

Efecto del ruido en la respuesta de contracción en corazón aislado *

Alberto Peña-Romo* Ana Gámez-Méndez*
Amelia Ríos-Rodríguez* Jesús Rodríguez-González *

* Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional, Unidad Monterrey. Vía del Conocimiento 201,
PIIT, Apodaca, N.L. México. C.P. 66600 (e-mail:
jrodriguez@cinvestav.mx)

Resumen: En este estudio, corazones de ratón son aislados y estimulados eléctricamente con trenes de pulsos inducidos con ruido blanco aditivo con el objetivo de analizar la respuesta cardíaca debida a la variabilidad inherente al potencial de acción. Los resultados muestran que con la presencia de variabilidad inducida en el estímulo, el rango en el cual la frecuencia de respuesta cardíaca responde adecuadamente a incrementos en la frecuencia de estimulación se amplía y el umbral de fibrilación se desplaza a altas frecuencias, comparada con estímulos sin variabilidad inducida. Entonces, la presencia de ruido eficientiza la respuesta cardíaca.

Keywords: Corazón aislado, Potencial de acción, Electrofisiología, Variabilidad.

1. INTRODUCCIÓN

Para que el corazón desempeñe sus funciones biológicas, se llevan a cabo dos fenómenos de distinta naturaleza. Uno es de tipo eléctrico en el cual la membrana plasmática de las células marcapaso se depolariza transmitiendo el impulso. Como consecuencia de un estímulo eléctrico se tiene una respuesta mecánica en la cual el corazón se contrae eyectando sangre hacia los tejidos y posteriormente se relaja. En condiciones normales existe una sincronización entre estos dos fenómenos, es decir, a un estímulo eléctrico (también conocido como potencial de acción cardíaco) corresponde un evento mecánico, la cual se repite en promedio sesenta veces por minuto, en el caso de humanos. Sin embargo, esta sincronización se pierde cuando este proceso se acelera, donde la respuesta mecánica empieza a ralentizarse conforme aumenta la frecuencia de estimulación y comienzan a presentarse patologías, como lo es el caso de la fibrilación (Guyton (2012)). En la Figura 1 se muestra un registro *in vivo* del potencial de acción que estimula la fibra cardíaca de una rana (Franz (1991)). Se puede observar que los pulsos, pese a que mantienen cierta amplitud y periodicidad, no son simétricos entre ellos; es decir, este estímulo eléctrico presenta cierta variabilidad inherente a un sistema biológico debido a que es el promedio de un flujo de distintos iones (principalmente Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) entrando y saliendo de las células marcapaso (Conti (2010)).

La variabilidad se encuentra presente en todos los sistemas biológicos, ya sea en los sistemas *per sé* o en el medio que los rodea y en algunos casos se ha observado que esta variabilidad a bajas proporciones altera la respuesta de sistemas no lineales, aumentando su eficiencia (Anishchenko

et al. (1994); Moss et al. (2003)). La terminología empleada para explicar esto es Resonancia Estocástica, la cual se define como un fenómeno no lineal en donde la adición de una interferencia aleatoria (universalmente conocida como *variabilidad ó ruido*) puede mejorar la detección de información contenida en una señal. Una cantidad óptima de variabilidad inducida da como consecuencia el máximo desempeño, mientras que otros incrementos en la intensidad de variabilidad sólo degradan la capacidad de detección de la información contenida (McDonnell and Abbott (2009)). Dicho con otras palabras, la Resonancia Estocástica es la cantidad adecuada de aleatoriedad que hace a la no linealidad menos perjudicial a una señal. Este concepto ha sido ampliamente observado en la naturaleza y ha sido caracterizado en diversos sistemas y modelos como predicciones climáticas (Benzi et al. (1982)), circuitos electrónicos (Fauve and Heslot (1983)), redes neuronales (Bulsara et al. (1991)), reacciones químicas, dinámica de canales iónicos, así como en modelos ecológicos, financieros, entre otros (Moss et al. (2003)).



Figura 1. Registro del potencial de acción cardíaco *in vivo* en corazón de rana.

Se han llevado a cabo numerosos trabajos en los cuales se estimulan corazones aislados de diversos animales y se mide la respuesta cardíaca (Kass et al. (1998); Slabaugh et al. (2012)). No obstante, no se ha desarrollado un estudio encaminado a realizar una estimulación inducida

* Este trabajo se llevó a cabo bajo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT MÉXICO) con la concesión 105649.

con variabilidad. Pese a que el corazón es un sistema autónomo debido a que es capaz de estimularse a sí mismo, su ritmicidad puede alterarse al estar en contacto con otros sistemas de regulación, entre ellos el sistema respiratorio, renina-angiotensina, endócrino, etc. repercutiendo a su vez en la respuesta cardiaca (Guyton (2012)). Por lo cual, para llevarse a cabo un estudio sobre la variabilidad en el potencial de acción cardiaco y su repercusión en la respuesta cardiaca, es necesario aislar al corazón.

2. METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

Un análisis detallado de los mecanismos involucrados intracelularmente no son considerados en este estudio, equiparando al corazón aislado como una caja negra. Entonces, en resumen, se tiene un estímulo eléctrico inducido con variabilidad como entrada al sistema y como salida, el análisis de la respuesta cardiaca.

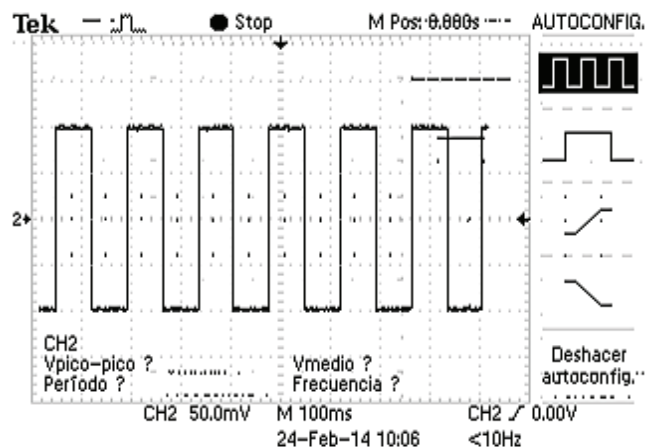
2.1 Estimulación eléctrica externa

La estimulación consistió en un tren de pulsos eléctricos periódicos con una amplitud de 200 mV obtenidos a partir de un generador de funciones desarrollado en LabView®. Debido a que la frecuencia basal de corazones aislados de ratón es en promedio de 380 lpm (6.33 Hz) la frecuencia de estimulación inicial fue desde 6 Hz hasta una máxima de 20 Hz (Franz (1991)). Posteriormente, la señal es transmitida directamente sobre la aurícula derecha del corazón aislado por medio de una tarjeta de adquisición de datos (NI SCB-68®) y dos electrodos de platino (Aldrich Chemistry®) con diámetro de 0.25 mm colocados superficialmente sobre el tejido. Para la estimulación con variabilidad, se indujo ruido blanco aditivo a la señal con una amplitud equivalente al 10% con respecto a la señal original. En la Figura 2 se muestran dos registros en un osciloscopio (Tektronix® TDS 1012B) correspondientes a la señal de estímulo eléctrico sin variabilidad y con variabilidad inducida.

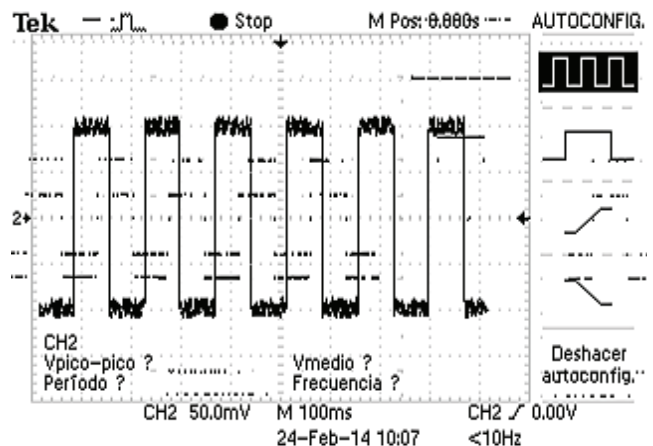
2.2 Proceso de extracción del corazón

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD1 de 6 semanas de edad con una masa corporal aproximada entre 30 y 40 g , siguiendo los protocolos éticos de experimentación animal aprobados por el Cinvestav-IPN. Fueron anestesiados vía intraperitoneal con $120/6\text{ mg/kg}$ de una solución conformada por ketamina/xylacina. Posteriormente fueron inyectados también vía intraperitoneal con $100\mu\text{l}$ de heparina de una solución 5000 U/ml para evitar la generación de trombos intracavitarios e intracoronarios. Acto seguido, se practicó una traqueostomía y se indujo ventilación mecánica con un ventilador (Ugo Basile 28025®) con un volumen corriente de 0.6 ml y una frecuencia de 110 lpm (Bell et al. (2011); Sutherland and Hearse (2000)). Una vez anestesiado el animal, se lleva a cabo una incisión en planos y rápidamente se retira el corazón de la cavidad y se perfunde retrógradamente con un buffer de Krebs oxigenado a un pH de 7.4 .

Desde la remoción completa del corazón hasta el inicio de la perfusión transcurren aproximadamente 30 a 90 segundos. La actividad cardiaca se normaliza a los pocos segundos. Posterior a eso el corazón aislado es montado en el



(a) Señal sin variabilidad.



(b) Señal con 10% de variabilidad.

Figura 2. Registros de la señal de estimulación eléctrica.

sistema de perfusión de Langendorff. La solución viaja a un flujo de 3 mL/min hasta la cánula de perfusión retrógrada a una temperatura constante de 37°C (Skrzypiec-Spring et al. (2007)). En la Figura 3 se muestra una fotografía de un corazón de ratón aislado y perfundido retrogradamente con los electrodos de platino colocados superficialmente sobre la aurícula derecha para estimular eléctricamente a las células marcapaso.

2.3 Medición de la presión

Para monitorear el estado actual del corazón se lleva a cabo la medición de presión de perfusión en las coronarias, la cual debe estar entre 60 y 100 mmHg . Ésta se registra mediante una salida lateral de la cánula de perfusión a un sensor (Mirom 1050.1®) con una sensibilidad de 5 uV/Volt que permite obtener una medición de presión en cm de agua (la cual se convierte luego a mmHg) y, simultáneamente, a un transductor electrónico de presión previamente calibrado en mmHg (Stoelting®). Finalmente la señal adquirida es procesada por una interfaz de adquisición de datos (Lab-Trax-4/24T®) para analizarla en un software especializado (Data-Trax2®) en una computadora.

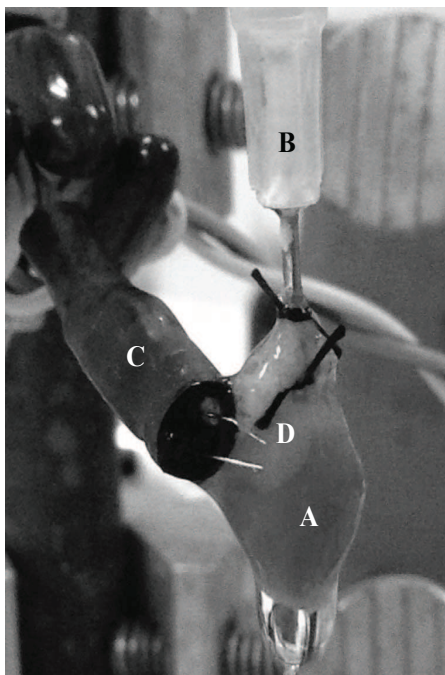


Figura 3. Corazón aislado de ratón perfundido de forma retrógrada. (A) Corazón aislado. (B) Cánula de perfusión. (C) Electrodo de platino. (D) Aurícula derecha.

2.4 Medición de la respuesta cardiaca

Para medir la fuerza y frecuencia de contracción, un tensiómetro (Kent®) previamente calibrado en un rango de 10 g es conectado directamente al ápice del corazón aislado por medio de una polea. Los registros en mV son procesados también por la misma interfaz de adquisición de datos (Lab-Trax-4/24T®) y posteriormente analizados en el software Data-Trax2®.

2.5 Medición de la respuesta cardiaca

En un estudio previo de corazón aislado de ratón con estimulación eléctrica se ha determinado un umbral a partir del cual el corazón pierde la sincronización de su respuesta con dicho estímulo, el cual está en función de la masa corporal del ratón. Dicha relación se muestra a continuación (Kass et al. (1998)):

$$H.R._{max} = \frac{450}{m^{0,15}}, \quad (1)$$

donde $H.R._{max}$ es la máxima frecuencia cardiaca en latidos por minuto (lpm) antes de que se presente la fibrilación y m es la masa corporal del ratón en kilogramos (kg). Para el protocolo experimental propuesto con ratones con masa corporal entre 30 y 40 g, el umbral de fibrilación es de 12 Hz de estimulación eléctrica.

3. RESULTADOS

En la Figura 4 se muestran registros temporales en el software de adquisición de datos Data-Trax 2® de la actividad mecánica cardiaca de un corazón aislado para distintos valores de frecuencia de estimulación eléctrica sin variabilidad inducida, en los cuales se puede observar de

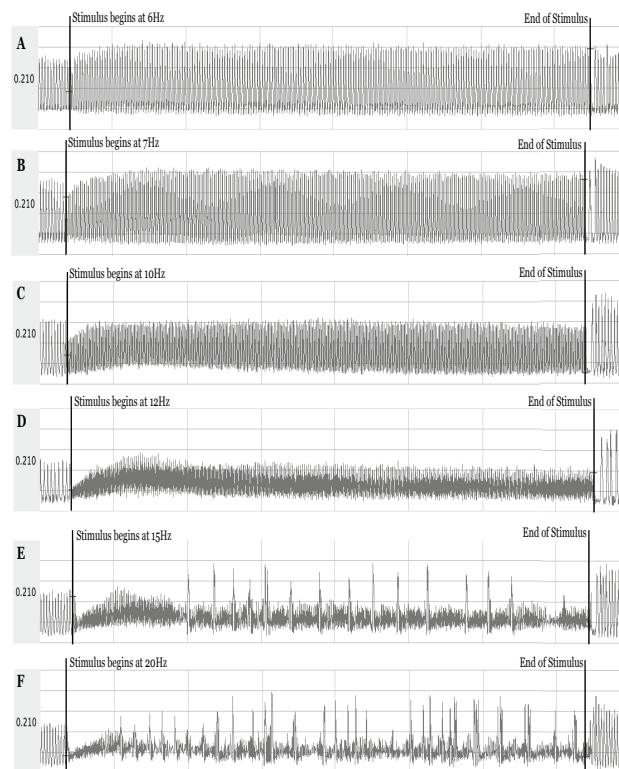
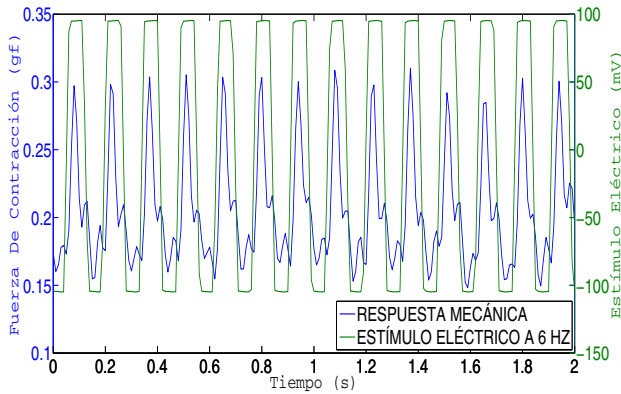


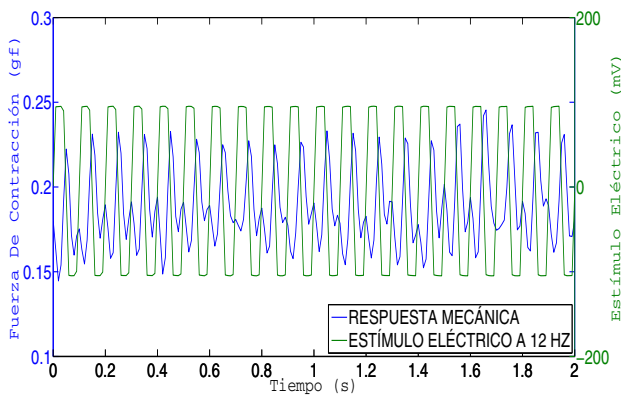
Figura 4. Registros temporales de la actividad cardiaca (gF). (A-D) Respuesta cardiaca en condiciones normales. (E,F) Respuesta cardiaca con fibrilación.

forma cualitativa cómo va cambiando la señal de respuesta cardiaca conforme aumenta la frecuencia de estimulación. A medida que aumenta la frecuencia de estimulación, la amplitud de la señal tiende a reducirse, esto es, la magnitud de la fuerza de contracción disminuye y esta contracción es sostenida. Las señales A-D muestran registros de actividad cardiaca en la cual el corazón mantiene una interrelación estímulo-respuesta de forma coordinada en donde existe una sincronización entre la señal eléctrica inducida (potencial de acción) y su correspondiente evento mecánico (contracción de la fibra cardiaca); asimismo, la magnitud en amplitud de la señal es casi constante para cada uno de estos escenarios. Superando el umbral de 12 Hz de estimulación eléctrica, las señales obtenidas muestran una respuesta en la cual la amplitud de la señal no es constante, presentándose sobreimpulsos no periódicos; este es el comportamiento característico de una fibrilación.

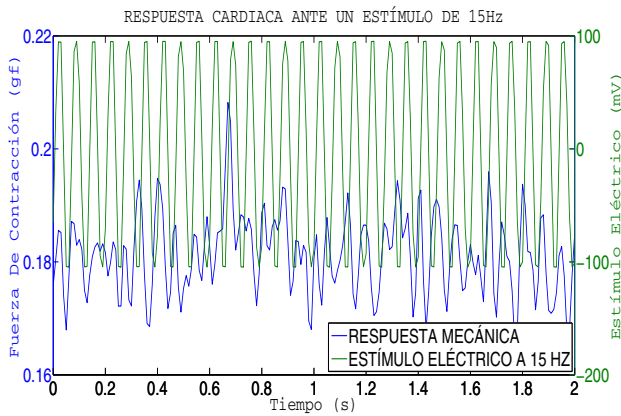
Analizando una ventana de dos segundos para algunos escenarios de diferente frecuencia de estimulación eléctrica mostrados con anterioridad, se observa con más detalle cómo se va perdiendo la sincronización entre el estímulo eléctrico y la respuesta cardiaca (Figura 5). La señal verde corresponde a los trenes de pulsos eléctricos de estimulación en milivolts (mV) y la azul a la respuesta cardiaca en gramos fuerza (gF), donde cada oscilación corresponde a una contracción. Se puede ver cómo a medida que aumenta la frecuencia de estimulación, el evento mecánico comienza a ralentizarse hasta que finalmente dicha sincronización se pierde y comienza el fenómeno de fibrilación.



(a) Estímulo a 6 Hz.



(b) Estímulo a 12 Hz.

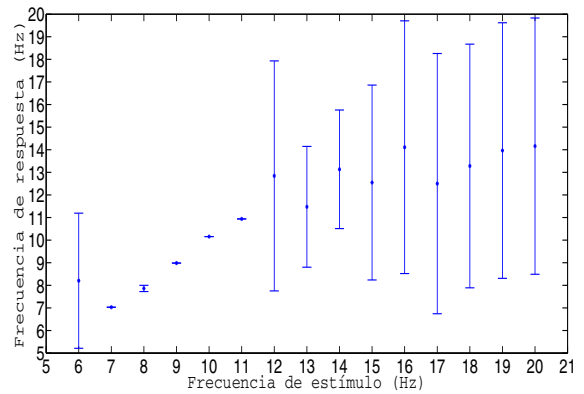


(c) Estímulo a 15 Hz.

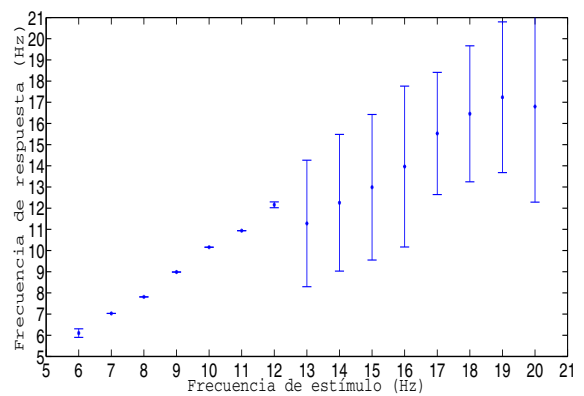
Figura 5. Relación estímulo-respuesta.

Los resultados muestran (para $n=8$) que sin variabilidad inducida en el estímulo (control), a 6 Hz sólo algunos corazones siguen la ritmicidad impuesta por dicho estímulo. Esto es debido a que la frecuencia basal promedio es de 6.33 Hz. Sin embargo, en la ventana de 7 a 11 Hz se muestra una respuesta lineal entre el estímulo y la respuesta, es decir, existe una sincronización entre el estímulo eléctrico y el evento mecánico. Esta sincronización se pierde a 12 Hz, el cual representa el umbral en el cual los corazones tienden a fibrilar (Figura 6(a)).

Por su parte, en la Figura 6(b) se observan los resultados de frecuencia cardiaca como respuesta a distintos valores



(a) Sin variabilidad inducida (Hz)



(b) 10% de variabilidad inducida (Hz)

Figura 6. Relación frecuencia de estimulación eléctrica y frecuencia de respuesta cardiaca (Hz) para ocho corazones aislados ($n=8$).

de frecuencia de estimulación eléctrica inducida con 10% de variabilidad de amplitud con respecto a la señal eléctrica original. Comparando esta gráfica con el control donde no hay variabilidad inducida, se observa que el margen de desviación estándar disminuye considerablemente a 6 Hz y el umbral de fibrilación se recorre a 13 Hz; entonces se deduce que hay un aumento en el ancho de banda en el cual existe una sincronización estímulo-respuesta. Por otro lado, en el rango de fibrilación se observa también un comportamiento casi lineal entre 13 y 19 Hz, pero con menor eficiencia ya que un valor de frecuencia de estimulación no corresponde correctamente al mismo valor de frecuencia de respuesta.

4. CONCLUSIONES

Con los resultados hasta ahora mostrados, se puede dilucidar que la presencia de ruido en bajas proporciones (10% con respecto a la señal original) en el sistema cardiaco favorece la respuesta de contracción. Un estudio más detallado en la eficiencia de la respuesta podría determinar cuantitativamente la presencia de resonancia estocástica en el sistema.

REFERENCIAS

- Anishchenko, V., Safonova, M., and Chua, L. (1994). Stochastic resonance in chua's circuit driven by amplitude or frequency- modulated signals. *International Journal of Bifurcation and Chaos*, 4, 441–446.
- Bell, R., Mocanu, M., and Yellon, D. (2011). Retrograde heart perfusion: The langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50, 940–950.
- Benzi, R., Sutera, A., and Vulpiani, A. (1982). Stochastic resonance in climatic change. *Tellus*, 34, 10–16.
- Bulsara, A., Jacobs, E., and Zhou, T. (1991). Stochastic resonance in a single neuron model-theory and analog simulation. *Journal of Theoretical Biology*, 152, 531–555.
- Conti, F. (2010). *Fisiología Médica*. Mc Graw Hill, México.
- Fauve, S. and Heslot, F. (1983). Stochastic resonance in a biestable system. *Physics Letters*, 97, 5–7.
- Franz, M. (1991). Method and theory of monophasic action potential recording. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 33, 327–368.
- Guyton, A. (2012). *Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.
- Kass, D., Hare, J., and Georgakopoulos, D. (1998). Murine cardiac function. a cautionary tail. *Circulation Research*, 82, 519–522.
- McDonnell, M. and Abbott, D. (2009). What is stochastic resonance? definitions, misconceptions, debates and its relevance to biology. *Plos Computational Biology*, 5, 1–7.
- Moss, F., Ward, L., and Sannita, W. (2003). Stochastic resonance and sensory information processing: a tutorial and review of application. *Clinical Neurophysiology*, 115, 267–281.
- Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A., and Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to langendorff: Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 55, 113–126.
- Slabaugh, J., Brunello, L., Gyorke, S., and Janssen, P. (2012). Contractile parameters and occurrence of alternans in isolated rat myocardium at supra physiological stimulation frequency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302, 2267–2275.
- Sutherland, F. and Hearse, D. (2000). The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacological Research*, 41, 613–627.