh,IP_3}) h_{IP_3}). \quad (71)$$

5.2.4. Contracción inducida por Ca²⁺

El sistema contráctil de una SMC es activado por un aumento del [Ca²⁺]_i, originado por la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico. Este proceso se inicia con la unión de Ca²⁺ a calmodulina, activando la quinasa de cadena ligera de miosina. Esto permite la fosforilación de la miosina, de manera que esta actúe con la actina y generen la fuerza contráctil en las SMC (Bennett et al., 2005).

En el modelo planteado, la miosina se denota como M, la miosina fosforilada como M_p y la actina como A, por lo que la actina unida a miosina fosforilada es AM_p. El modelo de contracción representado es simple e incluye los coeficientes de conversión, siendo k_1 dependiente de [Ca²⁺]_i, mientras que k_2 , k_3 y k_4 son valores constantes. La expresión de k_1 viene dada por la siguiente relación, $k_1 = k_m ([Ca^{2+}]_i)^n$, donde k_m y n son constantes determinadas por Bennett et al. (2005), al igual que el resto de ecuaciones y parámetros. La *Figura (8)* muestra el proceso simulado.

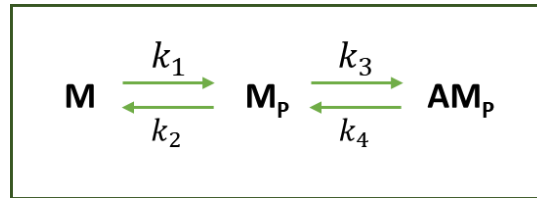


Figura 8. Esquema de la cinética de la contracción inducida por Ca²⁺.

$$\frac{d[M]}{dt} = k_2 ([M_T] - [AM_P]) - (k_1 + k_2) [M]. \quad (72)$$

$$\frac{d[AM_P]}{dt} = k_3 ([M_T] - [M]) - (k_3 + k_4) [AM_P]. \quad (73)$$

De las *Ecuaciones (70-71)* extraemos la concentración total de miosina (M_T), de acuerdo con la relación $[M_T] = [M] + [M_p] + [AM_p]$, igualándola a 1 en unidades arbitrarias. De acuerdo con Bennett et al. (2005), la fuerza contráctil de la célula es proporcional a $[AM_p]$, lo cual tendremos en cuenta para discusiones futuras.

5.2.5. Balances iónicos

Por último, se incluyen en el modelo los balances iónicos para las principales especies iónicas presentes en el citosol: potasio, sodio, calcio y cloro. Tanto las ecuaciones como los parámetros son tomados de nuevo de Kapela et al. (2008). Las *Ecuaciones (72, 74, 75, 76)* representan las corrientes totales de cada especie iónica, mientras que las *Ecuaciones (73, 77)* muestran las ecuaciones diferenciales correspondientes a las concentraciones de calcio y cloruro intracelular. No se incluyen las ecuaciones diferenciales para el sodio y el potasio intracelular, puesto que ya se ha comentado que estas las consideraremos constantes en el modelo planteado.

$$I_{Catotm} = I_{SOCCCa} + I_{VOCC} - 2I_{NCX} + I_{PMCA} + I_{CaNSC}. \quad (74)$$

$$\frac{d[Ca]_i}{dt} = -\frac{I_{Catotm} + I_{SERCA} - I_{rel} - I_{IP3}}{z_{Ca}Fvol_{Ca}} \left(1 + \frac{[\bar{S}_{CM}]K_d}{(K_d + [Ca]_i)^2} + \frac{[\bar{B}_F]K_{dB}}{(K_{dB} + [Ca]_i)^2} \right)^{-1}. \quad (75)$$

$$I_{Natotm} = I_{NaKCl}^{Na} + I_{SOCNa} + 3I_{NaK} + 3I_{NCX} + I_{NaNSC}. \quad (76)$$

$$I_{Ktotm} = I_{NaKCl}^K + I_{Kv} + I_{BKCa} + I_{KNSC} + I_{Kleak} - 2I_{NaK}. \quad (77)$$

$$I_{Cltotm} = I_{NaKCl}^{Cl} + I_{ClCa}. \quad (78)$$

$$\frac{d[Cl]_i}{dt} = -\frac{I_{Cltotm}}{z_{Cl}Fvol_i}. \quad (79)$$

5.3. Especificaciones del modelo computacional

5.3.1. Condiciones iniciales

A la hora de diseñar e implementar el modelo, es necesario definir unas condiciones iniciales que simulen la fisiología de la SMC en el estado estacionario. El proceso de adaptar dichas condiciones se realiza en dos pasos. En el primero de ellos, se fijan las condiciones iniciales de cada una de las 22 ecuaciones diferenciales a los valores extraídos de Kapela et al. (2008) y Bennett et al. (2005), o a los valores predeterminados en función de las condiciones que queramos simular. Algunas de ellas son expresadas como constantes, mientras que otras son el resultado de resolver las ecuaciones correspondientes.

El conjunto de todas ellas se recoge en un vector almacenado en un *script* de Matlab (*Script (1)*).

$$V_m = -59.4 \text{ mV}; R_{01} = 0.995; R_{10} = 0.0033; R_{11} = 4.0 \times 10^{-6}; [Ca]_u = 0.66 \text{ mM};$$

$$[Ca]_r = 0.57 \text{ mM}; [Ca]_i = 68 \text{ nM}; PSOC = 0; [Cl]_i = 59.4 \text{ mM}; [IP_3] = [DAG] = 0 .$$

$$d_L = \frac{1.0}{1 + \exp\left(-\frac{V_m}{8.3}\right)}; f_L = \frac{1.0}{1 + \exp\left(\frac{V_m + 42.0}{9.1}\right)}; p_K = \frac{1.0}{1 + \exp\left(-\frac{(V_m + 11)}{15}\right)};$$

$$q_1 = q_2 = \frac{1.0}{1 + \exp\left(\frac{V_m + 40}{14}\right)}; p_f = p_s = \frac{1.0}{1 + \exp\left(-\frac{V_m - V_{1/2KCa}}{18.25}\right)};$$

$$h_{IP_3} = \frac{K_{inh,IP_3}}{[Ca]_i + K_{inh,IP_3}}; G = \frac{r_{h,G}(K_{c,G} + [Ca]_i)}{\alpha_G [Ca]_i}; [M] = k_2 k_4 \kappa M_T; [AM_P] = k_1 k_3 \kappa M_T .$$

Estas variables incluyen otros parámetros que se recogen a continuación.

$$\frac{V_{1/2KCa}}{2KCa} = -41.7 \log_{10}([Ca]_i) - 128.2; r_{h,G} = \frac{k_{deg,G} \gamma_G [IP_3]}{[PIP_2]};$$

$$k_1 = k_m ([Ca]_i)^n; \kappa = (k_1 k_3 + k_1 k_4 + k_2 k_4)^{-1} .$$

La segunda parte del procedimiento de fijación de condiciones iniciales consiste en implementar un *script* de Matlab (*Script (2)*) que permita ejecutar el modelo completo, para las condiciones iniciales que acabamos de determinar, durante un periodo temporal largo (10^{10} ms). Esto permite determinar el comportamiento del modelo en su estado estacionario (*stationary state*, SS), ajustando las condiciones iniciales de cada ecuación diferencial al valor que toman en el punto final de la ejecución. De esta manera, garantizamos que, cuando volvamos a ejecutar el modelo con un protocolo específico, las condiciones iniciales aseguren que el modelo parte de una situación en la que se encuentra en equilibrio, es decir, que ante las mismas condiciones, la solución de las ecuaciones diferenciales permanece constante.

5.3.2. Parámetros y adaptaciones del modelo

Los parámetros fijados en el modelo implementado son tomados de diversas publicaciones y modelos previos, ya indicados conforme se han descrito cada una de las ecuaciones. No obstante, algunos de ellos se han modificado para adaptar el modelo a los objetivos propuestos. El valor de todos ellos se recoge en la *Tabla (3)*, así como el código empleado en Matlab en el *Script (3)*.

Junto a estos parámetros, destacamos un conjunto de hiperparámetros del modelo, recogidos en la *Tabla (4)*. Los hiperparámetros son aquellas variables que modificamos manualmente o mediante protocolos experimentales al aplicar el modelo. De esta manera, conseguiremos adaptar ciertas condiciones para poder representar y analizar diversos protocolos.

Por ejemplo, los hiperparámetros básicos del modelo serán el tiempo máximo en el que se ejecutará el modelo (T_{MAX}), así como los valores de las concentraciones de Cl_o y NE ($Cl_{ostimulation}$, $NE_{stimulation}$) que se aplicarán como estimulaciones en los protocolos elegidos.

También incluiremos en este grupo de hiperparámetros el valor del factor A_b , presente en la corriente del transportador de cloruro. Este factor, que multiplica a la diferencia entre las concentraciones de cloruro extra e intracelulares, será ajustado de manera automática para que el valor de la corriente I_{ClCa} iguale a la de I_{bCl} ante diferentes condiciones iniciales de cloruro, de manera que esta parte del modelo se encuentre en equilibrio en el estado estacionario.

Otras variable que consideraremos como hiperparámetro será P_{Cl} , actuando como factor de la corriente I_{ClCa} . Podremos modular su valor a lo largo de los protocolos para estudiar las variaciones del modelo ante diferentes concentraciones de cloruro intracelular iniciales.

Tabla 3. Parámetros del modelo

Parámetro	Valor	Significado	Fuentes
A.1) Parámetros estándar del modelo			
$Z_K, Z_{Na}, Z_{Ca}, Z_{Cl}$	1, 1, 2, -1	Valencia de iones: K^+, Na^+, Ca^{2+}, Cl^-	(Kapela et al., 2008)
N_{AV}	6.022×10^{23}	Constante de Avogadro	(Kapela et al., 2008)
R	8341.0 mJ/mol K	Constante de gases	(Kapela et al., 2008)
F	96487.0 C/mol	Constante de Faraday	(Kapela et al., 2008)
T	293.0 K	Temperatura absoluta	(Kapela et al., 2008)
C_m	25 pF	Capacitancia de la membrana plasmática	(Kapela et al., 2008)
A_m	$Cm/106 \text{ cm}^2$	Área de la membrana plasmática	(Kapela et al., 2008)
$[Ca]_o$	2.0 mM	Concentración extracelular de Ca^{2+}	(Kapela et al., 2008)
$[Na]_o$	140.0 mM	Concentración extracelular de Na^+	(Kapela et al., 2008)
$[K]_o$	5.0 mM	Concentración extracelular de K^+	(Kapela et al., 2008)
$[Cl]_o$	129 mM	Concentración extracelular de Cl^-	(Kapela et al., 2008)
$[Na]_i$	8.4 mM	Concentración intracelular de Na^+	(Kapela et al., 2008)
$[K]_i$	140 mM	Concentración intracelular de K^+	(Kapela et al., 2008)
vol_i	1 pL	Volumen del espacio intracelular	(Kapela et al., 2008)
vol_{Ca}	0.7 pL	Volumen del espacio intracelular disponible para Ca^{2+} libre	(Kapela et al., 2008)
vol_u	0.07 pL	Volumen del compartimento de captación	(Kapela et al., 2008)
vol_r	0.007 pL	Volumen del compartimento de liberación	(Kapela et al., 2008)
A.1.1) Ca de calcio dependiente de voltaje			
P_{vocc}	$1.88 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$	Permeabilidad de la célula completa	(Lozinskaya & Cox, 1997)
\bar{d}_L, \bar{f}_L	Dependientes de V_m	Tasas de activación e inactivación en estado estacionario	(Lozinskaya & Cox, 1997)
τ_{d_L}, τ_{f_L}	Dependientes de V_m	Constantes temporales de activación e inactivación	(Lozinskaya & Cox, 1997)
A.1.2) Corriente de potasio a través de canales de K^+ activados por Ca^{2+}			
P_{BKCa}	$3.9 \times 10^{-13} \text{ cm}^3/\text{s}$	Permeabilidad a través de un único canal	(Mistry & Garland, 1998)
N_{BKCa}	$6.6 \times 10^6 \text{ cm}^{-2}$	Densidad del canal	(Smirnov et al., 1998)
\bar{p}_o	Dependiente de V_m	Probabilidad de apertura en estado estacionario	(Benham et al., 1986)
$V_{1/2KCa}$	Dependiente de Ca^{2+}	Potencial de media activación	(Yang et al., 2005)
τ_{p_f}, τ_{p_s}	0.84 ms, 35.9 ms	Constantes temporales de activación rápida y lenta	(Yang et al., 2005)
A.1.3) Corriente a través de canales de K^+ dependientes de voltaje			
g_{Kv}	1.35 nS	Máxima conductancia de la célula completa	(Lu et al., 2001)
τ_{p_K}	Dependiente de V_m	Constante temporal de activación	(Lu et al., 2001)
\bar{p}_K, \bar{q}	Dependiente de V_m	Tasas de activación en estado estacionario	(Lu et al., 2001)
τ_{q_1}, τ_{q_2}	371 ms, 2884 ms	Constantes temporales de inactivación rápida y lenta	(Lu et al., 2001)
A.1.4) Corriente de fuga de K^+ sin especificar			
g_{Kleak}	0.067 nS	Conductancia de la célula completa	(Nelson & Quayle, 1995)
A.1.5) Canales iónicos no selectivos			
K_{NSC}	$3 \times 10^{-3} \text{ mM}$	Concentración de DAG para la mitad de la máxima activación	(Baró & Eisner, 1995)
P_{NaNSC}	$5.11 \times 10^{-7} \text{ cm/ms}$	Permeabilidad de Na^+ de la célula completa	(Inoue et al., 2001)
P_{KNSC}	$P_{NaNSC} \times 1.06$	Permeabilidad de K^+ de la célula completa	(Inoue et al., 2001)
P_{CaNSC}	$P_{NaNSC} \times 4.54$	Permeabilidad de Ca^{2+} de la célula completa	(Inoue et al., 2001)

d_{NSCmin}	0.0244	Activación de constituyentes	(Inoue et al., 2001)
P_{oNSC}	Dependiente de V_m	Inhibición de voltaje	(Inoue et al., 2001)
P_{minNSC}	0.4344	Valor mínimo de inhibición de voltaje	(Kapela et al., 2008)
A.1.6) Canales catiónicos no selectivos operados por almacenamiento			
g_{socCa}	0.0083 nS	Conductancia de Ca^{2+} para la célula completa	(Albert & Large, 2003)
g_{socNa}	0.0575 nS	Conductancia de Na^{2+} para la célula completa	(Albert & Large, 2003)
K_{soc}	0.0001 mM	Concentración de Ca^{2+} para la mitad de la activación	(Arnon et al., 2000)
H_{soc}	1	Coeficiente de Hill	(Kapela et al., 2008)
τ_{SOC}	100 ms	Constante temporal para activación de SOC	(Kapela et al., 2008)
A.1.7) Canales de cloruro activados por calcio			
n_{ClCa}	2	Coeficiente de Hill	(Matchkov et al., 2004)
K_{ClCa}	365×10^{-6} mM	EC50 para la activación dependiente de Ca^{2+}	(Large & Wang, 1996)
A.1.8) Bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática			
\bar{I}_{PMCA}	5.37 pA	Máxima corriente a través de la bomba de calcio	(Kapela et al., 2008)
$K_{m,PMCA}$	170×10^{-6} mM	Constante de Michaelis	(O'Donnell & Owen, 1994)
$[\bar{S}_{CM}]$	0.1 mM	Concentración de calmodulina	(Fink et al., 1999; Wang, 1985; Yang et al., 2003)
K_d	2.6×10^{-4} mM	Constante de disociación de calmodulina	(Fink et al., 1999; Wang, 1985; Yang et al., 2003)
A.1.9) Intercambiador de Na^{2+}-Ca^{2+} de la membrana plasmática			
g_{NCX}	0.000487 nS	Factor de escala	(O'Donnell & Owen, 1994)
A.1.10) Bomba sodio-potasio			
\bar{I}_{NaK}	2.3083 pA/pF	Máxima densidad de corriente Na^{+}/K^{+}	(Kapela et al., 2008)
K_{dKo}	1.6 mM	Constante de saturación media de K^{+}	(Nakamura et al., 1999)
K_{dNaO}	22 mM	Constante de saturación media de Na^{+}	(Nakamura et al., 1999)
n_{HKo}	1.1	Coeficiente de Hill para K_o^{+}	(Nakamura et al., 1999)
n_{HNai}	1.7	Coeficiente de Hill para Na_i^{+}	(Nakamura et al., 1999)
A.2) Activación del $\alpha 1$-adrenoreceptor y formación de IP3			
kp_G	0.1×10^{-3}	Tasa de fosforilación del receptor	(Bennett et al., 2005)
$[R_T]$	$2 \times 10^4 \times \xi_G$	Número total de receptores móviles	(Kapela et al., 2008)
$K_{1,G}$	0.01 mM	Constante de disociación del receptor desfosforilado	(Kapela et al., 2008)
ξ_G	0.85	Fración de receptores móviles	(Kapela et al., 2008)
$[G_T]$	1×10^5	Número total de proteínas G	(Kapela et al., 2008)
$k_{deg,G}$	1.25×10^{-3} 1/ms	Tasa de degradación de IP_3	(Kapela et al., 2008)
$k_{a,G}$	0.17×10^{-3} 1/ms	Tasa de activación de la proteína G	(Kapela et al., 2008)
$k_{d,G}$	1.5×10^{-3} 1/ms	Tasa de inactivación de la proteína G	(Kapela et al., 2008)
$K_{c,G}$	0.4×10^{-3} mM	Constante de disociación para la unión de Ca^{2+} a PLC	(Kapela et al., 2008)
α_G	$2,781 \times 10^{-8}$ 1/ms	Parámetro de ganancia de señal efectiva	(Kapela et al., 2008)
γ_G	$N_{AV} \times vol_i \times 10^{-15}$	Factor de conversión de unidades de PIP_2 a concentración mM	(Kapela et al., 2008)
PIP_2	5×10^7	Concentración constante de PIP_2	(Kapela et al., 2008)
A.3) Retículo sarcoplásmico			

τ_{tr}	1000 ms	Constante de activación	(Kapela et al., 2008)
τ_{rel}	0.0333 ms	Constante de activación	(Kapela et al., 2008)
$K_{m,up}$	0.001 mM	Constante de Michaelis para la bomba de calcio	(Miller & Carsten, 1996)
k_{leak}	1	Parámetro para el retículo sarcoplásmico	(Yang et al., 2003a)
\bar{I}_{SERCA}	$3.34 \times (1 + k_{leak})$ pA	Máx. corriente de entrada del retículo sarcoplásmico	(Kapela et al., 2008)
R_{leak}	$1.07 \times 10^{-5} (k_{leak})$	Parámetro de pérdida	(Camello et al., 2002)
K_{CSQN}	0.8 Mm	Afinidad de unión a calsecuestrina	(Volpe et al., 1994)
$[CSQN]$	15 Mm	Concentración de calsecuestrina	(Jafri et al., 1998)
K_{r1}, K_{r2}	2500, 1.05 1/(ms mM ²)	Factores del receptor de rianodina	(Kapela et al., 2008)
K_{-r1}, K_{-r2}	0.0076, 0.0840 1/ms	Factores del receptor de rianodina	(Kapela et al., 2008)
\bar{I}_{IP3}	2880×10^{-6} mM/ms	Tasa constante de liberación de Ca ²⁺ por IP ₃ R	(Fink et al., 1999)
$K_{act,IP3}$	0.17×10^{-3} mM	Constante de disociación para los sitios de activación	(Fink et al., 1999)
$K_{inh,IP3}$	0.1×10^{-3} mM	Constante de disociación para los sitios de inhibición	(Fink et al., 1999)
K_{IP3}	0.12×10^{-3} mM	Constante de disociación para la unión de IP ₃ a IP ₃ R	(Fink et al., 1999)
$K_{on,IP3}$	1.4 1/(mM ms)	Tasa de unión de Ca ²⁺ a la zona inhibitoria	(Fink et al., 1999)
A.4) Contracción inducida por calcio			
M_T	1	Concentración total de miosina	(Bennett et al., 2005)
k_m	8×10^9 1/(mM ⁴ ms)	Tasa de fosforilación	(Bennett et al., 2005)
n	4	Exponente del calcio	(Bennett et al., 2005)
k_2	5×10^{-4} 1/ms	Tasa de desfosforilación	(Bennett et al., 2005)
k_3	4×10^{-4} 1/ms	Tasa de unión	(Bennett et al., 2005)
k_4	1×10^{-4} 1/ms	Tasa de separación	(Bennett et al., 2005)
A.5) Balances iónicos			
$[BF]$	0.1 mM	Concentración total de buffers	(Kapela et al., 2008)
K_{dB}	5.298×10^{-4} mM	Afinidad de unión promedio a otros buffers	(Kapela et al., 2008)

Tabla 4. Hiperparámetros del modelo.

Hiperparámetro	Posibles valores	Significado
T_{MAX}	Tiempo en ms	Tiempo máximo de simulación
$NE_{stimulation}$	1 μ M	Concentración de NE aplicada en los protocolos
$Cl_{ostimulation}$	129 mM	Concentración de Cl _o aplicada en los protocolos
A_b	Fijado experimentalmente	Factor de la corriente de la bomba de Cl ⁻
P_{Cl_i}	1.04×10^{-8}	Factor de ajuste de la corriente de los canales de Cl ⁻

5.3.3. Métodos numéricos

Se ha considerado un modelo biofísico que simula varios aspectos de la regulación del potencial de membrana y el calcio en el músculo liso vascular. Dicho modelo está formado por 22 ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden en las que la variable independiente es el tiempo y las variables dependientes son las siguientes:

1. Potencial de membrana en mV (V_m) (Ecuación (11))
2. Probabilidad de apertura de los canales VOCC (d_L) (Ecuación (17))
3. Probabilidad de inactivación de los canales VOCC (f_L) (Ecuación (18))
4. Probabilidad de apertura de los canales K_v (p_K) (Ecuación (29))
5. Probabilidad de inactivación rápida de los canales K_v (q_1) (Ecuación (31))
6. Probabilidad de apertura de los canales BK_{Ca} (p_f) (Ecuación (24))
7. Probabilidad de cierre de los canales BK_{Ca} (p_s) (Ecuación (25))
8. Fracción de receptores de rianodina con calcio en sitios de activación (R_{01}) (Ecuación (67))
9. Fracción de receptores de rianodina con calcio en sitios de inactivación (R_{10}) (Ecuación (68))
10. Fracción de receptores de rianodina con calcio en sitios de activación e inactivación (R_{11}) (Ecuación (69))
11. Concentración de calcio en el compartimento de captación en mM (Ca_u) (Ecuación (64))
12. Concentración de calcio en el compartimento de liberación en mM (Ca_r) (Ecuación (65))
13. Concentración de calcio intracelular en mM (Ca_i) (Ecuación (75))
14. Probabilidad de inactivación lenta de los canales K_v (q_2) (Ecuación (32))
15. Probabilidad de apertura de los canales SOC (P_{SOC}) (Ecuación (44))
16. Concentración de cloruro intracelular en mM (Cl_i) (Ecuación (79))
17. Descripción cinética del receptor de IP_3 (h_{IP_3}) (Ecuación (71))
18. Formación de proteína G activa (G) (Ecuación (57))
19. Formación de IP_3 (IP_3) (Ecuación (59))
20. Formación de DAG (DAG) (Ecuación (60))
21. Concentración de miosina (M) (Ecuación (72))
22. Concentración de actina unida a miosina fosforilada (AM_p) (Ecuación (73))

Este sistema diferencial de primer orden con 22 ecuaciones no lineales no puede ser resuelto de forma analítica debido a la complejidad que presenta la no linealidad de sus ecuaciones y la interdependencia entre variables. Por estas razones, se busca una resolución numérica como alternativa. Debido a la rigidez del problema, descartamos la utilización de métodos explícitos. Estos algoritmos suelen sufrir restricciones en términos de estabilidad. Decidimos no emplearlos ya que su región de estabilidad es acotada, lo que nos obligaría a tomar tamaños de paso muy pequeños y, consecuentemente, el coste computacional sería muy alto. Por otra parte, los métodos lineales multipaso implícitos se diferencian de los explícitos al emplear información de pasos anteriores, en lugar de solo el paso previo, para el cálculo de la solución en el siguiente instante. Se basan en aproximaciones polinómicas y logran precisiones superiores que los métodos que emplean un único paso.

Dado el conjunto de ecuaciones no lineales que planteamos, elegimos trabajar con métodos con regiones de estabilidad no acotadas, como por ejemplo las fórmulas de diferenciación hacia atrás conocidas como BDF. Tal y como se comentó en el *Capítulo 3*, estos son una familia de métodos lineales implícitos de integración numérica basados en la aproximación de la derivada de una función en un punto, empleando para ello la información de pasos previos.

De esta manera, el modelo fue implementado en el entorno de programación de Matlab, empleando un *script* que recoge todas las ecuaciones diferenciales, definido en forma de función, junto a un código principal que permite ajustar los hiperparámetros (*NEstimulation*, *Cl_ostimulation*, *TMAX*) de cada ejecución, así como obtener diversas gráficas (*Script (4)*).

Las ecuaciones diferenciales han sido resueltas con *ode15s*, método empleado para la resolución de problemas rígidos basado en una combinación de los métodos BDF de orden 1 a 5 (L. Shampine, 2016; L. F. Shampine et al., 1999). El método *ode15s* nos permite integrar un sistema entre un tiempo inicial t_0 hasta un tiempo final t_f con unas condiciones iniciales y_0 , de acuerdo con la siguiente sintaxis:

$$[t,y] = ode15s(odefun,tspan,y0)$$

Los resultados ofrecidos por *ode15s* contienen un vector con los instantes de tiempo en los que se ha evaluado la solución (t) y una matriz (y) donde cada columna representa los valores de las variables dependientes en dichos instantes de tiempo. Debido a las características de nuestro problema, esta matriz tendrá 22 columnas y tantas filas como instantes de tiempo decidamos definir.

El método escogido emplea un esquema de paso temporal variable, por lo que ajusta de manera automática el tamaño de paso conforme a la suavidad y variabilidad del modelo presentado. Así mismo, resulta adecuado para la resolución de EDOs rígidas ya que ajusta el orden de los métodos BDF según la rigidez del problema, manejando sistemas con pasos de integración relativamente grandes sin comprometer la estabilidad numérica, ya que emplea regiones no acotadas de estabilidad (L. F. Shampine et al., 1999; L. Shampine, 2016).

Capítulo 6.

Resultados obtenidos

6.1. Estado estacionario

Tal y como se comentó previamente, antes de ejecutar cualquier protocolo sobre el modelo, se deberán asegurar ciertas condiciones que garanticen que el modelo parte de su estado estacionario. En el contexto de un modelo computacional, el estado estacionario se refiere al estado en el que el sistema modelado y sus variables no cambian con el tiempo. En otras palabras, las propiedades del sistema se mantendrán constantes y no experimentarán cambios significativos. Estas condiciones pueden resultar de gran interés para comprender el comportamiento a largo plazo de un sistema, además de para realizar un análisis cuantitativo del modelo y obtener predicciones más precisas.

Siguiendo estas ideas, se diseña el *Script (2)* para determinar las condiciones que asegurarán el estado estacionario del modelo antes de la implementación de cada protocolo. A pesar de que en cada experimento se aplicarán variaciones en algunos parámetros, las condiciones de reposo se calcularán siempre siguiendo este ejemplo. El programa diseñado ejecuta el modelo completo, fijando los siguientes hiperparámetros:

- $TMAX = 3.6 \times 10^6 \text{ ms}$
- $NE_stimulation = 0 \text{ mM}$
- $Cl_o_stimulation = 129.0 \text{ mM}$

Dicho programa establece un tiempo de ejecución largo (1 hora), junto a unas condiciones fisiológicas de cloruro extracelular (129 mM) y en ausencia de estimulación con NE. El hiperparámetro A_b se ajusta de manera automática, en función de las condiciones iniciales introducidas por defecto, como resultado de igualar las corrientes I_{ClCa} e I_{bCl} con signo opuesto y despejar el factor A_b de dicha expresión.

De esta manera, el modelo se ejecuta completo y se almacenan los resultados en una matriz, donde cada una de sus columnas representa una variable y cada una de sus filas recoge la resolución en los instantes de tiempo en los que se ha evaluado. Para determinar las nuevas condiciones iniciales, se realiza la media de los últimos 15 valores obtenidos para cada variable; pasando este resultado a ser el conjunto de nuevas condiciones. La *Tabla (5)* almacena las condiciones iniciales actualizadas tras ejecutar el programa, donde se puede apreciar cómo algunas se han modificado ligeramente con respecto a las condiciones propuestas en el modelo original de Kapela et al., (2008). Esto es algo esperable, ya que hemos realizado sucesivas modificaciones sobre este modelo, por lo que las condiciones de equilibrio deben reajustarse antes de iniciar un nuevo protocolo.

Tabla 5. Condiciones iniciales fijadas a partir del estado estacionario.

Variable	V_m	d_L	f_L	p_K	q_1	p_f	p_s	R_{01}	R_{10}	R_{11}	Ca_u
Condición inicial	-55.13	0.00	0.81	0.05	0.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.84

Variable	Ca_r	Ca_i	q_2	P_{SOC}	Cl_i	h_{IP3}	G	IP_3	DAG	M	AM_P
Condición inicial	0.81	79.9	0.00	$1.2 \cdot 10^{-4}$	54.16	0.56	0.00	0.00	0.00	0.99	0.00

Con el fin de mostrar la estabilidad del sistema, también se muestra en la *Figura (9)* la respuesta temporal del programa diseñado para cada una de las variables consideradas en el modelo. Aquí se indican las unidades de medida de cada una de ellas.

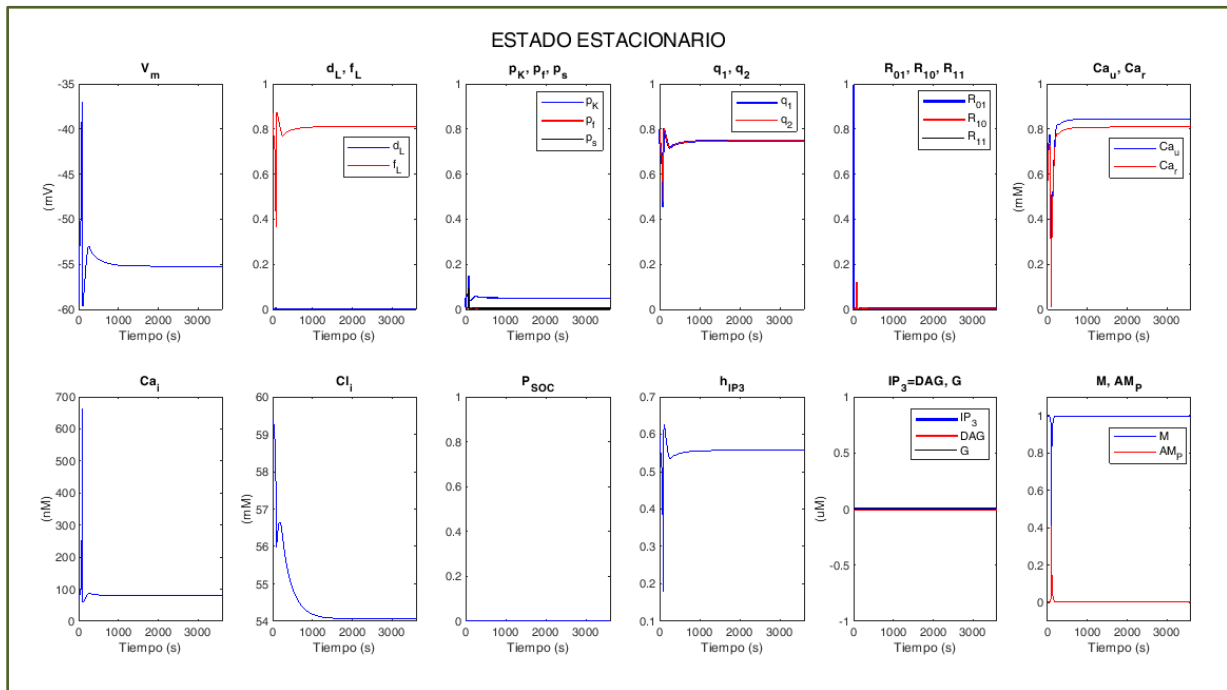


Figura 9. Resultados del modelo en el estado estacionario.

Los resultados obtenidos muestran cómo cada una de las variables se estabiliza a lo largo del tiempo, sufriendo ciertas oscilaciones antes de alcanzar sus respectivas condiciones de estado estacionario. Dichas oscilaciones pueden ser provocadas por distintos factores, entre ellos, la no linealidad de las ecuaciones o la retroalimentación del sistema considerado. Debido a que el modelo cuenta con ecuaciones diferenciales no lineales complejas, los resultados dan lugar a comportamientos dinámicos oscilantes antes de su estabilización. Esto puede verse en variables como el potencial de membrana, cuya ecuación depende de hasta 10 corrientes diferentes del modelo, cada una de ellas con una expresión muy diferente y en cualquier caso no lineal. También se aprecia en ecuaciones como las correspondientes al calcio, las cuales presentan dependencias con varios factores o componentes del modelo. Esto genera un sistema realimentado cuyo control no resulta sencillo.

En cualquier caso, las condiciones de estado estacionario obtenidas se han dado para unos parámetros concretos obtenidos de modelos previos con enfoques distintos, por lo que la fijación de estas condiciones iniciales específicas también supone un factor que puede generar perturbaciones en el sistema. No obstante, conocer cómo se obtiene el equilibrio del sistema constituye el primer paso para la generación de los siguientes resultados. En definitiva, estas condiciones representan el equilibrio biológico esperado, por lo que la información que proporcionan se corresponde con una situación de funcionamiento normal y estable bajo los valores iniciales considerados. Partiendo de estas condiciones, el conocimiento de las mismas permitirá comprender cómo se comporta el sistema en condiciones de estabilidad y comparar los posibles cambios o resultados de sucesivos experimentos basándonos en esta situación inicial y estable.

6.2. Protocolo A: Cambios en la contracción y en el potencial de membrana ante diferentes $[Cl^-]_i$

El primer protocolo implementado propone investigar las variaciones en el comportamiento del modelo ante distintas concentraciones de cloruro intracelular. Experimentalmente, se ha encontrado evidencia de que la respuesta contráctil de las arterias BPN y BPH ante la estimulación por NE depende de forma muy diferente de la concentración de cloruro utilizado en los experimentos. Si se utiliza una concentración de 0 Cl^- extracelular, la contracción en BPN es un 50% más pequeña que en condiciones de Cl^- fisiológico, mientras que en BPH apenas se ve modificada. La *Figura (10)* muestra estos resultados, junto al porcentaje de inhibición en cada caso cuando se hacen los experimentos en 0 Cl^- .

Una hipótesis razonable es asumir que la diferencia en la respuesta puede ser debida a que los ratones BPN y BPH tienen diferentes concentraciones de cloruro intracelular, y es precisamente la plausibilidad de esa hipótesis la que se pretende explorar con este protocolo.

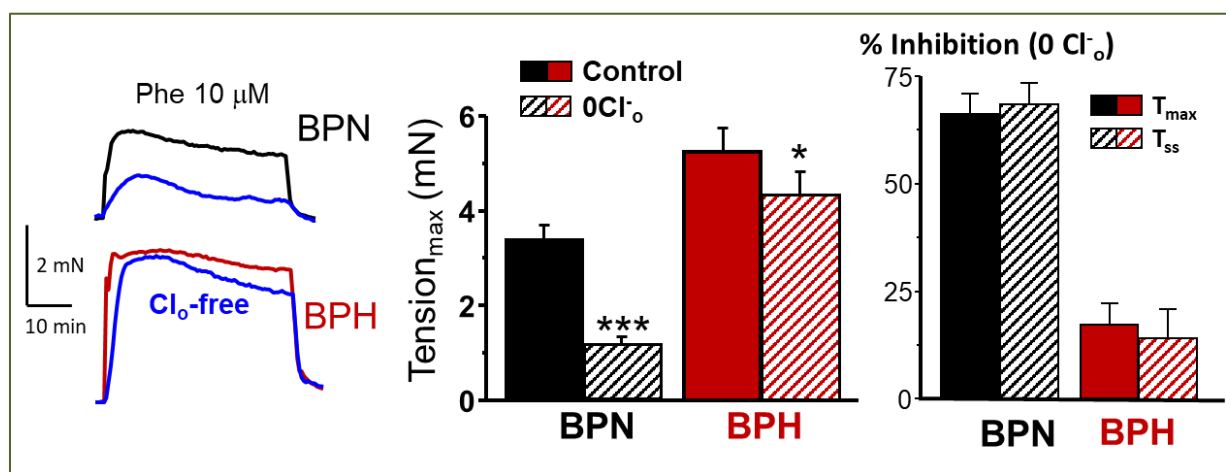


Figura 10. Resultados experimentales en ratones BPN y BPH controles y en condiciones de 0 Cl^- (Unpublished).

Para comprobar esta hipótesis de manera computacional, se modela la situación experimental mediante la eliminación de una ecuación diferencial, la correspondiente a la concentración de cloruro intracelular. De esta manera, partiremos de un sistema de 21 ecuaciones diferenciales que será resuelto con los mismos métodos nombrados anteriormente. Se empleará esta adaptación del sistema, fijando diferentes valores de $[Cl^-]_i$ que permanecerán constantes durante la ejecución y que permitirán explorar distintas situaciones. Estos valores se almacenan en el siguiente vector, donde las concentraciones están expresadas en unidades milimolares (mM).

$$Cl_{ip} = [100, 85, 70, 55, 40, 25, 10, 5]$$

El programa se adaptará con los siguientes hiperparámetros:

- $TMAX = 2 \times 10^6 \text{ ms}$
- $NE_{stimulation} = 0.001 \text{ mM}$
- $Cl_{o_stimulation} = 129.0 \text{ mM}$

De igual manera que se explicó para el estado estacionario, el valor de A_b en la corriente del transportador de cloruro se fija de manera automática considerando un factor P_{Cl} en la corriente de los canales de cloruro activados por calcio de 2×10^{-6} , obtenido mediante métodos experimentales para garantizar la estabilidad del sistema. Con estas condiciones, se aplicará un pulso de NE de 0.001 mM entre los 500 y 1500 segundos de un protocolo cuya duración total es de aproximadamente media hora, de manera similar a como se realiza en los experimentos realizados en el laboratorio.

La aplicación de este pulso se muestra gráficamente en la *Figura (11)*, donde se puede observar cómo el NE es nulo al inicio y al final del protocolo, mientras que en la parte central se aplica el pulso cuadrado cuya concentración viene dada por el valor fijado con el hiperparámetro $NE_{stimulation}$.

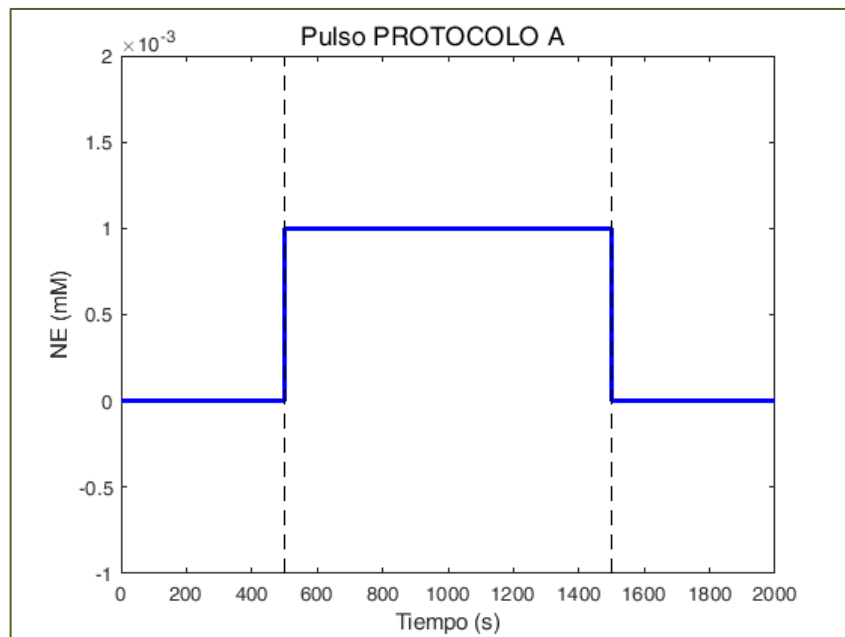


Figura 11. Pulso de NE aplicado durante el Protocolo A.

Este programa se ejecutará tantas veces como distintas concentraciones de cloruro intracelular se consideren, obteniendo los resultados de manera iterativa para cada uno de los valores elegidos de $[Cl^-]_i$, tras fijar inicialmente un cloruro extracelular alto ($[Cl^-]_o = 140 \text{ mM}$) para todos ellos.

Por otro lado, siguiendo el enfoque adoptado en los experimentos, se modelará la situación de 0 cloruro eliminando las dependencias de cloruro de todas las ecuaciones del modelo en las que participe (se asume en este proceso que al eliminar el cloruro extracelular, en el estado estacionario también será cero el cloruro intracelular). Concretamente, se eliminarán los canales de cloruro activados por calcio y la adaptación del sistema de transporte activo de cloruro. Por lo tanto, la corriente I_{Cl} ya no participará en el mantenimiento del potencial de membrana y la expresión del mismo quedará conforme se muestra en la *Ecuación (80)*.

$$\frac{dV_m}{dt} = -\frac{1}{C_m}(I_{VOCC} + I_{Kv} + I_{BKCa} + I_{Kleak} + I_{NSC} + I_{SOC} + I_{PMCA} + I_{NaK} + I_{NCX}). \quad (80)$$

Los resultados obtenidos con el Protocolo A se muestran en la *Figura (12)*, reflejando la evolución temporal de la contracción y del potencial de membrana para distintas concentraciones de $[Cl^-]_i$. También se muestra la respuesta de ambas variables aplicando el sistema diseñado con 0 Cl-. En cualquier caso, se considera en el modelo la ecuación diferencial de la actina unida a miosina fosforilada (AM_p) suficientemente representativa de la fuerza contráctil de la célula (Bennett et al., 2005), por lo que de aquí en adelante se empleará esta variable para demostrar la evolución de la contracción en el protocolo.

En la *Figura (12.A)* se representa la contracción en unidades arbitrarias en la gráfica superior, junto al potencial de membrana en mV en la inferior. De esta manera, podemos apreciar la variación en la respuesta de estas variables ante diferentes valores de $[Cl^-]_i$, considerados constantes durante el protocolo. Durante los primeros instantes, el sistema parte de unas condiciones iniciales determinadas por el estado estacionario, las cuáles serán diferentes para cada valor de $[Cl^-]_i$. Por ello, podemos apreciar cómo, ante $[Cl^-]_i$ bajos, el potencial de membrana está más hiperpolarizado. Sin embargo, conforme aumentamos las concentraciones de cloruro intracelular, el potencial se despolariza cada vez más. El cambio total entre la concentración mayor (100 mM) y la menor (5 mM) en condiciones de reposo es de apenas 1.5 mV en el potencial de membrana, pero esta variación ya resulta suficiente para apreciar ligeros cambios en la respuesta contráctil en reposo.

Al aplicar el pulso de NE, las diferencias son mayores, pudiendo observar cómo, en cualquier caso, el potencial se despolariza, provocando un consecuente cambio en la contracción de la célula. Además es evidente que la magnitud de la respuesta es proporcional a la concentración de cloruro intracelular.

En la *Figura (12.B)* se representa la relación obtenida entre las concentraciones de cloruro intracelular y la contracción obtenida con cada uno de ellos. La concentración se representa en unidades arbitrarias, siendo 1 la contracción obtenida con 0 cloruro.

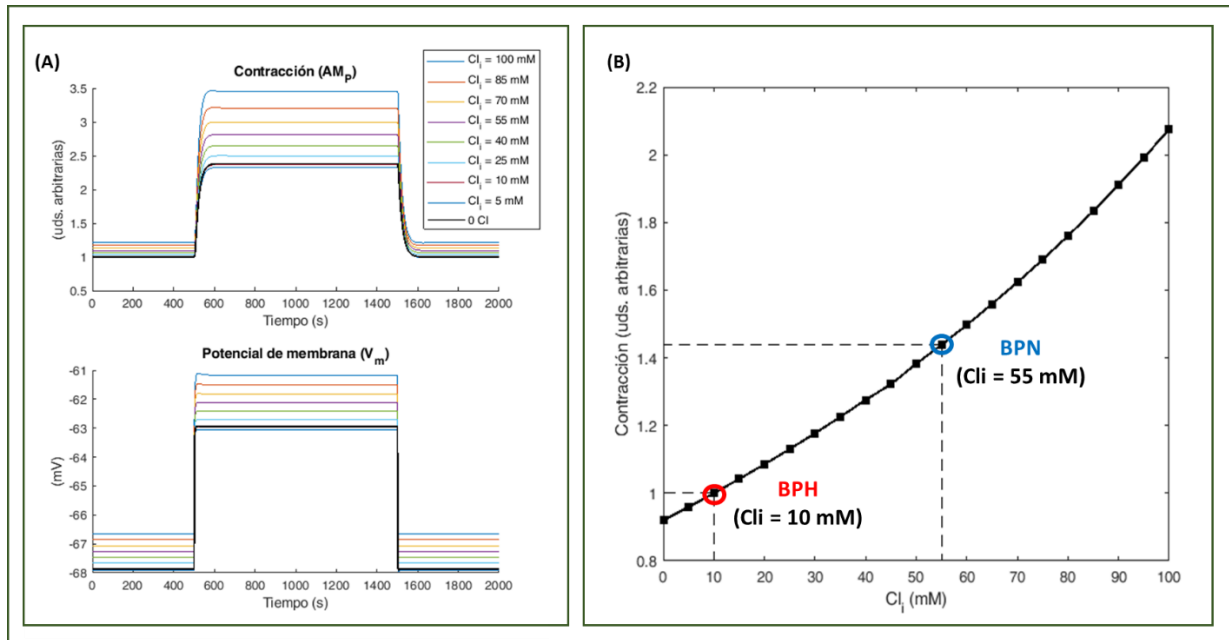


Figura 12. Resultados obtenidos con el Protocolo A.

(12.A). Evolución temporal de la contracción (AMP) y del potencial de membrana (V_m) para distintos valores de $[Cl^-]_i$ y en condiciones de 0 Cl^- , tras la aplicación de un pulso de NE.

(12.B). Relación de la respuesta contráctil obtenida para distintos valores de $[Cl^-]_i$ y su correspondencia en los modelos BPN y BPH.

En la gráfica puede observarse que una de las concentraciones de cloruro intracelular produce una contracción idéntica al 0 cloruro, la correspondiente a $[Cl^-]_i$ de 10 mM. Valores de cloruros por debajo de 10 mM producen contracciones inferiores y por encima de 10 mM, contracciones mayores. Si las arterias de los ratones BPH tuvieran un $[Cl^-]_i$ de 10 mM, la contracción en 0 cloruro sería similar a al control. Por otra parte, si los ratones BPN tuvieran un cloruro elevado (v.g. 55 mM), la contracción se inhibiría considerablemente al eliminar el cloruro extracelular. Analizaremos en el siguiente capítulo los resultados de estas gráficas, relacionándolos con los obtenidos en experimentos reales.

6.3. Protocolo B: Análisis de la contracción modulado por cloruro

El objetivo general del segundo protocolo consiste en explorar la relación de la contracción con posibles parámetros del modelo. Siguiendo la línea del protocolo anterior, se decide limitar el campo de estudio y centrarse en los cambios dependientes de cloruro. Por lo tanto, el Protocolo B también propone observar las variaciones en la contracción celular tras modificar las condiciones de cloruro intracelular iniciales, pero aplicando una condición adicional con respecto al Protocolo A. Esta condición consiste en analizar los cambios en la respuesta contráctil al eliminar el cloruro extracelular de forma instantánea durante un pulso de NE, y comparar la respuesta del modelo con la respuesta experimental al aplicar un protocolo idéntico. Concretamente se estudia la respuesta de ese protocolo asumiendo diferentes permeabilidades de los canales de cloruro dependientes de calcio y asumiendo diferentes concentraciones de cloruro intracelular.

Para ello, se parte del modelo genérico de 22 ecuaciones que incluye la ecuación diferencial de la concentración de cloruro intracelular. El programa se ejecutará conforme a los siguientes hiperparámetros:

- $TMAX = 1.5 \times 10^6$ ms
- $NE_stimulation = 0.001$ mM
- $Cl_o_stimulation = 0.001$ mM

Se comienza dejando el sistema en estado estacionario durante un periodo inferior a 5 minutos (200 segundos). En este punto, se estimula con un pulso de NE de concentración 1 microM que dura hasta el final de la ejecución. A diferencia del protocolo anterior, en este caso también se aplica un pulso de cloruro intracelular prácticamente nulo, disminuyendo la concentración de esta variable a 0.001 mM a los 5 minutos de aplicar el pulso de NE. La *Figura (13)* muestra la aplicación de estos pulsos en el intervalo temporal considerado.

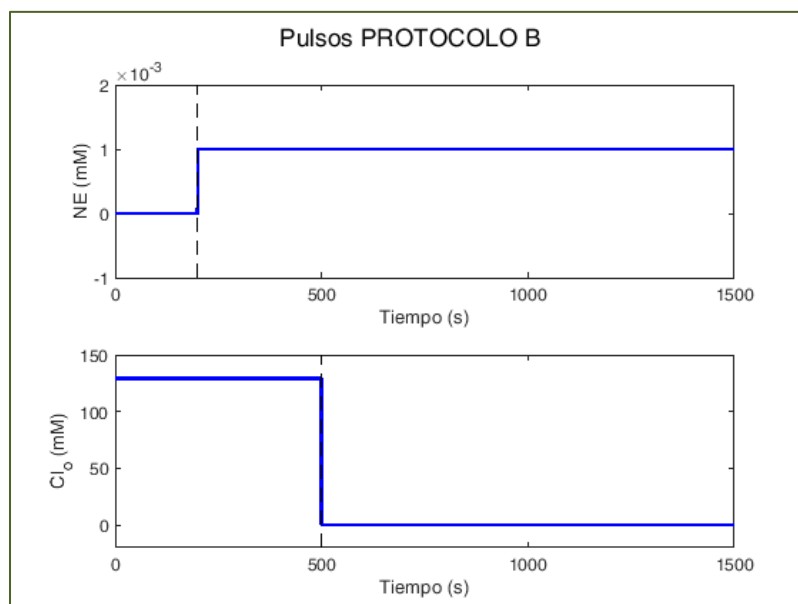


Figura 13. Pulsos aplicados durante el Protocolo B

Debido al enfoque considerado, centrado en la modulación dirigida por cloruro, se planteó analizar la dependencia de la contracción con las corrientes I_{bCl} e I_{ClCa} . Sin embargo, la primera de ellas se modela como una ecuación simple que tan solo depende de un factor multiplicado por la diferencia entre las concentraciones extra e intracelulares de cloruro. Debido a que dicho factor A_b se obtiene de manera automática y depende exclusivamente de la corriente I_{ClCa} obtenida con cada conjunto de valores de $[Cl^-]_i$, se descarta la modulación de la contracción con el transportador de cloruro. Por lo tanto, se consideran los canales de cloruro dependientes de calcio como los principales responsables en este estudio de los cambios observados en la contracción. Si recordamos la ecuación planteada para representar la corriente a través de dichos canales, podemos ver cómo esta depende de un término al que se ha llamado P_{Cl} . Este, a su vez, depende de la concentración intracelular de calcio, de la EC_{50} para la activación de los canales, de un coeficiente de Hill que consideramos fijo y de un factor denominado P_{Cl_i} .

Entre todos ellos, podríamos modular la contracción a partir de la EC50 y del factor P_{Cl_i} . Sin embargo, como P_{Cl_i} es un factor directo de la corriente en cuestión, consideramos este como el término a emplear en el protocolo. En este contexto, para probar las dependencias que presenta la contracción con otras variables del modelo, especialmente con la corriente I_{ClCa} , se propone comprobar la variación de la misma ante distintas concentraciones de $[Cl^-]_i$ y distintos valores de permeabilidad de cloruro (P_{Cl_i}). En el programa, se genera un vector de valores de $[Cl^-]_i$ expresado en unidades milimolares y otro con diferentes permeabilidades adimensionales, evaluando el modelo de acuerdo con los pulsos explicados anteriormente. El rango de valores con los que se probará el modelo son los siguientes:

$$Cl_i = [15, 30, 45, 60, 70];$$

$$P_{Cl_i} = [8e-8, 9e-8, 1.1e-7, 1.3e-7, 1.5e-7, 1.7e-7, 1.8e-7];$$

Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura (14)*. Aquí podemos ver el resultado de la contracción para las diferentes concentraciones de cloruro intracelular en cada una de las gráficas, donde el valor de la concentración aumenta conforme se avanza hacia gráficas inferiores. Así mismo, en cada gráfica, los trazos de diferentes colores muestran la respuesta ante distintas permeabilidades. Se puede apreciar cómo, para todos los $[Cl^-]_i$ considerados, la contracción aumenta a medida que el valor de la permeabilidad se hace mayor. Esto ocurre porque las corrientes de cloruro a través del canal dependiente de sodio aumentan, permitiendo una mayor entrada de cloruro hacia el espacio intracelular. Como ya vimos con el protocolo anterior, ante un pulso de NE, la contracción será mayor para valores de cloruro intracelulares elevados, por lo que los resultados en principio se corresponden con lo esperable.

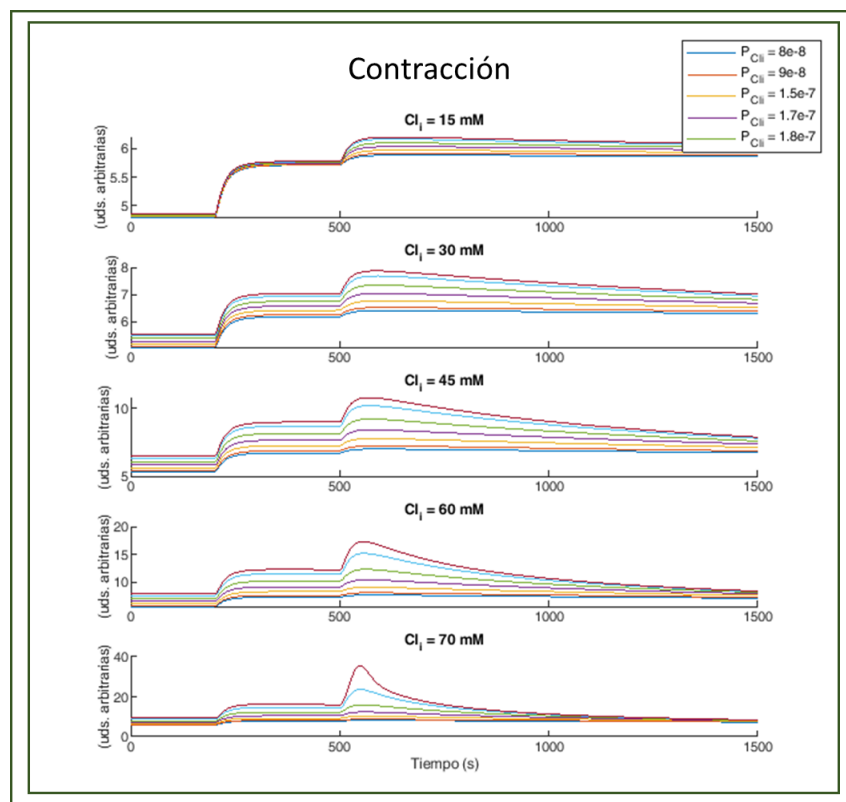


Figura 14. Resultados obtenidos con el Protocolo B.

Además, en este protocolo hay que considerar que también se aplica un pulso de cloruro extracelular nulo, que genera un pico en la contracción, seguido de una disminución exponencial de la misma con el tiempo. Podemos analizar en profundidad estos dos aspectos gracias a las representaciones incluidas en la *Figura (15)*.

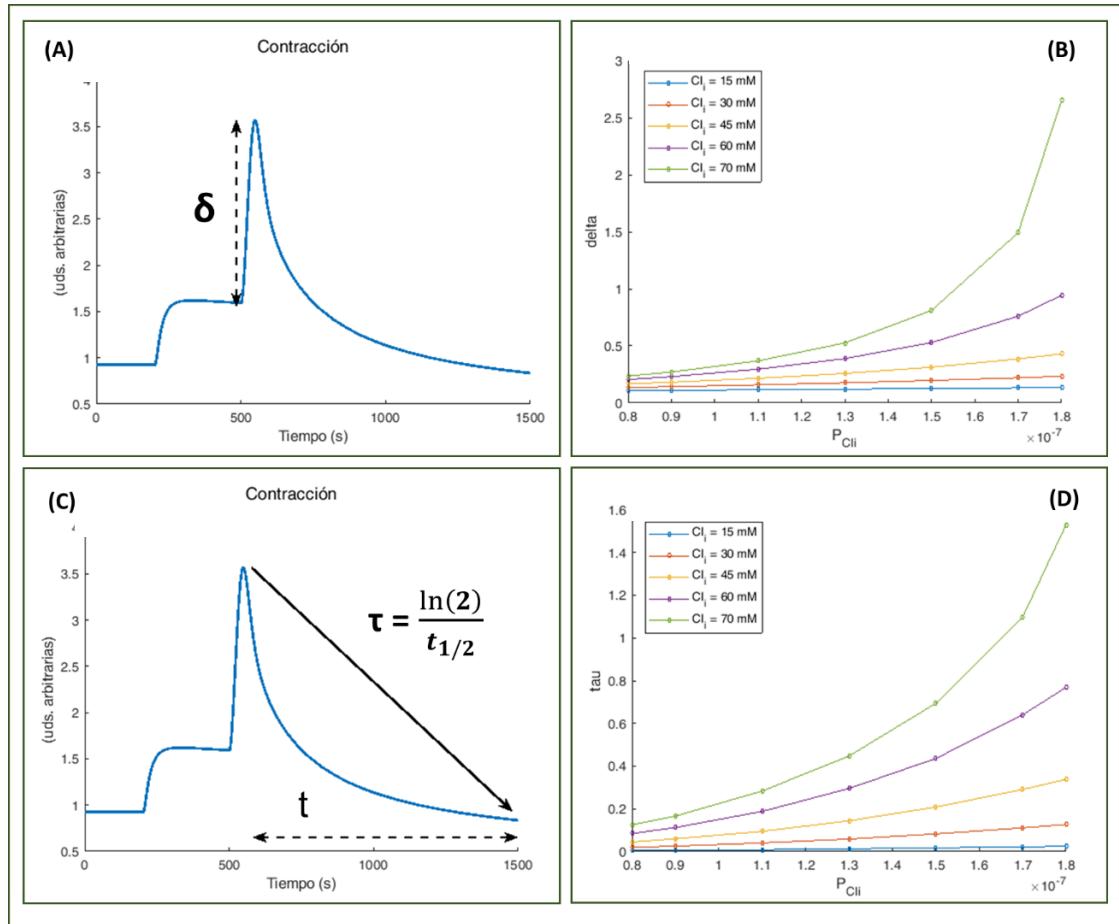


Figura 15. Representación de los parámetros extraídos de la evolución temporal de la contracción y su relación con $[Cl^-]_i$ y P_{Cl_i} .

(15.A). Representación del parámetro δ .

(15.B) Variación de δ con P_{Cl_i} para diferentes $[Cl^-]_i$.

(15.C). Representación del parámetro τ .

(15.D) Variación de τ con P_{Cl_i} para diferentes $[Cl^-]_i$.

En primer lugar, la *Figura (15.B)* refleja, para cada concentración de cloruro intracelular probado, la diferencia en la fuerza contráctil desde el momento en el que se aplica el pulso de 0 cloruro hasta que se alcanza el máximo en la contracción. Esta diferencia se denominará δ y se representa la evolución de la misma conforme aumenta el valor de P_{Cl_i} , con un trazo diferente para cada cloruro intracelular considerado. Los resultados permiten ver valores de δ menores para concentraciones de cloruro intracelular pequeñas, así como δ mayores para P_{Cl_i} grandes. Por lo tanto, podemos afirmar que el aumento transitorio en la contracción en situaciones de cloruro extracelular prácticamente nulo depende de manera directa de $[Cl^-]_i$ y de P_{Cl_i} . Así mismo, se aprecia que la relación existente entre la contracción y P_{Cl_i} es aparentemente lineal para valores de $[Cl^-]_i$ bajos, mientras que si esta concentración aumenta, se pierde la linealidad en los resultados, siendo más notables las diferencias en la contracción para diferentes permeabilidades.

Por otra parte, se estudia también la dependencia de la caída de la contracción tras el pico con la permeabilidad. Esto puede analizarse en base a la constante de tiempo asociada a la caída. Asumiendo que esta parte del modelo muestra un decaimiento exponencial, podemos decir que se comporta de acuerdo con la *Ecuación (81)*.

$$AM_P(t_{final}) = AM_P(t_{pico}) e^{-\tau t} . \quad (81)$$

En esta expresión se considera el valor de la contracción en el momento del pico como $AM_P(t_{pico})$ y el de la contracción al final del protocolo como $AM_P(t_{final})$; siendo t el intervalo temporal entre ambos puntos ($t = t_{final} - t_{pico}$).

De aquí podemos despejar el valor de τ , considerando este como la constante de decrecimiento buscada, la cual se refleja en la *Ecuación (82)*.

$$\tau = - \frac{\ln \left(\frac{AM_P(t_{final})}{AM_P(t_{pico})} \right)}{t} . \quad (82)$$

La determinación tanto de δ como de τ aparecen reflejadas en la *Figura (15.A)* y *Figura (15.C)*, mientras que la representación de las constantes de decrecimiento para cada cloruro intracelular y para cada permeabilidad aparecen en la *Figura (15.D)*. Los resultados en este caso son similares a los obtenidos al analizar δ , viendo como τ depende de manera directa de $[Cl^-]_i$ y de P_{Cl} . Al igual que en el caso anterior, esta relación se hace cada vez menos lineal conforme aumenta el cloruro intracelular considerado.

En conjunto, los resultados de este protocolo muestran cómo la respuesta de la contracción depende de ambas variables relacionadas con el cloruro, siendo δ más grande ante $[Cl^-]_i$ y P_{Cl} altos. Por otra parte, las mismas dependencias se aprecian para la constante de decaimiento, demostrando cómo las curvas con un τ mayor tendrán una caída más pronunciada, siendo este parámetro más grande ante $[Cl^-]_i$ y P_{Cl} altos.

Parte 3. Discusión y conclusiones

Capítulo 7.

Discusión de los resultados

7.1. Discusión de los resultados obtenidos

Una vez obtenidos los resultados de las distintas simulaciones, podemos analizar algunos aspectos de cada uno de ellos, discutirlos y compararlos con los valores esperados en la realidad. Debemos tener en cuenta la especificidad del modelo generado, ya que, a pesar de contar con numerosos elementos, conseguir un control preciso de todos ellos es una tarea compleja y delicada. Por esta razón, ya hemos comprobado la necesidad de limitarse al análisis de aspectos concretos. En nuestro caso, se ha enfocado hacia el estudio de los cambios en la contracción y en el potencial de membrana generados por variaciones en las concentraciones de cloruro intra y extracelular, así como en su permeabilidad en los canales calcio-dependientes. En definitiva, hemos logrado generar un modelo que representa la dependencia de cloruro en la contracción para tiempos largos, pudiendo comparar los resultados obtenidos con algunos paradigmas experimentales, realizando a continuación un análisis tanto cuantitativo como cualitativo de los mismos.

7.1.1. Protocolo A: Cambios en la contracción y en el potencial de membrana ante diferentes $[Cl^-]_i$

Los resultados obtenidos con el Protocolo A muestran cómo el comportamiento del sistema modelado se corresponde parcialmente con lo observado en la realidad. Como es de esperar, en la *Figura (12.A)* los resultados de la contracción para el 0 Cl^- (representados con un trazo negro) muestran un potencial de membrana hiperpolarizado con respecto a los modelos con cloruros intracelulares elevados. Concretamente, se aprecia cómo el resultado del 0 Cl^- , se superpone a la evolución en el caso de fijar un $[Cl^-]_i = 10$ mM, pudiendo asociar esta situación a las condiciones de los ratones BPH.

Bajo estos supuestos, se puede afirmar que la contracción del modelo resulta dependiente de la concentración de cloruro en el exterior de la célula, siendo mayor esta dependencia cuanto mayor sea dicha concentración intracelular. Es decir, ante $[Cl^-]_i = 55$ mM, concentración correspondiente con ratones BPN, la contracción resulta más dependiente del cloruro extracelular que en ratones BPH, con $[Cl^-]_i = 10$ mM. Estos resultados corroboran las hipótesis planteadas en el laboratorio, donde se ha propuesto la ausencia de cambios en la contracción en ratones BPH en presencia o ausencia de cloruro extracelular en el modelo.

Es por esta razón por la que se aprecia esa superposición en ambas gráficas de la *Figura (12.A)*. Sin embargo, los ratones BPN presentan una mayor sensibilidad ante cambios en el cloruro extracelular, disminuyendo su contracción en situaciones de 0 cloruro. Las mismas conclusiones se extraían de la *Figura (12.B)*, donde aparece representada el valor de la contracción en unidades arbitrarias frente a distintos valores de $[Cl^-]_i$.

No obstante, a pesar de que el modelo diseñado explica esta dependencia de la contracción con el cloruro intracelular, los resultados de laboratorio demuestran que la contracción de los ratones BPH es mayor ante el pulso de NE que la obtenida con los BPN. Este es un aspecto que nuestro modelo no ha podido reproducir, ya que los cambios que se han intentado aplicar en diferentes elementos del sistema, teniendo en cuenta las diferencias experimentales entre los ratone BPN y BPH, no han permitido generar modelos computacionalmente estables.

Teniendo esto en cuenta, una representación completa de la comparación de ambos resultados se muestra en la *Figura (16)*. Aquí vemos el modelado del ratón BPN con $[Cl^-]_i = 55 \text{ mM}$ (trazo negro) y el de BPH con $[Cl^-]_i = 10 \text{ mM}$ (trazo rojo), comparando ambos con el resultado de 0 cloruro (trazo azul). Estos resultados son obtenidos con el modelo computacional (*Figura (16.A)*) y con los experimentos reales (*Figura (16.B)*). Efectivamente, vemos cómo la contracción en los resultados computacionales es mayor para modelos BPN, de manera contraria a lo apreciable con las pruebas de laboratorio. Sin embargo, en ambos resultados se aprecia cómo la contracción en BPH permanece invariable ante el 0 Cl^- , mientras que en BPN disminuye considerablemente.

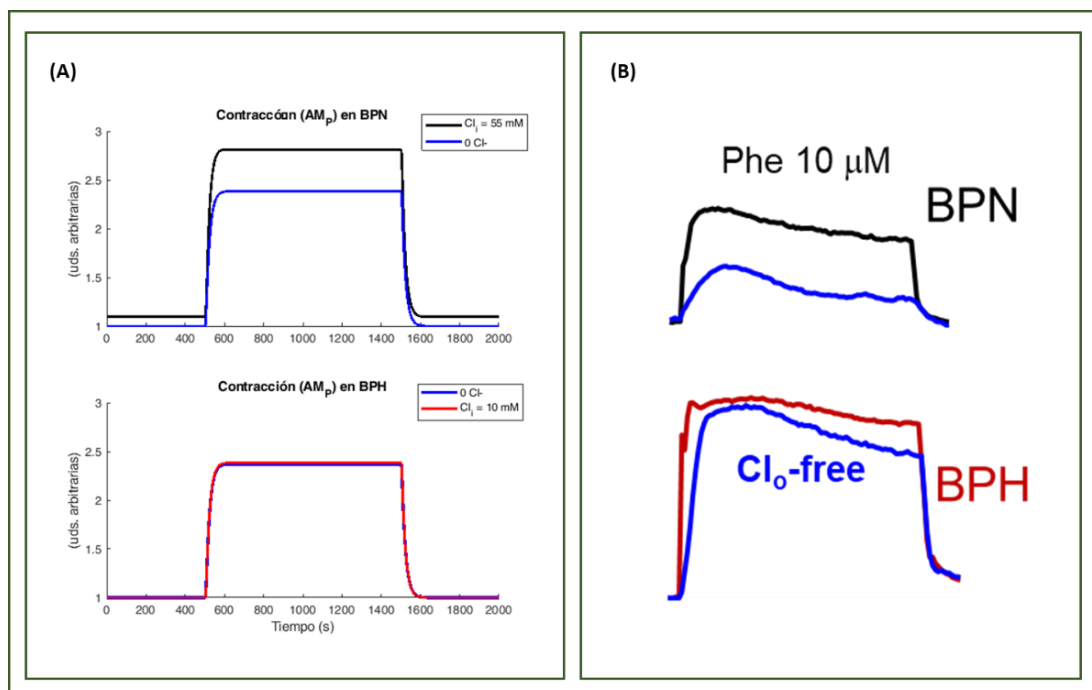


Figura 16. Comparación de los resultados obtenidos con el modelo computacional y con los experimentos reales durante el Protocolo A.

(16.A). Resultados obtenidos con el modelo computacional para la simulación de cloruro intracelular asociado a BPN y a BPH en comparación con la situación de 0 Cl^- .

(16.B). Resultados obtenidos con los experimentos reales para la simulación de cloruro intracelular asociado a BPN y a BPH en comparación con la situación de 0 Cl^- (Unpublished).

7.1.2. Protocolo B: Análisis de la contracción modulado por cloruro

Con el fin de poder analizar los resultados obtenidos con el Protocolo B, se discutirá su relación con las conclusiones extraídas de pruebas realizadas previamente en el laboratorio. Siguiendo la línea del Protocolo A, donde se buscaba encontrar diferencias significativas tanto cualitativas como cuantitativas entre ratones BPN y BPH, en este caso podremos comparar los resultados obtenidos para las variaciones en el valor de δ .

Una aproximación teórica simplista al Protocolo experimental B y a la interpretación mecanística de δ es considerar los cambios en V_m producidos al aplicar 0 Cl⁻ de forma instantánea, utilizando únicamente la ecuación de Goldman y algunos supuestos (*Ecuación (83)*).

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_K K_o + P_{Na} Na_o + P_{Cl} Cl_i}{P_K K_i + P_{Na} Na_i + P_{Cl} Cl_o} \right). \quad (83)$$

Bajo la suposición de que, al eliminar el cloruro extracelular, considerando que el intracelular no varía instantáneamente, podemos expresar los cambios en el potencial de membrana (ΔV_m) de acuerdo con la *Ecuación (84)*.

$$\Delta V_{mCl_i}^{Cl_o=0} = \frac{RT}{F} \ln \left(1 + \frac{P_{Cl} Cl_o}{P_K K_i + P_{Na} Na_i} \right). \quad (84)$$

Teniendo en cuenta que, tanto P_{Na} como Na_i , son mucho más pequeñas que P_K y K_i , podemos asumir que $P_K K_i \gg P_{Na} Na_i \rightarrow P_K K_i + P_{Na} Na_i = P_K K_i$. Además, sustituyendo las permeabilidades absolutas por las permeabilidades relativas a potasio ($P_{Cl_i} = P_{Cl}/P_K$), podemos llegar a la expresión de la *Ecuación (85)*.

$$\Delta V_{mCl_i}^{Cl_o=0} = \frac{RT}{F} \ln \left(1 + P_{Cl_i} \frac{Cl_o}{K_i} \right). \quad (85)$$

De esta manera, al utilizar la ecuación de Goldman parece que, al eliminar el cloruro extracelular, se produce una despolarización que depende fundamentalmente de la permeabilidad relativa del cloruro (P_{Cl_i}), debido a que el cociente Cl_o/K_i se considera próximo a 1. El δ en la contracción sería consecuencia de esta despolarización, que dependería directamente del valor de P_{Cl_i} .

Los resultados experimentales mostrados en la *Figura (17)* muestran un cambio en la contracción (δ) prácticamente igual para BPH que para BPN. Siguiendo la predicción de la ecuación de Goldman, P_{Cl_i} sería muy similar en BPN y BPH. Sin embargo nuestro modelo computacional muestra que el valor de δ no sólo es función de P_{Cl_i} , sino también del valor de $[Cl^-]_i$.

En este contexto, el protocolo A ya sugería que los ratones BPN tienen $[Cl^-]_i$ altos y los BPH $[Cl^-]_i$ bajos. Por lo tanto, si δ se considera similar en BPN y BPH y se predice que el $[Cl^-]_i$ es diferente, P_{Cl_i} también debería ser diferente. Siguiendo la representación de la *Figura (14.B)*, ante $[Cl^-]_i$ altos de los ratones BPN, estos deberían mostrar una P_{Cl_i} más bajas, mientras que los BPH con $[Cl^-]_i$ bajos deberían tener P_{Cl_i} mayores. El resultado será un δ similar en ambos casos que consigue demostrar que este valor depende de ambas variables.

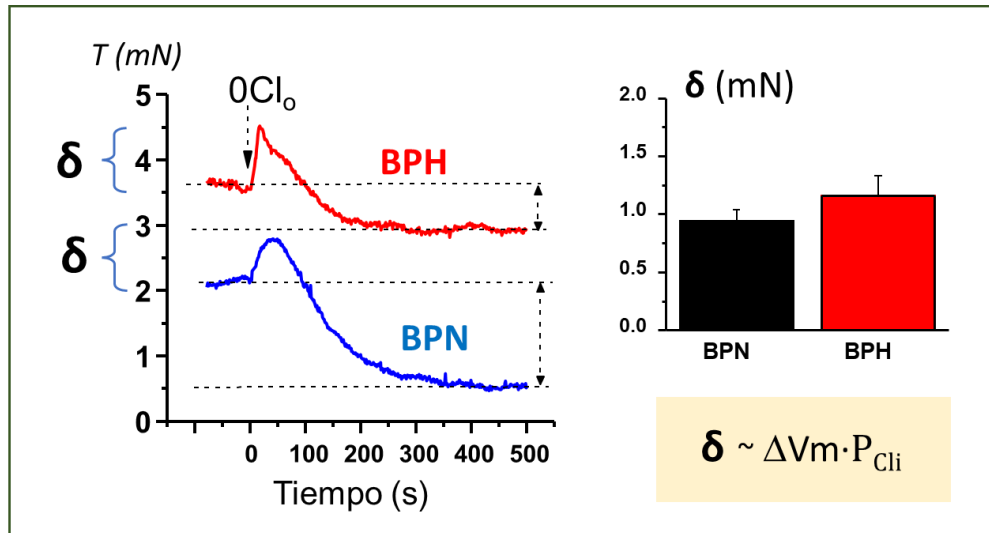


Figura 17. Variaciones en la contracción en BPH (rojo) y BPN (azul) en situaciones de $0 Cl^-$.

En definitiva, el modelo computacional desarrollado ofrece una interpretación más completa de los resultados experimentales que la interpretación simplista a partir de la ecuación de Goldman. De hecho, la predicción del modelo de que la P_{Cl_i} debe ser mayor en los ratones BPH es compatible con los resultados obtenidos en el laboratorio que muestran una mayor expresión relativa de los canales ANO1 (Figura (18)). Estos canales son los que actualmente se cree que median las corrientes de cloruro dependientes de calcio en las células de músculo liso vascular (Wray et al., 2021).

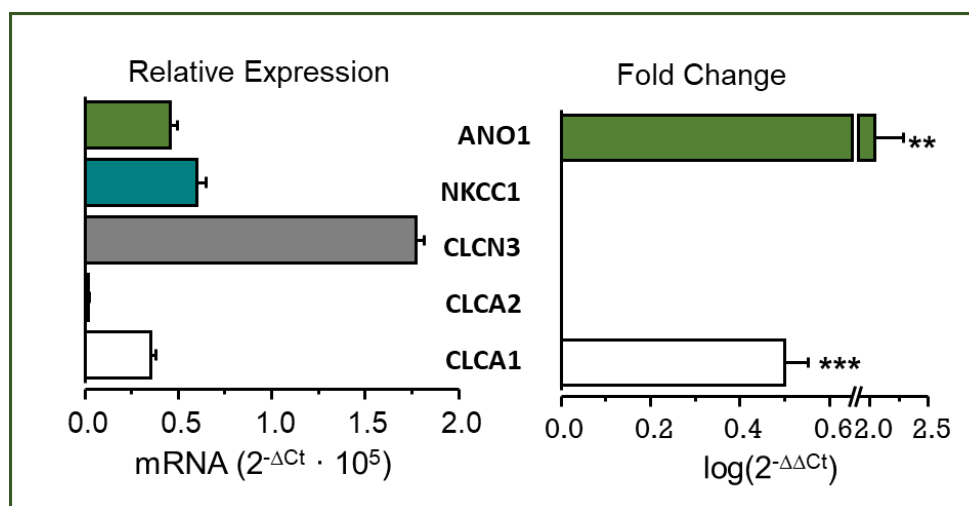


Figura 18. Expresión relativa de mRNA y Fold Change en BPH.

7.2. Limitaciones

Durante el desarrollo de este trabajo se han identificado ciertas limitaciones, algunas de ellas son atribuibles a cualquier modelo computacional de este calibre, mientras que otras se consideran como restricciones propias causadas por las simplificaciones o adaptaciones del sistema.

En primer lugar, el modelo original de Kapela et al., (2008) ya resaltaba su exclusividad para tiempos cortos, donde trabajaban en experimentos cuya duración no sobrepasaba los 150 segundos, por lo que su aplicabilidad en tiempos de varios minutos e incluso horas no estaba asegurada. Sin embargo, se han realizado ciertas suposiciones y simplificaciones que permiten analizar la respuesta contráctil en tiempos largos, adaptando el comportamiento de las bombas y eliminando la sensitización de la maquinaria contráctil.

A pesar de que estas adaptaciones que se han aplicado sobre modelos previos pretenden hacer el modelo más comprensible y resistente a protocolos largos, esto puede actuar como una limitación al no capturar toda la variabilidad y complejidad del sistema biológico real, resultando en un modelo menos preciso.

Así mismo, el principal modelo tomado como referencia para el desarrollo del trabajo también indicaba la inexactitud de algunos de sus parámetros. En Kapela et al., (2008) tuvieron la necesidad de adaptar ciertas variables basándose en datos experimentales o de tomar variables de otros estudios debido a la ausencia de evidencias propias que calibraran y validaran los resultados. Junto a esto, se añade que, a pesar de que la temperatura considerada en el modelo es de 20°C, diversos parámetros fueron obtenidos para temperaturas de 37°C, lo cual afecta a aquellos componentes celulares dependientes de la temperatura.

En general, la falta de datos completos y precisos en el modelado de un sistema biológico supone una gran desventaja, siendo necesario ampliar las bases de datos disponibles mediante experimentación para aumentar la precisión de futuros resultados.

Por otra parte, a pesar de que se tiene en cuenta que en el desarrollo de cualquier modelo computacional la abstracción será una parte del mismo que siempre estará presente, realizar ciertas suposiciones acerca de la homogeneidad espacial o la ausencia de otros componentes del modelo diferentes a los incluidos puede limitar la representatividad del mismo. En nuestro caso, asumir concentraciones de sodio y potasio intracelular, así como de PIP₂ constantes, junto a la eliminación de los parámetros dependientes de cGMP, puede generar perturbaciones en el comportamiento del sistema. La incertidumbre en estos aspectos puede influir en la precisión y confiabilidad de los resultados del modelo generado.

Además, a la hora de la obtención de los resultados hemos encontrado algunas diferencias con los resultados extraídos de experimentos reales. Resultará necesario desarrollar nuevos protocolos computacionales comprobables que exploren en profundidad estos aspectos o incorporar mejoras al modelo para poder simular las condiciones precisas de los ratones BPN y BPH. Sin embargo, la medición de los parámetros implicados en este proceso en el laboratorio resulta complejo debido a la falta de sistemas o técnicas precisas, así como la necesidad de desarrollar bloqueadores específicos que estudien la corriente a través de ciertos canales.

Para finalizar, cabe destacar de nuevo que los sistemas biológicos reales de este ámbito resultan intrincados y están compuestos por una multitud de interacciones y procesos a diferentes escalas. Modelar adecuadamente estas relaciones y capturar su dinámica puede ser extremadamente desafiante y ambicioso. Es por esta razón por la que el modelo desarrollado se enfoca en aspectos específicos y decide simplificar aquellos que se alejan del objeto de estudio, lo que limita su capacidad para capturar la complejidad de las numerosas interacciones biológicas.

Capítulo 8.

Conclusiones y líneas futuras

8.1. Consecución de los objetivos

La realización de este Trabajo de Fin de Grado ha resultado un proyecto ambicioso, el cual ha permitido obtener los resultados presentados en las secciones anteriores. En base al análisis y discusión de los mismos, podemos afirmar que se ha cumplido el objetivo principal planteado al inicio del trabajo, así como los siguientes objetivos específicos:

- I) Se ha realizado una revisión bibliográfica de modelos previos acerca de SMC, comprendiendo los objetivos específicos de su diseño y extrayendo los aspectos más relevantes de los mismos.
- II) Se han comprendido las bases fisiológicas del músculo liso, así como la regulación de sus mecanismos de contracción. También se han explorado las bases matemáticas de las ecuaciones diferenciales, su aplicación en la generación de modelos computacionales y la resolución de los mismos.
- III) Se ha desarrollado un modelo genérico de SMC basado en modelos previamente publicados. Así mismo, se ha adaptado en base a datos obtenidos de otros autores o de datos experimentales y simulaciones computacionales. En este proceso se ha conseguido familiarizarse con el entorno de programación de Matlab, así como con la resolución de ecuaciones diferenciales.
- IV) Se ha logrado definir y simular un protocolo genérico para establecer las condiciones de estado estacionario del modelo, junto a dos protocolos específicos con el fin de validar el efecto de ciertos parámetros sobre algunas variables del modelo, como el potencial de membrana o la respuesta contráctil del sistema.
- V) Se han extraído las conclusiones de los resultados obtenidos, así como se han identificado ciertas limitaciones y futuras líneas de seguimiento, las cuales se plasmarán en los siguientes apartados.

No obstante, ya se adelantó que no se ha podido completar el objetivo de definir dos submodelos diferentes adaptados para dos cepas de ratones (BPN y BPH), por lo que esta será una importante línea de investigación en trabajos posteriores.

Como medida compensatoria, se han obtenido resultados para diversas concentraciones de cloruro intracelular, pudiendo observar su comportamiento y asociar un valor de las mismas para simular el comportamiento en ratones BPN y BPH, lo cual finalmente sí que ha resultado de gran utilidad para conseguir comparar los resultados obtenidos con los esperados en la realidad.

8.2. Conclusiones extraídas

Una vez obtenidos y analizados los resultados, podemos extraer algunas conclusiones:

- I) El modelo computacional generado recoge los aspectos fundamentales necesarios para modelar una VSMC, basándose en modelos previos y aplicando sucesivas simplificaciones y adaptaciones de los mismos. De esta manera se ha conseguido adaptar un modelo original que era únicamente estable para tiempos cortos de hasta 150 segundos, logrando simular con el nuevo modelo protocolos cuya duración es superior varios minutos.
- II) Este modelo resulta específico para el estudio de aspectos concretos, como son las modulaciones en el potencial de membrana y en la contracción reguladas por cloruro, así como la interacción de estas variables con otros factores. A pesar de representar un modelo celular completo, el análisis se centra en elementos específicos. Sin embargo la existencia del conjunto de elementos que lo componen resulta importante para mantener las condiciones de estabilidad del sistema y reproducir un modelo similar al fisiológico, a pesar de las simplificaciones realizadas.
- III) El sistema completo resulta muy dependiente de las condiciones iniciales y de los parámetros elegidos. La estabilidad del sistema debe garantizarse ante cualquier cambio realizado, por lo que la elección de los valores de las variables es un proceso delicado.
- IV) El protocolo inicial implementado para la adaptación de las condiciones iniciales permite asegurar la estabilidad del sistema antes de realizar cualquier experimento sobre él. No debe prescindirse de este paso, ya que los resultados se podrían ver alterados al iniciar el protocolo siguiente sobre un sistema que no se encuentra en su estado estacionario.
- V) Los resultados del protocolo A muestran una correspondencia parcial con los efectos observados con experimentos reales. En ambos casos la contracción para BPH es independiente del cloruro, mientras que en BPN disminuye considerablemente al aplicar condiciones de 0 Cl⁻. Sin embargo, las pruebas reales sugieren una mayor contracción para BPH que para BPN, mientras que el modelo generado simula el efecto contrario por falta de precisión en el ajuste de parámetros. Este aspecto deberá estudiarse en experimentos futuros o se intentará realizar un ajuste más preciso del modelo para BPN y BPH.
- VI) Los resultados del protocolo B proponen la dependencia de la variación en la contracción inducida por 0 Cl⁻ con el valor de la concentración intracelular de cloruro así como con la permeabilidad de los canales de cloruro dependientes de calcio, mientras que una interpretación simplista basada en la ecuación de Goldman solo consideraba la relación con esta segunda variable. Además, ha sugerido una posible explicación acerca de la sobreexpresión de canales ANO1 en BPH. Por lo tanto, el modelo ha permitido sugerir una nueva hipótesis en las dependencias de la contracción que podría ser testada en el laboratorio posteriormente.
- VII) Para finalizar, podemos concluir resaltando la utilidad del modelo computacional para simular condiciones experimentales de manera ágil y sencilla, reproduciendo condiciones reales que permitan plantear futuras hipótesis en esta área. Una ampliación del modelo hacia una versión más general lograría estudiar la integridad de las interacciones celulares, pudiendo trasladar las ideas extraídas a modelos reales de manera más segura. En definitiva, el diseño de un modelo completo y preciso ayudaría a plantear nuevas hipótesis acerca de la hipertensión, colaborando con el estudio de nuevas dianas terapéuticas.

8.3. Líneas futuras de investigación

En base a las conclusiones obtenidas y a las limitaciones consideradas en el modelo, se propone el seguimiento de este trabajo como un proyecto a ampliar en tiempos futuros. La modelización de esta clase de sistemas involucra numerosas suposiciones y simplificaciones, por lo que se afirma que un adecuado control sobre los parámetros elegidos mejorará la precisión de los resultados y su similitud con la realidad. Así mismo, se considera la validación experimental de las predicciones del modelo como un paso fundamental para asegurar el buen funcionamiento del mismo. Ya hemos visto que el principal objetivo de los modelos de esta índole consiste en proporcionar hipótesis testables en el laboratorio, por lo que la evaluación de estas hipótesis con experimentos reales es el elemento que completa el proceso del modelado.

De acuerdo con los objetivos planteados inicialmente, también se propone ampliar el modelo presentado con el fin de generar dos submodelos adaptados a ratones BPN y BPH. De nuevo, esta adaptación se conseguirá con un ajuste fino de los parámetros, por lo que el conocimiento de los mismos resultará clave en el proceso. En este contexto, se plantea la posibilidad de integrar técnicas de aprendizaje automático y minería de datos en el desarrollo del modelo, con el propósito de optimizar parámetros con técnicas como los algoritmos genéticos. Esto supondría una ventaja al limitar el tiempo y esfuerzo en realizar ajustes manuales o experimentales. Además, la inteligencia artificial puede resultar de gran utilidad a la hora de gestionar las complejas relaciones del sistema representado, identificado sus características más relevantes y mejorando su generalización. Todo esto supondría una mejora en las predicciones obtenidas y un modelado más preciso, pudiendo descubrir patrones complejos no evidentes a simple vista.

También se ha adelantado la necesidad de lograr modelos más generalizables, puesto que el modelo desarrollado se centra en aspectos muy específicos, con el fin de probar unas hipótesis concretas. Para ello se deben fijar ciertas condiciones que garanticen su estabilidad. Sin embargo, conseguir un modelo general permitiría testar diversos protocolos de manera más ágil y eficaz. En este punto se añade la necesidad de adaptar el modelo a la estimulación con otros fármacos o sustancias, ya que en el trabajo simplemente se consideran protocolos con NE.

Por último, el enfoque más ambicioso para futuras investigaciones consistiría en incluir en el modelo la variabilidad y heterogeneidad intrínsecas en sistemas biológicos reales. Esto permitiría captar la diversidad y complejidad, empleando, por ejemplo, técnicas de modelado estocástico o incorporando parámetros que reflejen la variabilidad en las condiciones iniciales y en la respuesta del modelo.

Fuentes

SCRIPT 1 – initial_conditions.m

```
% Initial Concentrations & transmembrane potential Vm

V_m = -59.4 ;      % [mV] initial value
d_Lbar = 1.0/(1+exp(-(V_m)/8.3));
d_L = d_Lbar;
f_Lbar = 1.0/(1+exp((V_m+42.0)/9.1));
f_L = f_Lbar;
p_Kbar = 1/(1 + exp(-(V_m-11.0)/15.0));
p_K = p_Kbar;
q_bar = 1.0/(1+exp((V_m+40)/14));
q_1 = q_bar;
Ca_i = 68e-6;
V_1_2_KCa = -41.7*log10(Ca_i)-128.2;
p_oobar = 1 / (1+exp(-(V_m-V_1_2_KCa)/18.25));
p_f = p_oobar;
p_s = p_oobar;
R_01 = 0.9955;
R_10 = 0.0033;
R_11 = 4.0e-6;
Ca_u = 0.66;
Ca_r = 0.57;
q_2 = q_bar;
P_SOC = 0;
Cl_i = 59.4;
h_IP3 = K_inhIP3/(Ca_i+K_inhIP3);
IP3 = 0;
r_hG = k_degG*gamma_G*IP3/PIP2;
G = (K_cG+Ca_i)/(alpha_G*Ca_i)*r_hG;
delta_G = k_dG*G/(k_aG*(G_TG-G));
DAG = 0;
k1_0 = km*(Ca_i)^n;
k = (k1_0*k3+k1_0*k4+k2*k4)^-1;
M = k2*k4*k*M_T;
AM_P = k1_0*k3*k*M_T;

% Initial conditions vector
yinit = [V_m d_L f_L p_K q_1 p_f p_s R_01 R_10 R_11 Ca_u Ca_r Ca_i q_2 P_SOC Cl_i
h_IP3 G IP3 DAG M AM_P];
```

SCRIPT (2) - stationary_state.m

```
clear all
close all
parameters_Cl
initial_conditions_Cl

global TMAX NE_stimulation Cl_o_stimulation Ab
TMAX = 10e9; % [ms]
NE_stimulation = 0; % [mM]
Cl_o_stimulation = 129.0; % [mM]

P_Cl = (Ca_i.^n_ClCa)./(Ca_i.^n_ClCa+(K_ClCa).^n_ClCa).*1.04e-8;
I_Cl = C_m.*P_Cl.*V_m.*((z_Cl.*F).^2)./(R.*temp)).*(Cl_o-
Cl_i.*exp(V_m.*z_Cl.*F./(R.*temp)))./(1-exp(V_m.*z_Cl.*F./(R.*temp))); % [pA]
Ab = -I_Cl/(Cl_o-Cl_i); % Factor

tspan = [0 TMAX];
[t_or, Y_or] = ode23t(@equations,tspan,yinit);
T_or = t_or/1000; % Convert from [ms] to [s]
or_m = zeros(length(T_or), length(fields));
for i =1:length(fields)
    or_m(:,i) = Y_or(:,i);
end
or = array2table(or_m, 'VariableNames', fields);

% Calculamos las yinit en SS
for i=1:size(or,2)
    yinit_or_ss(i) = mean(or_m((size(or_m,1)-15):(size(or_m,1)),i));
end
yinit_or = array2table(yinit_or_ss, 'VariableNames', fields);
```

SCRIPT (3) - parameters.m

```
% MODEL PARAMETERS
```

```
% CONSTANTS
```

```
z_K = 1;           % K ion valence
z_Na = 1;          % Na ion valence
z_Ca = 2;          % Ca ion valence
z_Cl = -1;         % Cl ion valence
N_Av = 6.022e23;   % Avogadro's constant
R = 8341.0;        % [mJmol-1K-1] gas constant
F = 96487.0;       % [Cmol-1] Faraday's constant
temp = 293.0;      % [K] absolute temperature
C_m = 25;          % [pF] membrane capacitance
A_m = C_m/1e6;     % [cm2] membrane area
```

```
% Extracellular concentrations
```

```
Ca_o = 2.0;        % [mM] [Ca2+]o extracellular calcium
Na_o = 140.0;       % [mM] [Na+]o extracellular sodium
Cl_o = 129.0;       % [mM] [Cl-]o extracellular chloride
K_o = 5;           % [mM] [K+]o extracellular potassium
```

```
% Intracellular constant concentrations
```

```
Na_i = 8.4;        % [mM] [Na+]i intracellular sodium
K_i = 140;         % [mM] [K+]i intracellular potassium
PIP_2 = 5e7;
```

```
% Volumes
```

```
vol_i = 1;         % [pl] volume of intracellular space
vol_Ca = 0.7;      % [pl] intracellular volume available to free Ca
vol_u = 0.07;      % [pl] volume of uptake compartment
vol_r = 0.007;    % [pl] volume of release compartment
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
% PARAMETER VALUES %
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
% A.1.1 L-type voltage-operated Ca2+ channels
```

```
P_VOCC = 1.88e-5; % [cm/s] max. conductance of L-type Ca channel
```

```
% A.1.2 Large conductance Ca2+-activated K+ channels, Calcium-activated potassium current I_BKCa
```

```
P_BKCa = 3.9e-13; % [cm3/s] single channel permeability Mistry & Garland 1998
N_BKCa = 6.6e6;   % [1/cm2] channel density
tau_pf = 0.84;    % [ms] fast activation time constant, mean open times from
Benham et al 1986
tau_ps = 35.9;    % [ms] slow activation time constant
```

```
% A.1.3 Voltage-dependent K+ channels, Delayed rectifier current I_Kv
```

```
g_K = 1.35;       % [nS] max. conductance
tauq1 = 371;      % [ms] fast inactivation time constant
tauq2 = 2884;     % [ms] slow inactivation time constant
q_1 = 1;         % in the formula for dq1/dt
q_2 = 1;         % in the formula for dq2/dt
```

```
% A.1.4 ATP-sensitive K+channels, KATP current I_Kleak (Unspecified K+ leak channels)
```

```
g_Kleak = 0.067; % [nS] max. background K current conductance
```

```

% A.1.5 Nonselective cation channels, Alpha-adrenoceptor-activated nonselective
cation channel NSC
K_NSC = 3e-3; % [mM] DAG concentration for half-maximum activation
PNa_NSC = (5.11e-7); % [cm/ms] PNa_NSC was selected to give maximum current density
8.79pA/pF as reported by Inoue
PK_NSC = (PNa_NSC)*1.06;
PCa_NSC = (PNa_NSC)*4.54; % ratios from Inoue
d_NSCmin = 0.0244; % (1/41) spontaneous or 'constitutive' activation of NSC
channels to give 0.15pA/pF at -60mV as reported by Inoue
Pmin_NSC = 0.4344; % min. open probability

% A.1.6 Store operated non-selective cation channel
g_SOCCa = 0.0083; % [nS] whole cell conductances to Ca2+
g_SOCNa = 0.0575; % [nS] whole cell conductances to Na2+
K_SOC = 0.0001; % [mM] Ca2+ concentration in SR for half-activation
H_SOC = 1; % Hill coefficient
tau_SOC = 100; % [ms] time constant for SOC activation

% A.1.7 Calcium activated chloride currents
n_ClCa = 2; % Hill coefficient
K_ClCa = 365e-6; % [mM] EC50 for Ca2+-dependent activation
P_Cli = 1.04e-8; % Factor

% A.1.8 Plasma membrane Ca2+-ATPase
I_PMCabar = 5.37; % [pA] max. current through Ca pump
K_mPMCA = 170e-6; % [mM] Michaelis constant of sarcolemmal Ca pump
S_CMbar = 0.1; % [mM] total concentration of CM sites for Ca
K_d = 2.6e-4; % [mM] average binding affinity of CM for Ca

% A.1.9 Plasma membrane Na+-Ca+ exchange
g_NCX = 0.000487; % [nS] scale factor
d_NCX = 0.0003;
gamma = 0.45;

% A.1.10 Sodium-potassium pump
I_NaKbar = 2.3083; % [pA/pF] max. Na/K current
K_dKo = 1.6; % [mM] K half saturation constant for Na/K pump
K_dNao = 22; % [mM] Na half saturation constant for Na/K pump
n_HKo = 1.1; % Hill coefficient for Ko+
n_HNai = 1.7; % Hill coefficient for Nai+
Q_10_NaK = 1.87;

% A.1.11 Chloride pump/cotransport
% Ab experimental

% A.2.1 Alpha1-adrenoreceptor
k_pG = 0.1e-3; % [1/ms] receptor phosphorylation rate
K_1G = 0.01; % [mM] unphosphorylated receptor dissociation constant
k_aG = 0.17e-3; % [1/ms] G-protein activation rate
k_dG = 1.5e-3; % [1/ms] G-protein deactivation rate
K_cG = 0.4e-3; % [mM] dissociation constant for Ca binding to PLC
k_degG = 1.25e-3; % [1/ms] IP3 degradation rate
ksi_G = 0.85; % fraction of mobile receptors
R_TG = 2e4*ksi_G; % total no. of mobile receptors
G_TG = 1e5; % total no. of G-protein molecules
alpha_G = 2.781e-8; % [1/ms] effective signal gain parameter
gamma_G = N_Av*vol_i*1e-15; % conversion of no. of PIP2 to mM concentration

```

```

% A.3 Sarcoplasmic reticulum
tau_tr = 1000;      % [ms]
tau_rel = 0.0333;  % [ms]
k_leak = 1;        % 1 Osc: 5; SR parameter
K_mup = 0.001;     % [mM] Michaelis constant of SR calcium pump
I_SERCAbar = 3.34*(k_leak+1); % [pA] max. SR uptaking current
R_leak = 1.07e-5*(k_leak); % 1.07e-5 - 5.35e-5
K_CSQN = 0.8;      % [mM] dissociation constant
CSQNbar = 15;     % [mM] total calsequestrin concentration in release
compartment

% A.3.1 Ryanodine receptor
Kr1 = 2500;        % [1/(ms*mM^2)]
Kr2 = 1.05;        % [1/(ms*mM^2)]
K_r1 = 0.0076;    % [1/ms]
K_r2 = 0.0840;    % [1/ms]

% A.3.2 IP3 receptor
I_IP3bar = 2880e-6; % [mM/ms] rate constant of Ca2+ release by IP3R
K_actIP3 = 0.17e-3; % [mM] dissociation constant for Ca2+ activation sites
K_inhIP3 = 0.1e-3; % [mM] dissociation constant for Ca2+ inhibitory sites
K_IP3 = 0.12e-3;  % [mM] dissociation constant for IP3 binding to IP3R
k_onIP3 = 1.4;    % [1/(mM*ms)] rate of Ca2+ binding to the inhibitory site

% A.4 Ca2+-induced contraction
M_T = 1;          % total concentration of myosine
km = 8e9;         % [1/(mM^4ms)] Phosphorylation rate coefficient
n = 4;           % Calcium exponent
k2 = 5e-4;       % [1/ms] Unphosphorylation rate
k3 = 4e-4;       % [1/ms] Action binding rate
k4 = 1e-4;       % [1/ms] Action unbinding rate

% Ca2+ buffering in the cytosol
B_Fbar = 0.1;     % [mM] total concentration of other buffer cites
K_dB = 5.298e-4; % [mM] average binding affinity of other buffers

% FIELDS FOR STRUCTS
fields = {'V_m', 'd_L', 'f_L', 'p_K', 'q_1', 'p_f', 'p_s', 'R_01', 'R_10', 'R_11',
'Ca_u', 'Ca_r', 'Ca_i', 'q_2', 'P_SOC', 'Cl_i', 'h_IP3', 'G', 'IP3', 'DAG', 'M',
'AM_P'};

```

SCRIPT (4) - equations.m

```
function dy = equations(t,y)

global R temp F RT_F z_K z_Na z_Ca z_Cl N_Av C_m A_m Tstim
global Ca_o Na_o Cl_o K_o Na_i K_i vol_i vol_Ca vol_u vol_r
global P_VOCC N_BKCa tau_pf tau_ps
global tauq1 tauq2 q_1 q_2
global K_NSC PNa_NSC PK_NSC PCa_NSC d_NSCmin Pmin_NSC
global g_SOCCa g_SOCNa K_SOC H_SOC tau_SOC
global n_ClCa K_ClCa I_PMCABar K_mPMCA S_CMbar K_d g_NCX d_NCX gamma delta_G
global I_NaKbar K_dKo K_dNao n_HKO n_HNai Q_10_NaK
global k_leak K_mup I_SERCABar R_leak K_CSQN CSQNbar tau_tr tau_rel
global Kr1 Kr2 K_r1 K_r2
global I_IP3bar K_actIP3 K_inhIP3 K_IP3 k_onIP3
global k_pG R_TG K_1G ksi_G G_TG k_degG k_aG k_dG K_cG alpha_G gamma_G
global M_T km n k2 k3 k4 K_dB B_Fbar
global P_Cli Ab

V_m = y(1);
d_L = y(2);
f_L = y(3);
p_K = y(4);
q_1 = y(5);
p_f = y(6);
p_s = y(7);
R_01 = y(8);
R_10 = y(9);
R_11 = y(10);
Ca_u = y(11);
Ca_r = y(12);
Ca_i = y(13);
q_2 = y(14);
P_SOC = y(15);
Cl_i = y(16);
h_IP3 = y(17);
G = y(18);
IP3 = y(19);
DAG = y(20);
M = y(21);
AM_P = y(22);

%----- Stimulation protocols -----

% Norepinephrine (NE) stimulation
if (t>20e4)
    NE = NE_stimulation; % NE [mM] beginning of stimulation
else
    NE = 0;
end

% Chloride extracellular concentration (Cl_o) stimulation
if (t>50e4)
    Cl_o = Cl_o_stimulation; % Cl_o [mM] beginning of stimulation
else
    Cl_o = 129.0;
End
```

```

%----- Model equations for SMC -----

% Reversal potentials
E_Ca = RT_F/z_Ca*log(Ca_o/Ca_i);
E_Na = RT_F/z_K*log(Na_o/Na_i);
E_K  = RT_F/z_Na*log(K_o/K_i);
E_Cl = RT_F/z_Cl*log(Cl_o/Cl_i);

% A.1 MEMBRANE ELECTROPHYSIOLOGY

% A.1.1 L-TYPE VOLTAGE OPERATED CA2+ CHANNELS. Voltage dependent calcium current
I_VOCC
tau_d_L = 2.5*exp(-((V_m+40)/30)^2)+1.15; % [ms]; activation time constant
d_Lbar = 1.0/(1+ exp(-(V_m)/8.3)); % steady-state activation gate
d_Lprime = (d_Lbar-d_L)/tau_d_L;

f_Lbar = 1.0/(1+exp((V_m+42.0)/9.1)); % [ms]; inactivation time constant
tau_f_L = 65*exp(-((V_m+35)/25)^2)+45; % steady-state inactivation gate
f_Lprime = (f_Lbar-f_L)/tau_f_L;

if (V_m == 0)
    I_VOCC = d_L*f_L*P_VOCC*A_m*1e6*z_Ca*F*(Ca_i-Ca_o); % [pA]
else
    I_VOCC = d_L*f_L*P_VOCC*A_m*1e6*V_m*((z_Ca*F)^2)/(R*temp)*(Ca_o-
Ca_i*exp(V_m*z_Ca/(RT_F)))/(1-exp(V_m*z_Ca/(RT_F))); % [pA]
end

% A.1.2 LARGE CONDUCTANCE CA2+-ACTIVATED K+ CHANNELS. Calcium-activated potassium
current I_BKCa
V_1_2_KCa = -41.7*log10(Ca_i)-128.2; % NO-dependent activation from Yang 2005
p_oobar = 1/(1+exp(-(V_m-V_1_2_KCa)/18.25));
p_fprime = (p_oobar-p_f)/tau_pf;
p_sprime = (p_oobar-p_s)/tau_ps;

if (V_m == 0)
    i_KCa = 1e6*P_BKCa*F*(K_i-K_o); % [pA]
else
    i_KCa = 1e6*P_BKCa*V_m*F/RT_F*(K_o-K_i*exp(V_m/RT_F))/(1-exp(V_m/RT_F)); % [pA]
end

P_KCa = 0.17*p_f+0.83*p_s;
I_BKCa = A_m*N_BKCa*i_KCa*P_KCa; % [pA]

% A.1.3 VOLTAGE-DEPENDENT K+ CHANNELS. Delayed rectifier current I_Kv
p_Kbar = 1/(1 + exp(-(V_m+11.0)/15.0));
tau_p_K = 61.49*exp(-0.0268*V_m); % [ms]
p_Kprime = (p_Kbar-p_K)/tau_p_K;

q_bar = 1.0/(1+exp((V_m+40)/14));
q_1prime = (q_bar-q_1)/371;
q_2prime = (q_bar-q_2)/2884;
I_Kv = g_K*p_K*(0.45*q_1+0.55*q_2).*(V_m-E_K); % [pA]

% A.1.4 UNSPECIFIED K+ LEAK CHANNELS. KATP current I_Kleak
I_Kleak = g_Kleak*(V_m-E_K); % [pA]

% A.1.5 NON-SELECTIVE CATION CHANNELS. Alpha-adrenoceptor-activated nonselective
cation channel NSC
Po_NSC = Pmin_NSC+(1-Pmin_NSC)/(1+exp(-(V_m-47.12)/24.24));

```

```

if (V_m == 0)
    INa_NSC = 1*(DAG/(DAG+K_NSC)+d_NSCmin)*Po_NSC*PNa_NSC*A_m*1e6*F*(Na_i-Na_o);
    ICa_NSC = 1*(0*DAG/(DAG+K_NSC)+d_NSCmin)*Po_NSC*PCa_NSC*A_m*1e6*z_Ca*F*(Ca_i-
Ca_o);
    IK_NSC = 1*(DAG/(DAG+K_NSC)+d_NSCmin)*Po_NSC* PK_NSC*A_m*1e6*F*(K_i-K_o);
else
    INa_NSC =
1*(DAG/(DAG+K_NSC)+d_NSCmin)*Po_NSC*PNa_NSC*A_m*1e6*V_m*(F^2)/(R*temp)*(Na_o-
Na_i*exp(V_m/RT_F))/(1-exp(V_m/RT_F));
    ICa_NSC =
1*(0*DAG/(DAG+K_NSC)+d_NSCmin)*Po_NSC*PCa_NSC*A_m*1e6*V_m*((z_Ca*F)^2)/(R*temp)*(Ca
_o-Ca_i*exp(V_m*z_Ca/RT_F))/(1-exp(V_m*z_Ca/RT_F));
    IK_NSC = 1*(DAG/(DAG+K_NSC)+d_NSCmin)*Po_NSC*
PK_NSC*A_m*1e6*V_m*(F^2)/(R*temp)*(K_o-K_i *exp(V_m/RT_F))/(1-exp(V_m/RT_F));
End
I_NSC = (ICa_NSC+INa_NSC+IK_NSC)/2;

% A.1.6 STORE-OPERATED NON-SELECTIVE CATION CHANNELS. Store operated non-selective
cation channel
P_SOCbar = 1/(1+(Ca_u/K_SOC)^(H_SOC));
P_SOCprime = (P_SOCbar-P_SOC)/tau_SOC;

I_SOCCa = 1*P_SOC*g_SOCCa*(V_m-E_Ca);
I_SOCNa = 1*P_SOC*g_SOCNa*(V_m-E_Na);
I_SOC = I_SOCCa+I_SOCNa; % [pA]

% A.1.7 CALCIUM-ACTIVATED CHLORIDE CHANNELS
P_Cl = (Ca_i^n_ClCa)/(Ca_i.^n_ClCa+(K_ClCa).^n_ClCa).*P_Cli;
I_Cl = C_m*P_Cl*V_m*(((z_Cl*F)^2)/(R*temp))*((Cl_o-
Cl_i*exp(V_m*z_Cl*F/(R*temp)))/(1-exp(V_m*z_Cl*F/(R*temp)))); % [pA]

% A.1.8 PLASMA MEMBRANE CA2+ PUMP. Ca buffering and cytosolic material balance
S_CM = S_CMbar*K_d/(K_d+Ca_i);
I_PMCA = I_PMCAbar*Ca_i/(Ca_i+K_mPMCA);

% A.1.9 PLASMA MEMBRANE NA+-CA2+ EXCHANGE
Fi_F = exp(gamma*V_m*F/(R*temp));
Fi_R = exp((gamma-1)*V_m*F/(R*temp));
I_NCX = 1*g_NCX*((Na_i^3)*Ca_o*Fi_F-
(Na_o^3)*Ca_i*Fi_R)/(1+d_NCX*((Na_o^3)*Ca_i+(Na_i^3)*Ca_o));

% A.1.10 SODIUM-POTASSIUM PUMP
Q = Q_10_NaK^((temp-309.15)/10);
I_NaK =
Q*C_m*I_NaKbar*((K_o^n_HKO)/((K_o^n_HKO)+(K_dKo^n_HKO))*(Na_i^n_HNai)/((Na_i^n_HNai
)+(K_dNao^n_HNai)))*(V_m+150)/(V_m+200);

% A.1.11 CHLORIDE PUMP/COTRANSPORT
I_bCl = Ab*(Cl_o-Cl_i);

% A.2 ALPHA1-ADRENORECEPTOR ACTIVATION AND IP3 FORMATION

% A.2.1 ALPHA1-ADRENORECEPTOR ACTIVATION
RS_G = (R_TG*NE)/(K_1G+NE);

% A.2.2 IP3 FORMATION
rho_rG = NE*RS_G/(R_TG*(K_1G+NE));
Gprime = k_aG.*(delta_G+rho_rG).*(G_TG-G)-k_dG.*G;
r_hG = alpha_G*Ca_i/(K_cG+Ca_i)*G;

```



```

IP3prime = r_hG/gamma_G*PIP2-k_degG*IP3;
DAGprime = r_hG/gamma_G*PIP2-k_degG*DAG;

% A.3 SARCOPLASMIC RETICULUM
I_SERCA = I_SERCAbar*Ca_i./(Ca_i+K_mup); % (I_SERCA)
I_tr = (Ca_u-Ca_r)*(z_Ca*F*vol_u)/tau_tr;
I_rel = (R_10^2+R_leak)*(Ca_r-Ca_i)*(z_Ca*F*vol_r)/tau_rel ;
I_IP3 = I_IP3bar*((IP3/(IP3+K_IP3)*Ca_i/(Ca_i+K_actIP3)*h_IP3)^3)*(Ca_u-
Ca_i)*z_Ca*F*vol_Ca;
Ca_uprime = (I_SERCA-I_tr-I_IP3)/(z_Ca*F*vol_u);
Ca_rprime = (I_tr-I_rel)/(z_Ca*F*vol_r)/(1+CSQNbar*K_CSQN/((K_CSQN+Ca_r)^2));

% A.3.1 RYANODINE RECEPTOR
R_00 = 1-R_01-R_10-R_11;
R_10prime = Kr1*(Ca_i^2)*R_00-(K_r1+Kr2*Ca_i)*R_10+K_r2*R_11;
R_11prime = Kr2*Ca_i*R_10-(K_r1+K_r2)*R_11+Kr1*(Ca_i^2)*R_01;
R_01prime = Kr2*Ca_i*R_00+K_r1*R_11-(K_r2+Kr1*(Ca_i^2))*R_01;

% A.3.2 IP3 RECEPTOR
h_IP3prime = k_onIP3*(K_inhIP3-(Ca_i+K_inhIP3)*h_IP3);

% A.4 Ca2+-INDUCED CONTRACTION
k1 = km*(Ca_i.^n);
Mprime = k2*(M_T-AM_P)-(k1+k2)*M;
AM_Pprime = k3*(M_T-M)-(k3+k4)*AM_P;

% A.5 IONIC BALANCES
I_Catotm = I_SOCCa+I_VOCC-2*I_NCX+I_PMCA+ICa_NSC;
I_Natotm = I_NaKCl_Na+I_SOCNa+3*I_NaK+3*I_NCX+INa_NSC;
I_Ktotm = I_NaKCl_K+I_Kv+I_BKCa+IK_NSC+I_Kleak-2*I_NaK;
I_Cltotm = I_Cl + I_bCl;

Ca_iprime = -(I_Catotm+I_SERCA-I_rel-
I_IP3)/(2*F*vol_Ca)/(1+S_CMbar*K_d/((K_d+Ca_i)^2)+B_Fbar*K_dB/((K_dB+Ca_i)^2) );
Cl_iprime = -(I_Cltotm)/(z_Cl*F*vol_i);

% Transmembrane potential (V_m)
V_mprime = -
1/C_m*(I_VOCC+I_Kv+I_BKCa+I_Kleak+I_NSC+I_SOC+I_Cl+I_PMCA+I_NaK+I_NCX);

dy(1) = V_mprime;
dy(2) = d_Lprime;
dy(3) = f_Lprime ;
dy(4) = p_Kprime;
dy(5) = q_1prime;
dy(6) = p_fprime;
dy(7) = p_sprime;
dy(8) = R_01prime;
dy(9) = R_10prime;
dy(10) = R_11prime;
dy(11) = Ca_uprime;
dy(12) = Ca_rprime;
dy(13) = Ca_iprime;
dy(14) = q_2prime;
dy(15) = P_SOCprime;
dy(16) = Cl_iprime ;
dy(17) = h_IP3prime;
dy(18) = Gprime;

```

```
dy(19) = IP3prime;  
dy(20) = DAGprime;  
dy(21) = Mprime;  
dy(22) = AM_Pprime;  
dy = dy';  
end
```

Bibliografía

- A. P. Kartashov, B. L. R. (1980). *Ecuaciones diferenciales y fundamentos del cálculo variacional* (p. 239).
- Albert, A. P., & Large, W. A. (2003). Store-operated Ca²⁺-permeable non-selective cation channels in smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 33(5-6), 345-356. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(03\)00048-4](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(03)00048-4)
- Baró, I., & Eisner, D. A. (1995). Factors controlling changes in intracellular Ca²⁺ concentration produced by noradrenaline in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *The Journal of Physiology*, 482(2), 247-258. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020514>
- Bennett, M. R., Farnell, L., & Gibson, W. G. (2005). A quantitative description of the contraction of blood vessels following the release of noradrenaline from sympathetic varicosities. *Journal of Theoretical Biology*, 234(1), 107-122. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.11.013>
- Blanes Zamora, S., Ginestar Peiró, D., & Roselló Ferragudo, M. D. (2020). Introducción a los métodos numéricos para ecuaciones diferenciales. *EDITORIAL UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA*.
- Camello, C., Lomax, R., Petersen, O. H., & Tepikin, A. V. (2002). Calcium leak from intracellular store - The enigma of calcium signalling. *Cell Calcium*, 32(5-6), 355-361. <https://doi.org/10.1016/S0143416002001926>
- Cash, J. (2015). *Backward Differentiation Formulae*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015 B. Engquist (ed.), *Encyclopedia of Applied and Computational Mathematics*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-70529-1>
- Celaya, E. A. (n.d.). *Métodos numéricos para ecuaciones diferenciales rígidas. Aplicación a la semidiscretización del Método de Elementos Finitos*.
- Chistiakov, D. A., Ashwell, K. W., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2015). Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical Innervation of the arterial wall and its modification in atherosclerosis. *Auton Neurosci*, 193, 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.06.005>
- Fink, C. C., Slepchenko, B., & Loew, L. M. (1999). Determination of time-dependent inositol-1,4,5-trisphosphate concentrations during calcium release in a smooth muscle cell. *Biophysical Journal*, 77(1), 617-628. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76918-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76918-3)
- Frismantiene, A., Philippova, M., Erne, P., & Resink, T. J. (2018). Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cellular Signalling*, 52(July), 48-64. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.08.019>
- Gander, M. J., & Wanner, G. (2020). Exact BDF stability angles with maple. *BIT Numerical Mathematics*, 60(3), 615-617. <https://doi.org/10.1007/s10543-019-00796-x>
- Gorostidi, M., Gijón-Conde, T., de la Sierra, A., Rodilla, E., Rubio, E., Vinyoles, E., Oliveras, A., Santamaría, R., Segura, J., Molinero, A., Pérez-Manchón, D., Abad, M., Abellán, J., Armario, P., Banegas, J. R., Camafort, M., Catalina, C., Coca, A., Divisón, J. A., ... García-Donaire, J. A. (2022). Guía práctica sobre el diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial en España, 2022. Sociedad Española de Hipertensión - Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA). *Hipertensión y Riesgo Vascular*, 39(4), 174-194. <https://doi.org/10.1016/j.hipert.2022.09.002>
- Gutiérrez Arias, J. E., & Makárov, N. (2005). ECUACIONES DIFERENCIALES ORDINARIAS. *BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA*.
- Hai, C. M., & Murphy, R. A. (1988). Regulation of shortening velocity by cross-bridge phosphorylation in smooth muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 255(1). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1988.255.1.c86>
- Hairer, E., Nørsett, S. P., & Wanner, G. (2008). *Solving ordinary differential equations I: Nonstiff Problems*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-78862-1>
- Harhun, M. I., Belevich, A. E., Tsytsuyra, Y. D., Filyppov, I. B., & Shuba, M. F. (2000). Characteristics of L-type Ca²⁺ channels in the membrane of mesenteric artery myocytes from genetically hypertensive rats. *Neurophysiology*, 32(4), 260-265.

- <https://doi.org/10.1023/A:1005208208786>
- Horowitz, A., Menice, C. B., Laporte, R., & Morgan, K. G. (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiological Reviews*, 76(4), 967–1003. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.4.967>
- Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y., & Mori, Y. (2001). The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular α_1 -adrenoceptor-activated Ca^{2+} -permeable cation channel. *Circulation Research*, 88(3), 325–332. <https://doi.org/10.1161/01.RES.88.3.325>
- Kapela, A., Bezerianos, A., & Tsoukias, N. M. (2008). A mathematical model of Ca^{2+} dynamics in rat mesenteric smooth muscle cell: Agonist and NO stimulation. *Journal of Theoretical Biology*, 253(2), 238–260. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.03.004>
- Kiseliiov, A., Krasnov, M., & Makarenko, G. (1984). *Problemas de ecuaciones diferenciales ordinarias*. Large, W. A., & Wang, Q. (1996). Characteristics and physiological role of the Ca^{2+} -activated Cl-conductance in smooth muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 271(2 40-2). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.2.c435>
- LeVeque, R. J. (2007). Finite Difference Methods for Ordinary and Partial Differential Equations. In *Finite Difference Methods for Ordinary and Partial Differential Equations*. <https://doi.org/10.1137/1.9780898717839>
- Lozinskaya, I. M., & Cox, R. H. (1997). *Effects of Age on Ca^{2+} Currents in Small Mesenteric Artery Myocytes From Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1161/01.HYP.29.6.1329>
- Lu, Y., Zhang, J., Tang, G., & Wang, R. (2001). Modulation of voltage-dependent K^{+} channel current in vascular smooth muscle cells from rat mesenteric arteries. *Journal of Membrane Biology*, 180(2), 163–175. <https://doi.org/10.1007/s002320010067>
- Miller, J., & Carsten, M. (1996). Calcium homeostasis in smooth muscle cells. In *New Horizons: Science and Practice of Acute Medicine* (Vol. 4, Issue 1).
- Mistry, D. K., & Garland, C. J. (1998). Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *British Journal of Pharmacology*, 124(6), 1131–1140. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701940>
- Moreno-Domínguez, A., Ciudad, P., Miguel-Velado, E., López-López, J. R., & Pérez-García, M. T. (2009). De novo expression of Kv6.3 contributes to changes in vascular smooth muscle cell excitability in a hypertensive mice strain. *Journal of Physiology*, 587(3), 625–640. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165217>
- Nelson, M. T., & Quayle, J. M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology*, 268(4), C799–C822.
- O'Donnell, M. E., & Owen, N. E. (1994). Regulation of ion pumps and carriers in vascular smooth muscle. *Physiological Reviews*, 74(3), 683–721. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.3.683>
- Quarteroni, A., Sacco, R., & Saleri, F. (2007). Numerical Mathematics Texts in Applied Mathematics. In *Sistemas.Fciencias.Unam.Mx*.
- Sanders, K. M. (2008). Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterology and Motility*, 20(SUPPL. 1), 39–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2008.01108.x>
- Shampine, L. (2016). *The matlab ODE suite* (Issue May). <https://doi.org/10.1137/S1064827594276424>
- Shampine, L. F., Reichelt, M. W., & Kierzenka, J. A. (1999). *Solving Index-1 DAEs in MATLAB and Simulink* □. 41(3), 538–552.
- Smirnov, S. V., Knock, G. A., & Aaronson, P. I. (1998). Effects of the 5-lipoxygenase activating protein inhibitor MK886 on voltage-gated and Ca^{2+} -activated K^{+} currents in rat arterial myocytes. *British Journal of Pharmacology*, 124(3), 572–578. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701855>
- Strikwerda, J. C. (1990). Finite Difference Schemes and Partial Differential Equations. In *Mathematics of Computation* (Vol. 55, Issue 192, p. 869). <https://doi.org/10.2307/2008454>

- Tajada, S., Ciudad, P., Moreno-Domínguez, A., Pérez-García, M. T., & López-López, J. R. (2012). High blood pressure associates with the remodelling of inward rectifier K⁺ channels in mice mesenteric vascular smooth muscle cells. *Journal of Physiology*, 590(23), 6075–6091. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.236190>
- Touyz, R. M., Alves-lobes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., & Montezano, A. C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *European Society of Cardiology*, 529–539. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy023>
- Varona, J. L. (2011). *Métodos clásicos de resolución de ecuaciones diferenciales ordinarias*.
- Wang, C. L. A. (1985). A note on Ca²⁺ binding to calmodulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 130(1), 426–430. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)90434-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)90434-6)
- Webb, R. C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 27(1–4), 201–206. <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>
- Wong, A. Y. K., & Klassen, G. A. (1993). A model of calcium regulation in smooth muscle cell. *Cell Calcium*, 14(3), 227–243. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(93\)90070-M](https://doi.org/10.1016/0143-4160(93)90070-M)
- Wray, S., Prendergast, C., & Arrowsmith, S. (2021). Calcium-Activated Chloride Channels in Myometrial and Vascular Smooth Muscle. *Frontiers in Physiology*, 12(October). <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.751008>
- Yang, J., Clark, J. W., Bryan, R. M., & Robertson, C. (2003). The myogenic response in isolated rat cerebrovascular arteries: Smooth muscle cell model. *Medical Engineering and Physics*, 25(8), 691–709. [https://doi.org/10.1016/S1350-4533\(03\)00100-0](https://doi.org/10.1016/S1350-4533(03)00100-0)