



Técnicas de modelado para distinguir la cinética de la contracción de la aorta torácica inducida por fenilefrina en ratas de diferentes edades

Javier Padilla-Pérez,*,** Ma. Del Carmen Castillo-Hernández, ** Javier Padilla-Keymole,***
Abraham Crivelli-Puga,**** Óscar Alberto López-Canales, **,***** Ramón Zambrano-Padilla*****

RESUMEN

Se evaluaron los modelos matemáticos exponenciales de dos y tres componentes con siete y 10 parámetros temporales, respectivamente (2CM,7P; 3CM,10P) mediante la cinética (constante de tiempo τ , s) de la contracción isométrica (F , g·min⁻¹) inducida por fenilefrina (FE, 1 μ M) *in vitro* en anillos aortotorácicos (AsAoTx) de ratas de diferentes edades, en términos de sus mejores méritos estadísticos (Fisher test*) o de su significado fisiológico, conforme al conocimiento actual de los tres eventos del campo sobre la contracción de músculo liso vascular (S1, S2, S3) con base en los parámetros temporales (v. gr., τ) de sus tres fases esperadas (Φ 1, Φ 2, Φ 3). Se experimentó con cinco grupos de ratas Wistar por edades (5G); seis semanas ($n = 7$), ocho semanas ($n = 6$), nueve semanas ($n = 6$), 16 semanas ($n = 6$) y 78 semanas ($n = 6$). Se promediaron cuatro anillos por rata para obtener una respuesta única para el modelado. Las líneas de base y la amplitud total de respuesta en los 5G se mantuvieron estables durante el modelado de ajuste. 3C, 10P distinguió (* $p < 0.05$) una fase de fuerza de desarrollo rápido transitorio (Φ 1 $\tau = 19 \pm 2$ similar a Φ 1 τ 2CM = 20 ± 12), una fase de fuerza de desarrollo moderadamente rápida (Φ 2 $\tau = 116 \pm 9 < \Phi$ 2 τ 2CM = 177 ± 71) y una fase de fuerza de desarrollo lento (Φ 3 $\tau = 265 \pm 12$) identificando así tres fases cinéticas esperadas con base en una cercana coincidencia con los eventos teóricos (S1, S2, S3) de reactividad vascular para esta condición. El modelo exponencial 3CM,10P ajustó estadística y fisiológicamente mejor el significado teórico, los datos de la respuesta isométrica AoTx inducida por FE en 5G e identificó tres fases «esperadas» funcionalmente distintas, cinéticamente clasificadas (Φ 1 $\tau < \Phi$ 2 $\tau < \Phi$ 3 τ) en músculo liso vascular arterial.

Palabras clave: Rata Wistar macho, cinética de la contracción, modelos matemáticos exponenciales, constante de tiempo.

ABSTRACT

The exponential mathematical models of 2 and 3 components with 7 and 10 temporal parameters respectively (2CM,7P, 3CM,10P) were evaluated using the kinetics (time constant τ , s) of the isometric contraction (g·min⁻¹) induced by phenylephrine (PE, 1 μ M) *in vitro* in aortotoracic rings (AsAoTx) of rats of different ages, in terms of their best statistical merits (Fisher test *) or their physiological significance, according to the current knowledge of the three field events on vascular smooth muscle contraction (S1, S2, S3) based on the temporal parameters (i.e., τ) of its three expected phases (Φ 1, Φ 2, Φ 3). It was experimented with 5 groups of Wistar rats by age (5G); 6 weeks old ($n = 7$); 8 weeks old ($n = 6$), 9 weeks ($n = 6$), 16 weeks old ($n = 6$) and 78 weeks old ($n = 6$). Four rings were averaged per rat to obtain a single modeling response. The baseline and total amplitude of response at 5G remained stable during fit modeling. 3CM,10P distinguished

* Sección de Fisiología Humana, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México.

** Sección de Estudios de Postgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, CDMX, México.

*** Universidad la Concordia, Montreal, QC, Canadá.

**** Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, CDMX, México.

***** Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, CDMX, México.

***** Animación Digital, Universidad Centenaria, Toronto, ON, Canadá.

Recibido: 11/01/2018. Aceptado para publicación: 09/05/2018.

(* $p < 0.05$) a transient rapid developmental force phase ($\Phi 1\tau = 19 \pm 2$ similar to $\Phi 1\tau$ 2CM,7P = 20 ± 12), another phase of moderately rapid developmental force ($\Phi 2\tau = 116 \pm 9 < \Phi 2\tau$ 2CM,7P = 177 ± 71) and another phase of slow developmental force ($\Phi 3\tau = 265 \pm 12$) thus identifying three expected kinetic phases based on a close match with the theoretical events (S1, S2, S3) of vascular reactivity for this condition. The 3CM,10P exponential model best fitted both statistically and physiologically the theoretical meaning of the TxAo PE-induced isometric contraction response data from the 5G, identifying three «expected» functionally different phases and ranked them kinetically ($\Phi 1\tau < \Phi 2\tau < \Phi 3\tau$) in arterial vascular smooth muscle.

Key words: Male Wistar rats, kinetics of contraction, exponential mathematical models, time constant.

INTRODUCCIÓN

Existen diferencias en los mecanismos de contracción desencadenados por diferentes agonistas, los cuales pueden explicarse por interrelaciones específicas entre receptores como el efecto de la entrada de Ca^{2+} extracelular y los mecanismos de liberación intracelular de Ca^{2+} ; las estructuras del subplasmalema tales como el compartimento contráctil y no contráctil, la sensibilidad al Ca^{2+} , la reactividad vascular y su regulación pueden variar en los diferentes tipos de células del músculo liso,¹ además de la especie animal o el desarrollo,² las condiciones experimentales también pueden afectar los resultados obtenidos.³

La activación del receptor adrenérgico α_1 libera Ca^{2+} en la aorta de rata, la sensibilización de los elementos contráctiles al Ca^{2+} en la aorta de rata mediada por una proteína fijadora de monofosfato cíclico de guanosina (GTP) acoplada con el receptor adrenérgico α fenilefrina (FE) y norepinefrina (NE)⁴ causa la contracción del músculo liso. Esta contracción del músculo liso está regulada por tres secuencias teóricas de eventos (S1, S2, S3) basadas en la concentración intracelular de iones de calcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la sensibilidad de los elementos contráctiles al Ca^{2+} (como el aumento de la contracción por su sensibilidad al Ca^{2+}) y su desensibilización al Ca^{2+} (disminuyendo la sensibilidad al Ca^{2+} la contracción) en respuesta a los cambios en el ambiente que rodea a la célula^{1,4}.

El evento S1^{1,4} es la vía de transducción donde están los agonistas de unión a sus receptores específicos que activan proteínas fijadoras de GTP que están acopladas a diferentes canales iónicos y enzimas y modulan sus actividades. El receptor está acoplado a una vía de movilización de Ca^{2+} para aumentar el $[\text{Ca}^{2+}]_i$, principalmente mediante la apertura de los canales de Ca^{2+} de tipo L y parcialmente por liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmico (RS)¹. La apertura de canales de Ca^{2+} activados por canales catiónicos no selectivos y Ca^{2+} (CRAC, del idioma inglés *nonselective cation channels and Ca²⁺*

release-activated Ca²⁺ channel) también puede aumentar dicho $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De tal forma que un aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y por lo tanto, la activación de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) dependiente de Ca^{2+} / calmodulina es seguida de la contracción.¹

El S2⁴ de los eventos (regulación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$) incluye cambios en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ donde la afluencia del Ca^{2+} es la vía principal para aumentar $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causada por diferentes mecanismos tales como la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, la tensión y la vía de entrada del CRAC, y también por el modo inverso del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.⁴ La liberación de Ca^{2+} del RS por el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) igualmente aumenta el $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Una disminución del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está mediada por el secuestro de Ca^{2+} por el SR y la extrusión por bombas de Ca^{2+} de la membrana y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Los segundos mensajeros tales como IP3, diacilglicerol (DAG), monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) y monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) alteran el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al afectar estos mecanismos.⁴ Debido a los compartimentos contráctiles y no contráctiles, la distribución de Ca^{2+} en el citoplasma no es uniforme en la célula y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los compartimentos celulares son regulados de forma independiente.⁴

El evento S3⁴ es la sensibilidad al Ca^{2+} de la fosforilación de la MLC que incluye cambios en la actividad de la cinasa de la cadena ligera de miosina. Por lo tanto, la cantidad de MLC fosforilada depende del equilibrio entre MLCK y MLC fosfatasa (MLCP). Sin embargo, durante la estimulación continua, el $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la cantidad de MLC fosforilada y la velocidad de acortamiento disminuyen gradualmente; mientras que la fuerza isométrica aumenta de modo monotómico, lo que indica que la miosina no fosforilada está igualmente implicada en el mantenimiento de la contracción.¹ Los agonistas y los segundos mensajeros modifican la relación MLCK/MLCP independientemente del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (sensibilidad al Ca^{2+} de la fosforilación de la MLC) y cambian la fuerza contráctil incluso en presencia de un nivel constante de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ambos AMPc y GMPc cambian el equilibrio MLCK

/MLCP e inducen la relajación.⁴ Luego, el Ca^{2+} se regula en la célula del músculo liso vascular (VSMC, del idioma inglés *vascular smooth muscle cell*) por los canales de Ca^{2+} de tipo L dependientes de voltaje que se abren con un potencial de acción; y también por los cambios mediados por receptores en IP3 causados por vasoconstrictores como los agonistas α_1 adrenérgicos así como por los aumentos en AMPc o GMPc mediados por receptor por vasodilatadores, tal como el receptor β_2 adrenérgico y el óxido nítrico.^{5,6} El tejido del endotelio segregá y modifica las sustancias vasoactivas que afectan la reactividad vascular al igual que los receptores que se expresan para regular el crecimiento y el comportamiento de la VSMC.⁷

Las arterias pequeñas y grandes de ratas de diferentes edades varían considerablemente tanto en apariencia como en localización.^{3,8,9} El grosor de la aorta aumenta significativamente con la edad.⁹ Estos cambios cardiovasculares son el resultado tanto de la función cardiaca como de las alteraciones estructurales en las arterias y en sus respuestas de contracción y relajación.^{10,11} La capacidad de detectar cambios en las propiedades físicas de las arterias es útil para intervenir con fines de prevención o atenuación de la progresión de la enfermedad cardiovascular.

Con el fin de describir adecuadamente la cinética de la reactividad vascular y la tasa de fuerza desarrollada por unidad de tiempo es necesario asignar un modelo matemático acorde para predecir con precisión la forma en que se producirá la respuesta fisiológica.^{12,13} Se han utilizado diferentes modelos matemáticos exponenciales empíricos como los de dos componentes (2C, con tiempos de retardo) y los de tres componentes (3C, con tres tiempos) para estudiar el flujo sanguíneo,^{14,15} la dinámica cardiopulmonar¹⁶⁻¹⁸ y la cinética del intercambio de gases¹⁹ en términos de constante de tiempo (τ), relacionada con la edad.^{20,21} Sin embargo, no se ha evaluado cinéticamente la respuesta de la contracción vascular transitoria (F , curso temporal del desarrollo de fuerza) por estimulación farmacológica con el fin de obtener una visión más profunda de los mecanismos de reactividad vascular (aórtica) y comparar cinéticamente entre diferentes condiciones como el crecimiento, el desarrollo y el estado de la enfermedad y la rehabilitación.²²

El propósito de este trabajo consistió en ajustar la cinética de la contracción transitoria isométrica inducida por FE de anillos de aorta torácica en ratas de diferentes edades, en términos de F , con modelos de 2C y de 3C para evaluar la cinética de la contracción transitoria de esta arteria inducida por FE, en términos del mejor valor estadístico y significado fisiológico acorde con el conocimiento actual del campo. Todo ello sobre la base de los valores numéricos de los parámetros temporales de

sus fases de respuesta distinguidos con el mejor modelo matemático exponencial que resulte de ambos.

Se planteó la hipótesis de que si la anterior respuesta transitoria por grupo de ratas consiste en la secuencia de los tres eventos teóricos (S1, S2, S3) mencionados y si se expresan tres fases de respuesta (ΦF_1 , ΦF_2 , ΦF_3) independientemente de la edad, entonces debe ajustarse y distinguirse cinéticamente mejor ($\tau \Phi F_1$, $\tau \Phi F_2$, $\tau \Phi F_3$) mediante el 3CM comparado con el 2CM.

MATERIAL Y MÉTODOS

Productos químicos

El clorhidrato de L-fenilefrina y el cloruro de acetilcolina fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, EUA). El pentobarbital sódico se obtuvo de Pfizer (Méjico). Estos productos químicos y todas las demás soluciones se prepararon con agua ultrapurificada del tipo I.

Animales

Aprobación ética

El estudio se realizó con 31 ratas Wistar macho. Los experimentos en animales fueron aprobados por el Comité de Cuidados de Animales de Laboratorio de nuestra institución y se llevaron a cabo de conformidad con sus directrices éticas para la investigación con animales (protocolos 30233/04-01 y 20161606). Se alojaron cuatro ratas por jaula ($40 \times 25 \times 18$ cm) y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas en condiciones controladas de 22 ± 2 °C, 60% de humedad y luz artificial de 06:00 a 18:00 horas con acceso libre al agua del grifo y se alimentaron con comida para rata *ad libitum*.²³ Las ratas Wistar se dividieron en cinco grupos (5G): prepupal de seis semanas de edad (G6: 167.9 ± 10.3 g de peso corporal total, $n = 7$), joven de ocho semanas de edad (G8: 195.2 ± 4.8 g de peso corporal total, $n = 6$), puberal de nueve semanas de edad (G9: 216.8 ± 2.5 g de peso corporal total, $n = 6$), adulto de 16 semanas de edad (G16: 321.7 ± 19.9 g de peso corporal total, $n = 6$) y viejo de 78 semanas de edad (G78: 521.7 ± 92.9 g de peso corporal total, $n = 6$).²²

Preparación de la muestra y reactividad vascular

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico y fueron exanguinados.²⁴ La aorta torácica se retiró



cuidadosamente para evitar dañar su endotelio, se colocó en una solución fría de bicarbonato Krebs-Ringer (K-R) oxigenada y se limpió retirando el tejido adiposo y conectivo. Los vasos se cortaron en un número de cuatro a cinco anillos de 4-5 mm de longitud. Los anillos aórticos se montaron en baños de tejido de 10 mL en la solución de K-R que contenía (en mM): 120 NaCl, 5.5 KCl, 1.2 NaH2PO4, 1.2 MgSO4, 2.5 CaCl2, 20 NaHCO3, 11.0 glucosa y 0.03 EDTA, mantenidos a 37 °C, pH 7.4 y se gasearon de forma continua con O2 al 95% y CO2 al 5%. Cada anillo recibió una tensión inicial de 2 g y se dejó estabilizar durante 30 minutos antes de iniciar el experimento. El *F* hacia el estado estacionario o un valor asintótico se midió isométricamente utilizando un transductor de desplazamiento de fuerza isométrica modelo 1030 (UFI) y registrado en un sistema de adquisición de datos de una computadora con el software AcqKnowledge (MP100WSW, Biopac Systems, Inc., Santa Bárbara, CA, EUA).

Después de la línea de base de precontracción, los tejidos fueron fármaco-estimulados mediante un baño de una concentración submáxima de FE 1 μM para obtener el curso temporal de la curva de respuesta contráctil a FE y se permitió que las contracciones se estabilizaran en un estado estacionario. El endotelio funcional se verificó por la presencia de al menos 80% de relajación en respuesta a acetilcolina 1 μM previa constricción de los tejidos con 1 μM de FE. En otras series de experimentos los tejidos intactos del endotelio se incubaron con un tratamiento apropiado, los tejidos de control recibieron el tratamiento del vehículo y los vehículos no tuvieron efecto en la tensión basal de reposo ni en la respuesta contráctil a FE.²⁵

Modelado

El modelo matemático exponencial doble, empírico de 2C se ajusta a un curso temporal transitorio de la curva de respuesta contráctil a FE desde una línea de base de reposo (A0) hacia un estado estacionario, con períodos consecutivos transitorios y exponenciales con siete parámetros; 7P = {A0, A1, TD1, τ1; A2, TD2, τ2}, expresado como 2C, 7P:

$$F(t) = A_0 + A_1 \cdot (1 - \exp(-(t - TD1)/\tau_1)) \cdot U_1 + A_2 \cdot (1 - \exp(-(t - TD2)/\tau_2)) \cdot U_2;$$

también el modelo matemático exponencial triple, empírico de 3C se ajusta a un curso temporal transitorio de la curva de respuesta contráctil a FE desde una línea de base de reposo (A0) hacia un estado estacionario con períodos consecutivos transitorios y exponenciales con

10 parámetros; 10P = {7P; A3, TD3, τ3}, expresado como 3C, 10P:

$$F(t) = A_0 + A_1 \cdot (1 - \exp(-(t - TD1)/\tau_1)) \cdot U_1 + A_2 \cdot (1 - \exp(-(t - TD2)/\tau_2)) \cdot U_2 + A_3 \cdot (1 - \exp(-(t - TD3)/\tau_3)) \cdot U_3,$$

donde U1 = 0 para t < TD1 y U1 = 1 para t > TD1, U2 = 0 para t < TD2 y U2 = 1 para t > TD2, U3 = 0 para t < TD3 y U3 = 1 para t > TD3. *F*(t) es la tasa de cambio de fuerza de contracción desarrollada por unidad de tiempo (dF/dt⁻¹) asumiendo TD = 0; A es el valor de distancia *F* (g·min⁻¹) desde A0 hasta *F* requerido o la diferencia entre la línea de base de reposo y la respuesta *F* de contracción (final), por ejemplo, A es la diferencia entre la línea base de reposo A0 (*F*) de A0 y el *F* valor final de toda la respuesta a FE de inducción-contracción; 1-e^{-t/τ} es la distribución exponencial negativa,^{19,20} e^{-t/τ} es el factor de desaparición con la constante de tiempo τ o el aumento de la respuesta transitoria *F* inducida exponencialmente; y t es el tiempo en el que la respuesta transitoria *F* inducida está muriendo exponencialmente; cuando t = τ que significa el tiempo requerido para que la respuesta transitoria de *F* inducida muera hasta la parte e-1 (0.3678) de su valor original y por lo tanto, τ = 1 - 0.3678 = 0.63 y e = 2.718281 = [(1 + n⁻¹)], donde n ≥ 10 y «e» es proporcional a 1. El parámetro t es el tiempo requerido para alcanzar 63% de la amplitud final de *F* o para aproximarse a 37% del valor de *F* amplitud final de una respuesta exponencial desde A0 hacia un valor asintótico. A es el valor de distancia *F* desde A0 a *F* requerido para las amplitudes de la fase uno (A1), de la fase dos (A2) y de la fase tres (A3) en gramos. TD es el retardo de tiempo (componente) en segundos relacionados en cada una de las fases; primer componente de la fase uno, TD1; segundo componente de la fase dos, TD2; tercer componente de la fase tres, TD3 de respuesta.

Además, se calculó el tiempo de respuesta media exponencial total^{20,21} (MRT_{Exp}), que es el tiempo necesario para alcanzar 63% de la amplitud total de respuesta *F* (A_{tot} = A1 + A2 + A3) como suma ponderada del retardo de tiempo y de la constante de tiempo para cada componente y con base en las ecuaciones generalizadas de MRT_{Exp}²⁰ para cada uno de nuestros dos modelos que se muestran a continuación:

$$\begin{aligned} MRT_{Exp} \cdot F_{2CM} &= (A_1 \cdot A_{tot}^{-1}) \cdot (\tau_1 + TD1) \\ &\quad + (A_2 \cdot A_{tot}^{-1}) \cdot (\tau_2 + TD2) \\ MRT_{Exp} \cdot F_{3CM} &= (A_1 \cdot A_{tot}^{-1}) \cdot (\tau_1 + TD1) + (A_2 \cdot A_{tot}^{-1}) \\ &\quad \cdot (\tau_2 + TD2) + (A_3 \cdot A_{tot}^{-1}) \cdot (\tau_3 + TD3) \end{aligned}$$

Por lo tanto, debido a que la FE es un agonista de receptor adrenérgico α_1 que activa VSMC usando la vía de transducción principal activada para NE, la cascada proteína Gq/fosfolipasa C/IP3, DAG y como todos los supuestos del modelo requieren justificación experimental adecuada se abordaron específicamente las siguientes preguntas: i) ¿El modelo matemático exponencial triple de 3C se ajusta adecuadamente a los datos de respuesta de contracción isométrica inducida con FE en la aorta torácica en cada uno de los 5G de ratas, identificando tres fases «esperadas» funcionalmente distintas de la fuerza desarrollada (ΦF_1 , ΦF_2 , ΦF_3) de contracción y su distinción cinética ($\tau \Phi F_1$, $\tau \Phi F_2$, $\tau \Phi F_3$) en la célula del músculo liso arterial? ii) ¿Son los valores de $\tau \Phi F_1$, $\tau \Phi F_2$, $\tau \Phi F_3$ diferentes entre sí intragrupo? y iii) ¿Existen diferencias significativas entre los valores numéricos de los parámetros temporales de la fase uno o la fase dos provenientes del 2CM,7P comparados con los del 3CM,10P?

El valor de F medido durante el periodo desde el inicio de la línea de base de reposo hasta el valor de la contracción inicial se tomó como una tensión experimental de reposo (preestimulación) (F basal, $g \cdot min^{-1}$). El F promediado durante los últimos 15 s del estado estacionario o un valor de contracción asintótica se tomó como una tensión experimental máxima inducida con FE $1\mu M$ ($F_{max1\mu M FE}$, $g \cdot min^{-1}$).

Recopilación y análisis

Todos los datos se expresan como el promedio \pm DE, a menos que se especifique lo contrario para los parámetros estimados de cada número de tamaño de muestra obtenidos a partir de los 5G de ratas. Las contracciones se expresan en gramos del desarrollo de fuerza en su curso temporal.

Para mejorar la relación señal-ruido se promediaron los datos de segundo a segundo de cuatro anillos por rata para producir una respuesta única a ser modelada con 2CM,7P y 3CM,10P. En esta comparación de los análisis de modelado para distinguir la cinética de la contracción transitoria de la aorta torácica inducida con fenilefrina en ratas de diferentes edades, sólo se modelaron los datos de la contracción isométrica transitoria en su curso temporal para evaluar los parámetros temporales estimados de las tres fases teóricas esperadas a partir de una respuesta de contracción isométrica transitoria entera (respuesta on-transitoria). Tanto el modelo de 2C,7P como el modelo de 3C,10P se ajustaron a los datos.¹⁹ Las respuestas se modelaron mediante técnicas de regresión no lineal^{20,21} con una ventana de ajuste, el periodo de

los datos ajustados desde el final de la línea de base y el comienzo de la respuesta on-transitoria (Onset) hasta un desplazamiento final (Offset) de la estimulación farmacomecánica con FE. La bondad de ajuste para estos modelos de ajuste (2C,7P y 3C,10P) se evaluó utilizando los residuos más bajos de la suma de cuadrados (valores RSS) o los del error mínimo cuadrático (valores MSS) de cada ajuste con una técnica de regresión no lineal computarizada.²⁶ Con el fin de evaluar cuál de los dos modelos mencionados fue el de mejor ajuste de datos, nuestros modelos que se ajustaron al mismo número de puntos de datos se compararon mediante la prueba de Fisher (F_{valor}) descrita a continuación:²⁶

$$F_{valor} = ((SS1-SS2)/(d.f.1 - d.f.2))/(SS2/d.f.2),$$

donde SS es la suma residual de cuadrados de cada ajuste, d.f. es el número de grados de libertad, los sufijos 1 y 2 se refieren a los modelos que se comparan con el sufijo 1 que se refiere al modelo con el menor número de parámetros.

El análisis cinético de toda la contracción isométrica transitoria, desde el Onset hasta el Offset, se evaluó en términos de MRTExpF. Los análisis cinéticos de la contracción isométrica transitoria esperada en un número de tres fases funcionalmente distintas se evaluaron en términos de sus valores numéricos de la τ proveniente del modelo matemático de 2C,7P, empírico y con doble exponencial (2C,7P_{línea basal, Onset al Offset}) que sólo distingue dos fases y el modelo matemático de 3C,10P, empírico y con trimestral exponencial (3C,10P_{línea basal, Onset al Offset}) utilizados previamente en otras respuestas fisiológicas.^{19,20}

Análisis estadístico

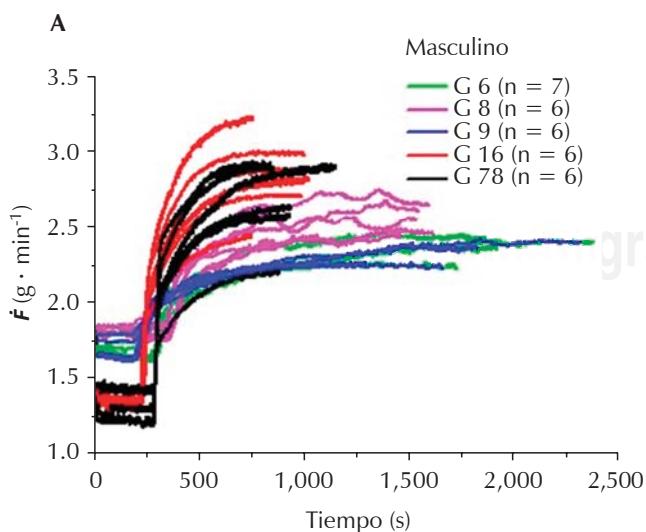
El tamaño de muestra determinado resultó ser de seis a ocho animales y se describió en otro lugar.^{23,25} Se utilizó la prueba t de Student pareada para evaluar las diferencias significativas entre los valores promedio de los parámetros estimados de los dos modelos matemáticos exponenciales mencionados.²⁷ Se realizó la prueba Shapiro-Wilk o Wilcoxon Signed Rank, que fue apropiada para comparar los parámetros temporales cinéticos del número de fases funcionalmente distintas modeladas en cada grupo por cada uno de los modelos. El tratamiento de los datos se hizo entre modelos y análisis intragrupo por modelos realizados tanto por el análisis de varianza de una vía como de dos vías y los valores numéricos de F_{valor} sólo se presentan si $p <$

0.05. Se aplicó el método de Dunn, el de Holm-Sidak o prueba de Tukey, que fue apropiado para comparar los parámetros temporales cinéticos del número de fases funcionalmente distintas modeladas en cada grupo por modelo.²⁷

RESULTADOS

A partir del curso temporal del F de las contracciones transitorias inducidas por fenilefrina de los segmentos aórticos torácicos del perfil 5G de ratas (Figura 1A), los dos modelos matemáticos exponenciales diferentes modelaron esos perfiles durante las contracciones inducidas con FE. El del mejor ajuste fisiológico de los datos experimentales fue el modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} comparado con el modelo de 2C,7P_{línea basal Onset al Offset} (Figura 1B-1F), que también fue efectivo desde el punto de vista estadístico (Cuadro 1). En el panel de la figura 1B-1F se muestra una rata representativa de cada uno de nuestros 5G con el mejor ajuste fisiológico correspondiente y se incluyen las gráficas de los residuales resultantes de dicho modelado.

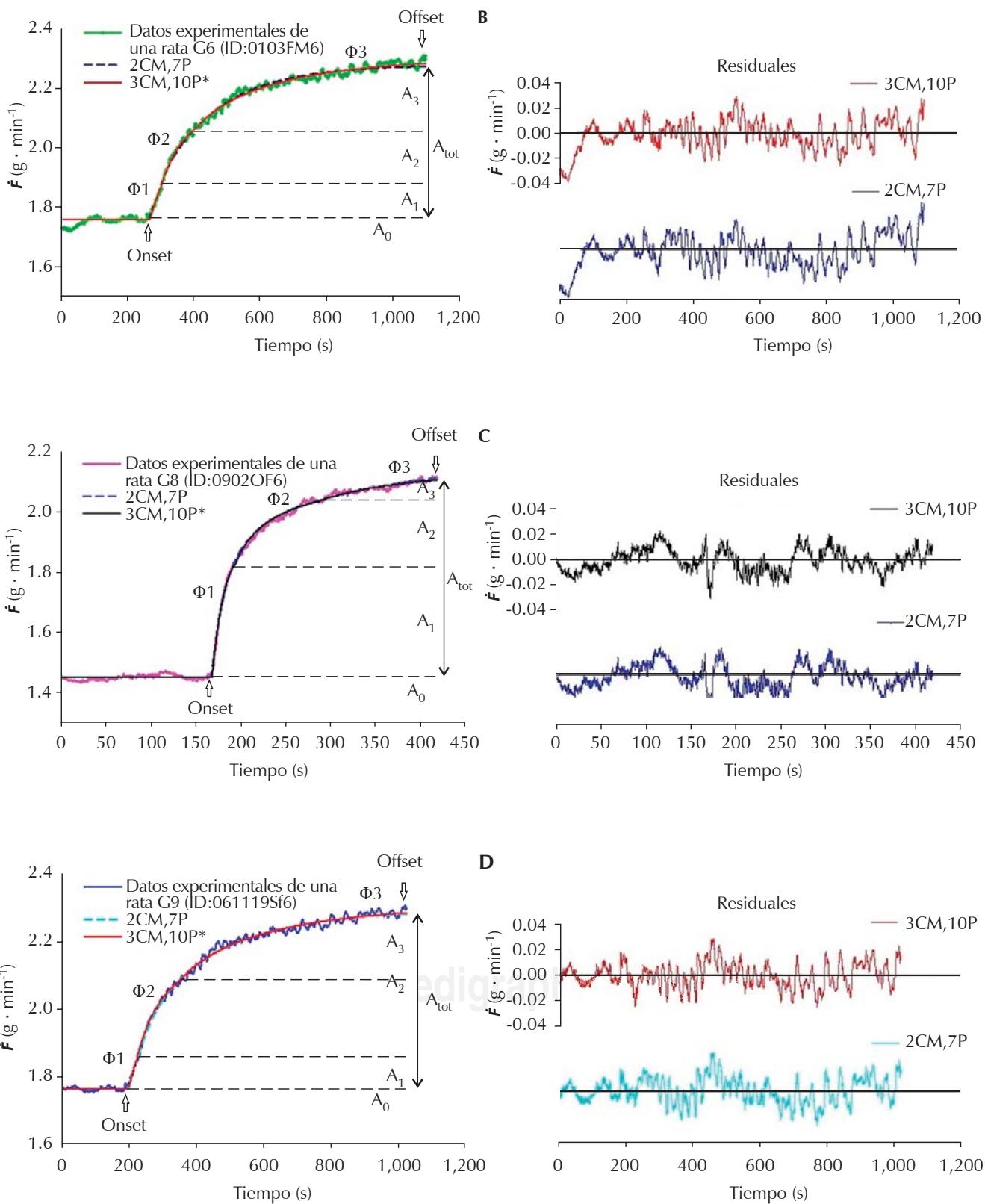
El parámetro temporal líneas de base ($\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$) (A_0) del modelo de 2C,7P_{línea basal Onset al Offset} (1.58 ± 0.22 , $n = 31$) o el del modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} (1.57 ± 0.22 , $n = 31$) no resultó diferente ($p > 0.05$) con respecto a los datos basales experimentales (1.62 ± 0.10 , $n = 31$) en 5G. Además, $F_{\text{max}1\mu\text{M FE}} (\text{g} \cdot \text{min}^{-1})$ (2.55 ± 0.02 , $n = 31$) resultó también similar ($p > 0.05$) respecto a $A_0 + A_{\text{tot}}$, ya sea para el modelo de 2C,7P_{línea basal Onset al Offset} (2.5620 ± 0.30) o para el modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} (2.57 ± 0.30) de 5G.



Análisis entre modelos

El modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} respecto al modelo de 2C,7P_{línea basal Onset al Offset} ajustó mejor desde el punto de vista estadístico (Cuadros 1-3) y teórico (fisiológico) (Figura 1B-1F) los datos de contracción isométrica transitoria. En contraste con el modelo de 2C,7P_{línea basal Onset al Offset} que distinguió sólo dos fases, una rápida seguida de otra lenta (Figura 1B-1F, Cuadro 2), el modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} distinguió correctamente una fase transitoria rápida de desarrollo fuerza ($\Phi 1F$), seguida de otra fase transitoria moderadamente rápida de desarrollo de fuerza ($\Phi 2F$) y otra fase transitoria lenta de desarrollo de fuerza ($\Phi 3F$) (Figura 1B-1F). Estas fases $\Phi 1F$, $\Phi 2F$ y $\Phi 3F$ cuantificaron la respuesta dinámica de los datos de contracción inducida con FE en cada uno de los 5G de ratas, en términos de los valores numéricos de sus parámetros temporales (Cuadro 2). El modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} diferenció desde el punto de vista fisiológico esas tres fases funcionalmente distintas de F ; el $F(t) = A_0 + A_1 \cdot (1 - \exp(- (t - TD1)/\tau_1))$, identificó una primera fase de fuerza de desarrollo rápido ($\Phi 1F$, Figura 1A-1F, Cuadro 2); seguida de una segunda fase de fuerza de desarrollo moderadamente rápido, detectada por el segundo término exponencial $1 - \exp(- (t - TD2)/\tau_2)$ ($\Phi 2F$, Figura 1A-1F, Cuadro 2); y el tercer término exponencial $1 - \exp(- (t - TD3)/\tau_3)$ identificó una tercera fase de fuerza de desarrollo lento ($\Phi 3F$, Figura 1A-1F), lo que a la vez también permitió distinguir la cinética de dichas fases ($\Phi 1F \tau$, $\Phi 2F \tau$, y $\Phi 3F \tau$) en los datos de respuesta on-transitoria (Figura 1B-1F, Cuadro 2). El modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} ajustó correctamente ($F(t)$) la respuesta on-transitoria en cada uno de los 5G de ratas con sus 10 parámetros temporales: amplitudes A_0 , A_1 , A_2 y A_3 ; retrasos de tiempo $TD1$, $TD2$ y $TD3$; constantes de tiempo τ_1 , τ_2 y τ_3 (Cuadro 2); asimismo, permitió distinguir una cinética total, desde el Onset hasta el Offset, mediante el $MRT_{\text{Exp}F}$ 3CM (Cuadros 1 y 3). Luego, en la contracción isométrica inducida con FE en la aorta torácica de cada uno de los cinco grupos (G6, G8, G9, G16 y G78) de datos on-transitorios de ratas (Figura 1B-1F). El modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} identificó tres fases funcionalmente distintas de la fuerza desarrollada (F) como sigue.

En los 5G en general, la fase uno de la respuesta on-transitoria identificada con los modelos de 2C,7P_{línea basal Onset al Offset} y de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} resultaron similares, al igual que la cinética de la respuesta on-transitoria total, pero la cinética de la fase dos de la respuesta on-transitoria resultó lenta en el modelo de 2C,7P_{línea basal Onset al Offset} comparado con el modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset}.



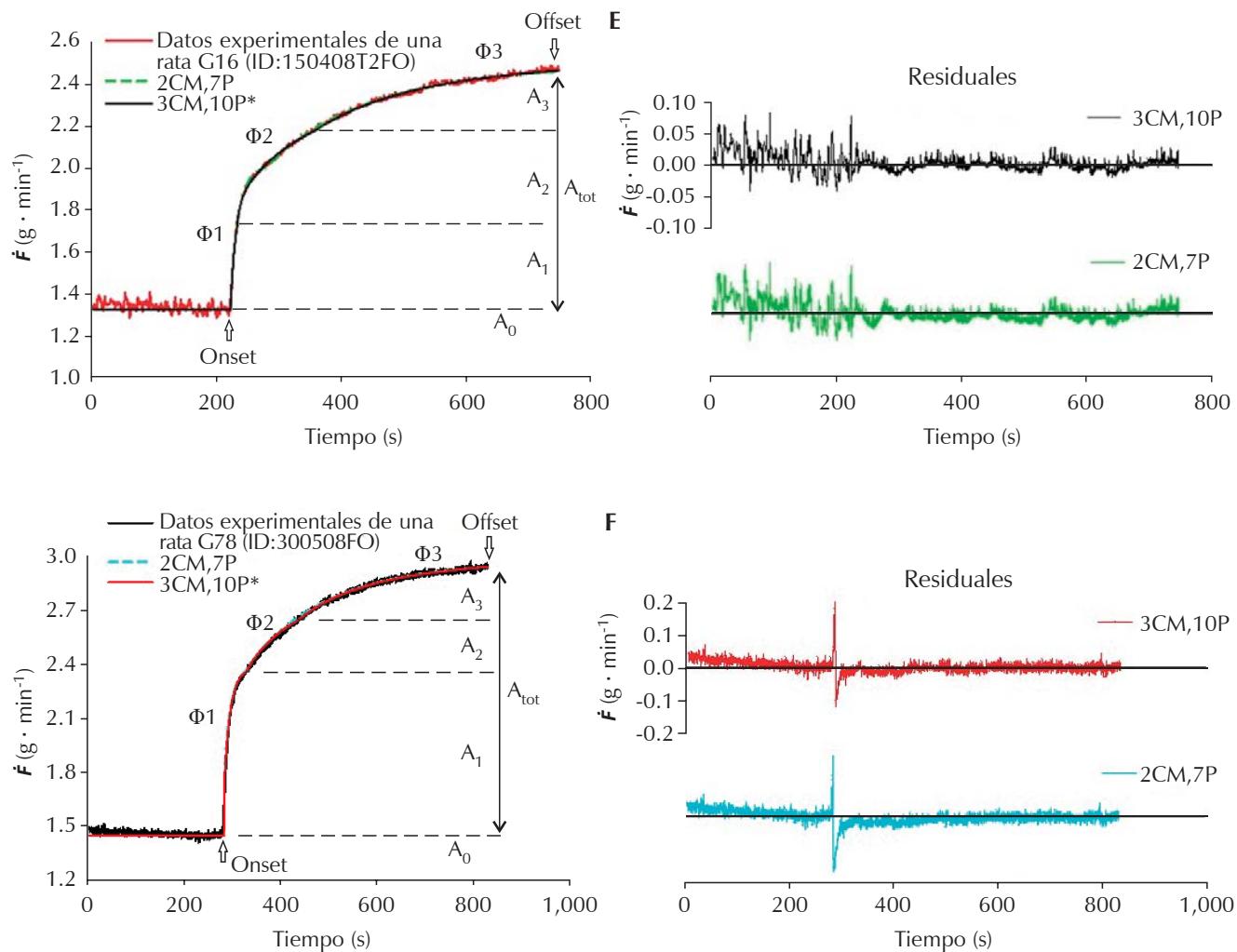


Figura 1. Perfil del curso temporal de desarrollo de fuerza (F) durante las contracciones transitorias inducidas por fenilefrina en segmentos de aorta torácica de cinco grupos de ratas de diferentes edades (G6, G8, G9, G16, G78) en semanas (Figura 1A). Las figuras 1B hasta la 1F muestran dos modelos matemáticos exponenciales, uno de dos componentes (con dos retardos de tiempo) y siete parámetros de tiempo estimados (2CM,7P) y otro de tres componentes (con tres retardos de tiempo) y 10 parámetros de tiempo estimados (3CM,10P) que ajustaron los perfiles de F y sus residuales con una ventana, desde una línea basal _Onset hasta el Offset, es un ejemplo representativo del grupo G6 (prepuberal, Figura 1B), del G8 (joven, Figura 1C), del G9 (puberal, Figura 1D), del G16 (adulto, Figura 1E) y del G78 (viejo, Figura 1F); el modelo de mejor ajuste 3CM,10P identificó tres «esperadas» fases (Φ_1 , Φ_2 y Φ_3) de fuerza desarrollada (Φ_1F , Φ_2F y Φ_3F) de contracción, clasificadas cinéticamente como rápida ($\Phi_1F\tau$), moderadamente rápida ($\Phi_2F\tau$) y lenta ($\Phi_3F\tau$) en células de músculo liso arterial aórtico. Onset y Offset son el inicio y el final de la respuesta contráctil transitoria. A_0 es línea basal; A_1 , A_2 y A_3 son las amplitudes de las tres fases mencionadas que se obtuvieron con el 3CM,10P _{línea basal _Onset al Offset} y A_{tot} es la suma de estas últimas.

Modelo de $2C,7P$ _{línea basal _Onset al Offset} vs modelo de $3C,10P$ _{línea basal _Onset al Offset} (Cuadro 2). Los parámetros A_0 , A_1 y A_{tot} ($g \cdot min^{-1}$); TD1 y TD2 (s); τ_1 y MRTexp (s) provenientes de los dos modelos resultaron similares en cada grupo de los 5G. Sin embargo, A_2 fue alto ($F_{valor} = 6$,

$p < 0.001$) tanto en el G6 como en el G78 con el modelo de $2C,7P$ _{línea basal _Onset al Offset} comparado con el modelo de $3C,10P$ _{línea basal _Onset al Offset}; A_1 proporcional fue 0.16 más alto ($F_{valor} = 3$, $p < 0.003$) en G6 con el modelo de $3C,10P$ _{línea basal _Onset al Offset} comparado con el modelo de

Cuadro 1. Resumen de los parámetros estimados con dos modelos diferentes de ajuste matemático exponencial, 2CM,7P_{línea basal} Onset al Offset y 3CM,10P_{línea basal} Onset al Offset, de la respuesta transitoria de la contracción inducida por fenilefrina en el segmento aórtico torácico de cinco grupos de ratas de edades diferentes en semanas.

Modelo, Parámetros (g•min ⁻¹) (g•min ⁻¹) (g•min ⁻¹) (g•min ⁻¹)	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A _{tot}	A ₁ /A _{tot}	A ₂ /A _{tot}	A ₃ /A _{tot}	TD1	TD2	TD3	τ ₁	τ ₂	τ ₃	MRT _{exp}
3CM,10P	1.70	0.33	0.09 ^a	0.22	0.64	0.15@ ^a	0.34	17.83 [!]	87.48 [!]	152.69 [!]	29.31 [*]	149.62* ^a	293.16*	196.01	
2CM,7P	1.72	0.22	0.39 ^b	--	0.61	0.36& ^b	0.64& ^b	--	±0.07	±5.24	±12.55	±10.82	±3.05	±28.94	±34.06
	±0.03	±0.04	±0.04	--	±0.02	±0.06	±0.06	--	±0.02	±3.41	±28.91	--	±5.01	±32.21	±30.56
	±0.03	±0.04	±0.04	--	±0.02	±0.06	±0.06	--	±0.02	±3.41	±28.91	--	±5.01	±32.21	±30.48
															±28.62
3CM,10P	1.77	0.50	0.18	0.08	0.75	0.66@	0.25	0.10@	2.60 [!]	38.04 [!]	114.87 [!]	22.27*	90.74* ^a	216.10*	81.16
2CM,7P	1.77	0.57	0.18	--	0.75	0.76&	0.24&	--	±0.02	±5.84	±3.24	±1.94	±15.02	±21.54	±6.37
	±0.07	±0.03	±0.02	--	±0.03	±0.03	±0.03	--	±0.03	2.18 ^f	72.29 ^f	--	25.81 [§]	136.59 ^{§b}	--
	±0.07	±0.03	±0.02	--	±0.03	±0.03	±0.03	--	±0.03	±0.79	±7.75	--	±5.65	±18.25	76.75
															±2.13
3CM,10P	1.70	0.37	0.22	0.070	0.66	0.57@	0.33@	0.11@	4.39 [!]	34.91	113.36 [!]	18.92 [*]	85.37* ^a	232.33*	96.45
2CM,7P	1.70	0.37	0.28	--	0.65	0.57&	0.43&	--	±0.03	±0.03	±0.04	±1.07	±2.42	±13.81	±9.02
	±0.03	±0.04	±0.04	--	±0.03	±0.03	±0.03	--	±0.03	±0.03	±0.04	±1.07	±17.10	±17.10	±27.14
	±0.03	±0.04	±0.04	--	±0.03	±0.03	±0.03	--	±0.03	±0.07	±0.07	±0.07	±6.40	±25.82	85.51
															±23.37
3CM,10P	1.38	0.71	0.74	0.070	1.53	0.46@	0.48@	0.05\$	11.42 [!]	37.53	157.53 [!]	9.28*	142.20* ^a	280.20*	119.08
2CM,7P	1.38	0.82	0.70	--	1.52	0.54	0.46	--	±0.03	±0.03	±0.02	±5.19	±10.56	±4.65	±1.33
	±0.02	±0.06	±0.05	--	±0.10	±0.02	±0.02	--	±0.02	±0.02	±0.02	±10.49 ^f	57.84 ^f	--	±10.55
	±0.02	±0.06	±0.05	--	±0.10	±0.02	±0.02	--	±0.02	±5.10	±7.66	--	±1.18	±8.07	±116.57
															±6.06
3CM,10P	1.29	0.91	0.37 ^a	0.19	1.47	0.62@	0.25@	0.13@	2.18 [!]	62.40	158.09 [!]	13.58*	106.59* ^a	298.76*	110.68
2CM,7P	1.29	0.92	0.53b	--	1.45	0.64&	0.37&	--	±0.03	±0.02	±0.01	±0.47	±3.11	±4.05	±1.03
	±0.05	±0.05	±0.05	--	±0.08	±0.02	±0.02	--	±0.02	±0.02	±0.01	±2.01 ^f	62.92 ^f	--	±1.03
	±0.05	±0.05	±0.05	--	±0.08	±0.02	±0.02	--	±0.02	±0.51	±3.61	--	±1.37	±9.53	±7.32

Los valores numéricos son promedio ± EEM, --, ningún valor numérico de parámetro estimado. F, desarrollo de fuerza (g•min⁻¹). 2CM,7P y 3CM,10P, modelos matemáticos con ventana de ajuste desde una línea basal, inicio del estímulo fármaco mecánico hasta que éste termina: con dos componentes (dos TDs) siete parámetros, y con tres componentes (tres TDs) 10 parámetros, respectivamente. TD, tiempo de retardo de la fase (Φ) uno (TD1), de la Φ dos (TD2) y de la Φ tres (TD3). τ₁, constante de la Φ uno (τ₁), de la Φ dos (τ₂) y de la Φ tres (τ₃). A, amplitud: A₀, línea basal (el F ajustado por el modelo antes de la estimulación fármaco mecánica); A es la amplitud de la respuesta: la distancia del F desde A₀ hasta el F requerido para la Φ uno (A₁), para la Φ dos (A₂) y para la Φ tres (A₃); A_{tot}, amplitud total. MRT_{exp}, tiempo de respuesta media exponencial (de la respuesta transitoria completa). Las diferencias entre parámetros fueron distinguidas (p<0.05 a p<0.001) ya sea con la prueba t pareada de Student para el 2CM,7P o con el análisis de varianza de un factor para 3C,10P (ANOVA un factor) post hoc Holm-Sidak o prueba de Tukey; las diferencias se muestran entre los parámetros con el mismo símbolo en superíndice para el 2CM,7P dentro de cada grupo donde ^a(t= 2 to 9), ^b(t= 7 to 18), así como para el 3CM,10P en cada grupo donde [§](t= 8 to 17) y [§](t= 7 to 18), así como para el 3CM,10P en cada grupo donde [§](t= 8 to 17) y [§](t= 8 to 17), [§](F_{valor} = 8 a 313), [§](F_{valor} = 45 a 221); H = 13 a 15 y * (F_{valor} = 26 a 225; H = 15 a 4874). Para las comparaciones entre las fases uno y dos provenientes de los 2CM,7P y 3CM,10P, diferentes superíndices de pares de letras en el parámetro correspondiente asignan las diferencias entre modelos.

Cuadro 2. Suma residual de cuadrados (RSS) y estimación del error cuadrático medio (MSE) estimados por los modelos matemáticos exponenciales de dos componentes con siete parámetros (2C,7P) y el de tres componentes con diez parámetros (3C,10P) que modelaron cinco grupos de ratas de diferentes edades en semanas.

Group	Rata#	2C,7P							3C,10P						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
G6 semanas (N=7)	RSS	0.1326	0.2611	0.7668	0.7551	0.1948	0.2174	0.7832	0.094	0.273	0.8516	0.8299	0.068	0.1247	0.6066
	MSE	1	2	4	3	2	2	4	1	2	5	4	1	1	3
G8 semanas (N=6)	RSS	0.5564	0.1024	0.2012	0.5513	1.2447	0.9798	--	0.5999	0.0914	0.2076	0.6863	1.2005	1.0803	--
	MSE	4	1	2	3	8	6	--	4	1	2	4	8	7P	--
G9 semanas (N=6)	RSS	0.1072	0.2672	0.0513	0.3445	0.2709	0.0519	--	0.0961	0.2701	0.0517	0.309	0.2544	0.0713	--
	MSE	1	1	2	1	1	--	--	1	1	1	2	1	1	--
G16 semanas (N=6)	RSS	0.7687	0.3506	0.5089	0.5908	0.7782	0.5762	--	0.3321	0.3236	0.5317	0.6961	0.7437	0.3936	--
	MSE	2	1	1	1	1	--	--	1	1	1	2	1	1	--
G78 semanas (N=6)	RSS	0.2353	0.5805	0.9299	1.4673	0.6834	0.2922	--	0.2575	0.4632	0.8858	1.4438	0.7686	0.2975	--
	MSE	1	2	3	3	1	1	--	1	1	3	3	2	1	--

MSE are expressed as 10^{-4} . --, ningún valor numérico de residuales.

2C,7P_{línea basal} *Onset al Offset* y A₂ proporcional fue 0.11 más alto (F_{valor} = 13, p < 0.001) en G6 con el modelo de 2C,7P_{línea basal} *Onset al Offset* comparado con el modelo de 3C,10P_{línea basal} *Onset al Offset*. Además, τ₂ resultó más lento (55.61 s alto) en 5G (F_{valor} = 21, p < 0.001, n = 31) en el modelo de 2C,7P_{línea basal} *Onset al Offset* en comparación con el modelo de 3C,10P_{línea basal} *Onset al Offset*.

Análisis del modelado

Las fases distinguidas por cada uno de los modelos usados en este trabajo en la respuesta on-transitoria inducida con fenilefrina en la aorta torácica de rata mostraron un orden de rango en duración de tiempo constante (τ, s) (Cuadro 2). Los análisis evidenciaron un orden de clasificación significativo (p < 0.05) de la cinética para cada modelo (2C,7P_{línea basal} *Onset al Offset*: τ₁ < τ₂, 3C,10P_{línea basal} *Onset al Offset*: τ₁ < τ₂ < τ₃) en cada grupo de ratas (G6, G8, G9, G16, G78). En consecuencia, en los 5G (n = 31) la cinética de cada una de las fases en la respuesta on-transitoria fueron de la siguiente manera: Φ1F τ (20.03 ± 12.32) < Φ2F τ (176.67 ± 71.30) en el modelo de 2C,7P_{línea basal} *Onset al Offset* (prueba t de Student pareada = 13.2, p < 0.001); y también Φ1F τ (19.02 ± 2.22) < Φ2F τ (116.02 ± 9.10) < Φ3F τ (265.05 ± 12.43) en el modelo de 3C,10P_{línea basal} *Onset al Offset* (F_{valor} = 191, p < 0.001).

La duración del retardo (TD, s) resultó heterogénea dentro de cada modelo. El análisis estadístico mostró un orden de clasificación significativo (p < 0.05) en la duración del retardo con el modelo de 2C,7P_{línea basal} *Onset al Offset* para cada una de sus dos únicas fases (TD1 < TD2) en cada grupo de ratas (excepto en G6) (Cuadro 2). De manera que en cuatro de los grupos de ratas juntos (G8, G9, G16, G78, n = 24) TD1 (4.38 ± 6.95) < TD2 (57.42 ± 19.36) en el modelo de 2C,7P_{línea basal} *Onset al Offset* (prueba t de Student pareada = 14, p < 0.001). El análisis estadístico igualmente mostró un orden de rango significativo (p < 0.05) en la duración del retardo para cada una de las fases (TD1 < TD2 < TD3) con el modelo de 3C,10P_{línea basal} *Onset al Offset* en cada grupo (Cuadro 2), excepto en G9, G16 y G78 donde el TD1 resultó bajo en comparación con TD3 (Cuadro 2).

Los valores numéricos de amplitud relativa {A/A_{tot}} de la respuesta dentro de cada modelo resultaron heterogéneos (Cuadro 2). El análisis estadístico mostró en el modelo de 2C,7P_{línea basal} *Onset al Offset* un orden de clasificación significativo (p < 0.05) en {A₁/A_{tot}} > {A₂/A_{tot}} en cada grupo de los 5G de ratas, excepto en G6 donde {A₁/A_{tot}} < {A₂/A_{tot}} y en G78, ya que {A₁/A_{tot}} similar {A₂/A_{tot}}. También se observó un rango significativo (p <

Cuadro 3. Resultados de la prueba de Fisher para valorar el modelo matemático exponencial de mejor ajuste estadístico obtenido al comparar un modelo simple de dos componentes con siete parámetros ($2C, 7P_{\text{línea basal, Onset al Offset}}$) respecto a otro modelo complejo de tres componentes con diez parámetros ($3C, 10P_{\text{línea basal, Onset al Offset}}$) que modelaron la respuesta transitoria de las contracciones inducidas con fenilefrina en segmentos aórticos torácicos de cinco grupos de ratas de diferentes edades en semanas.

aPrueba de Fisher																			
G6 semanas (N=7)				G8 semanas (N=6)				G9 semanas (N=6)				G16 semanas (N=6)				G78 semanas (N=6)			
Modelos de ajuste	F_{valorRSS}	F_{tabulada}	BSF	F_{valorRSS}	F_{tabulada}	BSF	F_{valorRSS}	F_{tabulada}	BSF										
"Simple" vs "Complejo":																			
(S) (C)	89.10	1.00	C	12.52	1.11	C	2.41	1.19	C	390.02	1.00	C	20.20	1.00	C				
	21.76	1.00	C	16.34	1.13	C	1.63	1.13	C	16.58	1.00	C	61.79	1.00	C				
	56.49	1.00	C	4.29	1.13	C	0.64	1.13	S	10.53	1.00	C	10.79	1.00	C				
	71.08	1.00	C	34.66	1.11	C	12.32	1.15	C	41.14	1.00	C	4.48	1.00	C				
	715.65	1.00	C	6.11	1.11	C	7.69	1.13	C	18.32	1.00	C	33.42	1.00	C				
	284.71	1.00	C	15.48	1.11	C	27.83	1.15	C	156.19	1.00	C	3.82	1.00	C				
	179.92	1.00	C																

Modelo matemático exponencial de mejor ajuste que distinguió estadísticamente las tres fases de la respuesta transitoria de las contracciones inducidas por fenilefrina en segmentos aórticos torácicos de los cinco grupos de ratas anteriores

Modelo matemático exponencial

$$F(t) = A_0 + A_1 \cdot (1 - \exp(-(t - TD1) / \tau_1)) + A_2 \cdot (1 - \exp(-(t - TD2) / \tau_2)) + A_3 \cdot (1 - \exp(-(t - TD3) / \tau_3))$$

Modelo de ajuste

$$+ 3C, 10P_{\text{línea basal, Inicio al Final del Ejercicio}}$$

Comentarios

distingue la $\tau \Phi 1$ de la $\tau \Phi 2$ y la de la $\tau \Phi 3$

F: desarrollo de fuerza ($DF, g \cdot min^{-1}$). ^aPrueba de Fisher (F_{valor} a 0.05 de nivel significativo (1a): F_{tabulada} a 0.05 (1a)= 1.15). Si $F_{\text{valor}} > F_{\text{tabulada}}$ entonces el modelo C ajusta mejor; si $F_{\text{valor}} < F_{\text{tabulada}}$ entonces el modelo S ajusta mejor.

0.05) en $\{A_1/A_{\text{tot}}\} > \{A_2/A_{\text{tot}}\} < \{A_3/A_{\text{tot}}\}$ en el modelo de $3C, 10P_{\text{línea basal, Onset al Offset}}$ para cada grupo, excepto en G6 donde solamente $\{A_1/A_{\text{tot}}\} > \{A_2/A_{\text{tot}}\}$ y en G16 en el que $\{A_1/A_{\text{tot}}\}$ similar $\{A_2/A_{\text{tot}}\} > \{A_3/A_{\text{tot}}\}$.

DISCUSIÓN

Nuestros dos modelos matemáticos exponenciales, $2C, 7P_{\text{línea basal, Onset al Offset}}$ y $3C, 10P_{\text{línea basal, Onset al Offset}}$ fueron consistentes en el ajuste de la línea de base y de la de respuesta máxima, ya que los valores numéricos de A_0 fueron similares con respecto a la línea de base experimental de F así como una amplitud similar ($A_0 + A_{\text{tot}}$) respecto al valor asintótico ($F_{\text{max1}\mu M FE}$) del estado estable en los SG.

Los parámetros cinéticos estimados [on]-transitorios, τ_1, τ_2, τ_3 y MRT_{exp} que cuantifican la respuesta dinámica de los datos de contracción inducida con FE en aorta torácica de ratas G6, G8, G9, G16 y G78 se muestran por

primera vez en este estudio de modelado con dos modelos exponenciales matemáticos que ajustan de manera diferente la cinética de la contracción isométrica transitoria durante la estimulación con FE del receptor adrenérgico α_1 en anillos de aorta torácica de rata.

En este estudio la fase transitoria rápida de desarrollo de fuerza fue modelada de manera similar por ambos modelos en términos de los parámetros temporales $A_0, A_1, A_{\text{tot}}, TD1, TD2, \tau_1$, y MRT_{exp} . En cambio, la fase transitoria moderadamente rápida de desarrollo de fuerza fue modelada de manera diferente por dichos modelos en términos de los parámetros A_2, A_1 proporcional, A_2 proporcional y τ_2 en G6; mientras que en G78 τ_2 resultó alta en el modelo de $2C, 7P_{\text{línea basal, Onset al Offset}}$ respecto a la del modelo de $3C, 10P_{\text{línea basal, Onset al Offset}}$. Estas observaciones se explican porque el modelo de $3C, 10P_{\text{línea basal, Onset al Offset}}$ con su tercer término exponencial distingue la fase tres; en tanto que el modelo de $2C, 7P_{\text{línea basal, Onset al Offset}}$ modeló juntas las fases

dos y tres; en consecuencia, se prefiere el modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset}.

El modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} se situó estadísticamente mejor en términos de la prueba de Fisher y también desde el punto de vista fisiológico en términos del conocimiento teórico actual sobre la contracción vascular isométrica transitoria. Por un lado, en VSMC, la NE o la FE es un tipo de estimulante ampliamente utilizado para identificar los cambios en el [Ca²⁺]_i al activar el receptor adrenérgico α^{1,4}. Este estímulo induce una contracción característica sostenida al liberar Ca²⁺ de los sitios de almacenamiento celular y también tiene efectos dobles en la contracción que dependen de la afluencia de Ca²⁺. Esto significa que una parte de la contracción inducida por estos estimulantes se debe a la afluencia de Ca²⁺ a través de una vía menos sensible a los bloqueadores de canales de Ca²⁺ y que otra parte de la contracción no depende del aumento de Ca²⁺ en la VSMC.⁴ La NE mediante la activación del receptor adrenérgico α^{1,4} induce una contracción transitoria seguida de una pequeña contracción sostenida en ausencia de afluencia neta de Ca²⁺ externo al igual que los bloqueadores del canal de Ca²⁺ inhiben el evento sostenido S2 con más intensidad que la fase transitoria S1.^{1,4} La FE induce la contracción aumentando el [Ca²⁺]_i debido principalmente a la apertura del canal de Ca²⁺ de tipo L y en parte debido a la liberación endógena de Ca²⁺ y al influxo de Ca²⁺ a través del canal de cationes no selectivo y CRAC responsable del evento S2 y/o de la sensibilización de los elementos contráctiles al Ca²⁺ (S3).⁴ Por otra parte, en este trabajo el modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} que distinguió correctamente el Φ1F transitorio rápido, seguido del Φ2F moderadamente rápido y el otro Φ1F lento, también cuantificó la dinámica de toda la respuesta contráctil de datos inducida con FE en cada uno de nuestros 5G de ratas, distinguiendo de esa manera una τ de orden cinético para esas fases, incluso el orden de rango de retardo de tiempo de respuesta TD1 < TD2 para el modelo de 2C,7P_{línea basal Onset al Offset} y al menos para TD1 < TD3 en el modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} en los 5G. Asimismo, este modelo de 3C,10P_{línea basal Onset al Offset} distinguió en los 5G un orden de clasificación en términos de sus amplitudes relativas para {A₁/A_{tot}} > {A₂/A_{tot}} < {A₃/A_{tot}}; mientras que la distinción {A₁/A_{tot}} > {A₂/A_{tot}} se observó con el modelo de 2C,7P_{línea basal Onset al Offset} en G8, G9 y G78, lo que nos hace pensar en una posible y cercana relación entre el ajuste cinético con los eventos teóricos con el conocimiento actual de la reactividad vascular para esta condición experimental con FE en tejido aórtico torácico de rata de la forma siguiente:

Se han explicado las tres fases funcionalmente distintas Φ1F, Φ2F y Φ3F observadas en este estudio durante la respuesta dinámica de la contracción inducida con FE en la aorta torácica, basada en la fuerza de desarrollo esperada sobre la dinámica teórica del calcio en términos de la afluencia de Ca²⁺ extracelular, la liberación Ca²⁺ del RS vía la liberación de Ca²⁺ inducida por IP3 y la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ en las células musculares lisas del sistema vascular^{5,6} y también en términos de los mecanismos de acción de la FE, agonista que acopla la contracción mediada por el [Ca²⁺]_i²⁸ como en la aorta de la rata, donde la FE induce un aumento inicial grande en [Ca²⁺]_i debido a la liberación de Ca²⁺ acompañado de un incremento previo en la formación de IP3, seguido de un aumento sostenido de afluencia de Ca²⁺ y la contracción transitoria.^{4,28}

Los movimientos de Ca²⁺ pronosticados principalmente por la contracción hacen pensar lo siguiente:

i) Que la NE provoca la liberación de Ca²⁺ del RS hacia el compartimento no contráctil de Ca²⁺ para regular los mecanismos dependientes de Ca²⁺ y también hacia el citoplasma donde existen proteínas contráctiles e inicia la contracción causando el evento S1 y porque la cantidad de Ca²⁺ almacenada en la RS es limitada, la contracción debida a la liberación de Ca²⁺ es transitoriamente responsable del evento S1 y probablemente sea una causa de Φ1F de la FE observada en este estudio, ya que los bloqueadores de los canales de Ca²⁺ no inhiben la liberación de Ca²⁺, lo que podría interpretarse como que este Φ1F en la contracción inducida por la FE actúa principalmente sobre la vía IP3/Ca²⁺/MLCK.²⁹

ii) La NE también abre el canal de Ca²⁺ ligado al receptor como los canales de Ca²⁺ de tipo L inducidos por la apertura del canal de cationes no selectivo, igualmente permeable a Ca²⁺, la inhibición de los canales de K⁺ o la apertura de los canales de Cl⁻, evento S2. Así que una causa probable de Φ2F de la FE en este estudio sería una contracción sostenida que causa parcialmente el evento S3, que tal vez también sea la causa de Φ3F de la FE, con la diferencia de que los bloqueadores del canal de calcio sólo inhiben débilmente el receptor relacionado con el canal de calcio y de que los bloqueadores de los canales de Ca²⁺ inhiben una porción mayor del aumento sostenido de la [Ca²⁺]_i inducido por agonistas,³⁰ lo que teóricamente haría pensar en que Φ2F de la FE en este estudio podría deberse principalmente a la vía canal de Ca²⁺/complejo Ca²⁺ calmodulina/MLCK.¹ El canal de Ca²⁺ de tipo L parece ser la principal vía de afluencia de Ca²⁺, lo que significa que la contracción inducida por NE,

y probablemente la FE en este estudio, es parcialmente sensible a los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} . De hecho, el agotamiento de Ca^{2+} del RS puede abrir canales de Ca^{2+} activados por la liberación de Ca^{2+} para aumentar el $[\text{Ca}^{2+}]_i$.^{31,32}

iii) La activación del receptor adrenérgico α_1 también causa sensibilización al Ca^{2+} de los elementos contráctiles responsables del evento S3, por ejemplo, la sensibilización al Ca^{2+} inducida por la NE en VSMC estimula al receptor adrenérgico α_1 que aumenta el $[\text{Ca}^{2+}]_i$, activa la cinasa de la MLC (MLCK) que al fosforilar a la MLC induce la contracción responsable de S3 porque la fosforilación de la MLC se rige por las acciones opuestas entre la MLCK y la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) y la actividad de MLCK se regula por los niveles intracelulares de Ca^{2+} a través de la unión del complejo $(\text{Ca}^{2+})_4\text{-calmodulina}$ a la MLCK.^{1,30} Otra causa posible del $\Phi 3F$ de la FE en este estudio es que la FE, al igual que la endotelina-1 y la prostaglandina F2 α , también actúa sobre la vía RhoA/Rho-cinasa/MLCP, un mecanismo principal para la inhibición de la MLCP independiente del Ca^{2+} para evocar una gran contracción monotónica.^{1,4,32,33} Por lo tanto, es probable que las causas principales de la dinámica del calcio responsables de los eventos teóricos S1, S2 y S3^{4,34} sean las mismas responsables de la dinámica de la fase rápida ($\Phi 1F, \tau 1$), fase moderadamente rápida ($\Phi 2F, \tau 2$) y fase lenta ($\Phi 3F, \tau 3$) de la fuerza desarrollada durante la respuesta transitoria de contracción isométrica inducida con FE en los segmentos aórticos torácicos de los 5G.^{35,36} En consecuencia, de haber una relación con el concepto teórico, esperamos que los bloqueadores de canal de Ca^{2+} tipo L inhiban tanto $\Phi 2F$ como $\Phi 3F$ con más intensidad que la fase transitoria $\Phi 1F$. Queda por aclarar si la contribución proporcional de la dinámica del Ca^{2+} a la respuesta contráctil transitoria, en términos de las tres fases de contracciones inducidas con FE observadas en este estudio, se relaciona a manera de causa-efecto. Especulamos que las tres fases cinéticas de la contracción muscular vascular aórtica (rápida, moderadamente rápida y lenta) se relacionan a manera de causa (S)- efecto (S) con la dinámica del Ca^{2+} mediante tres secuencias teóricas de eventos (S1, S2, S3);²⁴ es decir, la salida del Ca^{2+} del RS debido a la estimulación farmacocinética (S1) sería principalmente responsable de la $\Phi 1F \tau$; el influjo de Ca^{2+} extracelular causado por diferentes mecanismos desde el sarcolema que regula la entrada de Ca^{2+} hasta las fuentes de Ca^{2+} extracelulares (S2) sería principalmente responsable de la $\Phi 2F \tau$ y los procesos de regulación de la contractilidad causados por diferentes mecanismos (S3) serían principalmente responsables de la $\Phi 3F \tau$.

CONCLUSIONES

El modelo matemático exponencial triple, de tres componentes, ajustó adecuadamente los datos experimentales de la respuesta de contracción isométrica inducida con FE en la aorta torácica de cada uno de los grupos de ratas: G6 (prepuberales), G8 (jóvenes), G9 (puberales), G16 (adultas) y G78 (viejas), identificando tres fases esperadas de fuerza desarrollada ($\Phi 1F, \Phi 2F$ y $\Phi 3F$) de contracción, clasificadas cinéticamente como rápida $\Phi 1F \tau$, moderadamente rápida $\Phi 2F \tau$ y lenta $\Phi 3F \tau$, en células de músculo liso arterial; es decir, en las fases de la respuesta contráctil a la FE se observó un orden ascendente en la duración de la constante de tiempo ($\tau 1 < \tau 2 < \tau 3$) en cada uno de los cinco grupos de ratas, por lo que los valores de $\tau \Phi 1F, \tau \Phi 2F, \tau \Phi 3F$ resultaron diferentes entre sí en cada grupo de ratas de distintas edades. Se observó que los modelos exponenciales matemáticos de $2C, 7P_{\text{línea basal, Onset al Offset}}$ y de $3C, 10P_{\text{línea basal, Onset al Offset}}$, ajustaron de manera diferente la cinética de la contracción isométrica en AsAoTx de la rata. El primero de ellos modeló las fases dos y tres juntas; mientras que el segundo modelo las separó. No obstante, la fase uno en general fue modelada de manera similar por ambos modelos, pero en la fase dos no fue el caso.

Problemas pendientes

Realizar comparaciones cinéticas entre los grupos de ratas de diferentes edades cronológicas para investigar una posible relación de causa-efecto entre parámetros biológicos de edad y las fases rápida, moderadamente rápida y lenta de la reactividad vascular.

Finalmente, sería necesario llevar a cabo estudios cinéticos adicionales utilizando FE y otros inductores sobre la reactividad vascular arterial en diferentes condiciones para diseccionar estas tres fases de respuesta en términos de causa-efecto, lo anterior con el propósito de obtener más información sobre los mecanismos cinéticos fármaco-mecánicos y sus aplicaciones potenciales de relevancia clínica en fisiología y en el área biomédica.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al programa de Doctorado en Investigación en Medicina, Escuela Superior de Medicina Instituto Politécnico Nacional, al SIP (20171397) del IPN y al CONACYT (23151) México por su apoyo académico-administrativo a este estudio.

Conflictos de intereses: No hay intereses en competencia.



REFERENCIAS

- Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25: 593-620.
- Ratz PH, Miner AS. Muscle calcium sensitization and feedback control of cellular calcium levels role of protein kinase C ζ and calcium entry in KCl-Induced Vascular Smooth: *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328(2): 399-408.
- Lee CH, Poburko D, Kuo KH, Seow CY, van Breemen C. Ca $^{2+}$ oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H1571-H1583.
- Himpens R, Missiaen L, Casteels R. Ca $^{2+}$ homeostasis in vascular smooth muscle. *J Vasc Res* 1995; 32: 207-219.
- Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C769-83.
- Sato K, Ozaki H, Karaki H. Multiple effects of caffeine on contraction and cytosolic free calcium levels in vascular smooth muscle of rat aorta. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988; 338: 443-8.
- Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 1979; 59: 606-718.
- Driska SP, Aksoy MO, Murphy RA. Myosin light chain phosphorylation associated with contraction in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 1981; 240: C222-33.
- Somlyo AP, Somlyo AV. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol Scand* 1998; 164: 437-48.
- Wetschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med* 2002; 80: 629-38.
- Sanders KM. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1438-49.
- Fiala D, Psikuta A, Jendritzky G, Paulke S, Nelson DA, Lichtenbelt WD, van M, Frijns AJH. Physiological modeling for technical, clinical and research applications. *FBS* 2010; S2: 939-68.
- Padilla J, M Del C Castillo, Guevara G, López J, Castillo C. Fast age-related on-transient contraction kinetics during α_1 adrenergic phenylephrine stimulation in rat thoracic aortae artery. *Experimental Biology* 2009. Late braking abstracts. LB386, FASEB J 2009.
- Hurwitz L. Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1986; 26: 225-58.
- Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano KI, Harada KI, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 157-230.
- Sierra-Ramírez A, Morato T, Campos R, Rubio I, Calzada C, Méndez E, Ceballos G. Acute effects of testosterone on intracellular Ca $^{2+}$ kinetics in rat coronary cells are exerted via aromatization to estrogens. *Am J Heart Circ Physiol* 2004; 286: H63-H71.
- Hsu TL, Chao PT, Hsiu H, Wang WK, Li SP, Wang YYL. Organ-specific ligation-induced changes in harmonic components of the pulse spectrum and regional vasoconstrictor selectivity in Wistar rats. *Exp Physiol* 2006; 91(19): 163-70.
- World Health Organization. Principles for evaluating chemical effects on the aged population. Office of Publication. Geneve, Switzerland 1993.
- Goyal KK. Changes with age in the aorta of man and mouse. *Exp Gerontol* 1982; 17: 127-32.
- Castillo EF, Castillo C, Valencia I, Hernández D, Castillo MC, Fries S, Bobadilla RA. The actions of α -methylnorepinephrine on the rat aorta. *Proc West Pharmacol Soc* 1996; 39: 33-5.
- Baker HJ, Russel Lindsey J, Weisbroth SH. The laboratory rat vol. 1 biology and diseases. Academic Press, New York, USA 1993.
- Cruz-Domínguez, MP, Villalobos-Molina, R, Miliar-García, A, Montes-Cortez, DH, Reséndiz-Ramírez AC, Asbun-Bojalil J, Cervantes-Cruz J, Castillo-Hernández MC, Castillo-Henkel C. Evidence of α_1 -adrenoceptor functional changes in omental arteries of patients with end-stage renal disease. *Auton Autac Pharmacol* 2008; 28: 19-27.
- Padilla JP, Kowalchuk JM, Taylor AW, Paterson DH. Comparison of model estimates of phase two on-transient VO $_2$ uptake kinetics during submaximal exercise in old men. *Rev Hosp Jua Mex* 2008a; 75: 151-65.
- Padilla JP, Kowalchuk JM, Taylor AW, Paterson DH. Determinación de la cinética de la fase dos transitoria de la VO $_2$ durante ejercicio de carga constante de intensidades moderada e intensa en hombres jóvenes. *Rev Hosp Jua Mex* 2007; 74: 231-44.
- Padilla JP, Kowalchuk JM, Taylor AW, Paterson DH. Phase two on-transient O $_2$ kinetics is slow age- related during submaximal exercise in adult men. *Rev Hosp Jua Mex* 2008b; 75: 166-82.
- Motulsky HJ, Ransnas A. Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *FASEB J* 1987; 1: 365-74.
- Zar JH. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey, USA 1996.
- Arner A, Pfitzer G. Regulation of cross-bridge cycles by Ca $^{2+}$ in smooth muscle cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1998; 134: 63-146.
- Di Salvo J, Pfitzer G, Semenchuk LA. Protein tyrosine phosphorylation, cellular Ca $^{2+}$, and Ca $^{2+}$ sensitivity for contraction of smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72: 1434-9.
- Kuriyama H, Kitamura K, Itoh T, Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev* 1998; 78: 811-920.
- Albertoni Borghese MF, Ortiz MC, Balonga S, Moreira Szokalo R, Majowicz MP. The role of endothelin system in renal structure and function during the postnatal development of the rat kidney. *PLOS ONE* 2016; 11(2):1-17, e0148866. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0148866>.
- Holda JR, Klishin A, Sedova M, Hüser J, Blatter LA. Capacitative calcium entry. *News Physiol Sci* 1998; 13: 157-63.
- Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996; 77: 901-30.
- Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 615-49.
- Ogut O, Brozovich FV. Regulation of force in vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35(4): 347-55.
- Strigow F, Ehrlich BE. Ligand-gated calcium channels inside and out. *Curr Opin Cell Bio* 1996; 8: 490-5.

Solicitud de sobretiros:

Dr. Javier Padilla Pérez
 Departamento de Fisiología del Ejercicio,
 Escuela Superior de Medicina,
 Instituto Politécnico Nacional.
 Av. Plan de San Luis y Díaz Mirón S/N,
 Casco de Santo Tomás,
 Del. Miguel Hidalgo, C.P. 11340, CDMX, México.
 Tel: (55) 5729-6300, ext. 62782.
 Correo electrónico: jppgenius@hotmail.com