

POSGRADO EN INGENIERÍA DE PROCESOS

**MODELADO ESTOCÁSTICO DE LA SECRECIÓN EN
CÉLULAS CILIADAS INTERNAS DEL TRAYECTO
AUDITIVO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN INGENIERÍA DE PROCESOS

PRESENTA:

JESSICA ALEJANDRA SOTO BEAR

DIRECTORA DE TESIS

DRA. VIRGINIA GONZÁLEZ VÉLEZ

PROFESOR TITULAR, DEPTO CIENCIAS BÁSICAS, UAM-A

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. NORMA CASTAÑEDA VILLA

PROFESOR TITULAR, ÁREA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA, UAM-I

24 de junio de 2019

Para mi abuelita.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre y a mi padre por motivarme a superarme, apoyarme durante cada momento y creer en mí.

Gracias Julio, por estar conmigo e impulsarme a tomar riesgos.

Estoy muy agradecida con mi asesora, Dra. Virginia González Vélez, por aceptarme y guiarme en éste proyecto; por ser paciente, comprensiva e impulsarme a ser mejor estudiante y mejor persona.

Gracias a la Dra. Norma Villa por introducirme y guiarme en un mundo antes desconocido para mí.

Agradezco a la Dra. Amparo Gil Gómez por darme la oportunidad de realizar una estancia de investigación con ella en la Universidad de Cantabria, gracias por su guía, apoyo y por brindarme su tiempo y conocimientos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca de maestría y la beca de movilidad mixta, así como a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco por la beca otorgada para participar en eventos de difusión.

Y, por último, a mis compañeros y amigos de la maestría, muchas gracias por tantos momentos y por todo su apoyo.

RESUMEN

Las células ciliadas internas son las células sensoriales del oído de mamíferos ubicadas en la cóclea, responsables de traducir los sonidos en señales neuronales. Estas células poseen estereocilios en su parte superior los cuales son desplazados por la presión producida por un sonido. Este desplazamiento despolariza a estas células y activa los canales de Ca^{2+} ubicados en las zonas activas de la membrana plasmática de la célula. La entrada de iones Ca^{2+} desencadena la fusión de las vesículas sinápticas rápidas y, por ende, la liberación del glutamato en las terminales aferentes.

La liberación del glutamato es un paso fundamental en la decodificación de la información de los estímulos acústicos en la vía auditiva. Los protocolos experimentales actuales no proporcionan la resolución temporal adecuada para la observación de la exocitosis de vesículas rápidas, ya que no es posible aplicar estímulos muy cortos –por debajo de los milisegundos– y al mismo tiempo registrar la respuesta celular durante y en momentos definidos después de la estimulación.

Con el fin de simular la secreción de las vesículas rápidas de las células ciliadas internas –a escalas de tiempo del orden de milisegundos- en respuesta a estímulos de diferentes duraciones y amplitudes, y de estudiar la influencia de micro y nanodominios de Ca^{2+} ; en este trabajo se propone un modelo de zona activa resuelto con un algoritmo Monte Carlo.

Por algoritmo Monte Carlo se entiende un esquema computacional de resolución de un determinado problema que hace uso de variables generadas aleatoriamente (de acuerdo a determinadas distribuciones de probabilidad) para su resolución aproximada. Éste, por ejemplo, es el caso del algoritmo que simula los mecanismos de reacción-difusión que tienen lugar en la zona activa. Para ello se desarrollaron modelos para la difusión amortiguada de iones Ca^{2+} , esquemas de unión de iones Ca^{2+} para la fusión de vesículas y para los canales de Ca^{2+} $\text{Cav}1.3$ tipo L. Se simula la activación del sensor otoferlina, ubicado en las vesículas sinápticas y se estudia su influencia en la secreción de glutamato. Con el modelo propuesto es posible simular mutaciones en la otoferlina, así como alteraciones en la endocitosis o en la concentración de glutamato, las cuales se asocian con diferentes tipos de pérdidas auditivas.

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Motivación	3
1.2 Marco teórico	5
1.2.1 Sordera	5
1.2.2 Células ciliadas internas	6
1.2.3 Exocitosis sináptica	8
1.2.4 Sensor de Ca^{2+}	11
1.2.5 Canal de Ca^{2+} tipo L	12
1.3 Antecedentes	13
1.4 Justificación	15
1.5 Hipótesis	15
1.6 Objetivos	16
2. MODELADO MATEMÁTICO	17
2.1 Modelo del dominio de la zona activa	18
2.2 Modelo del canal de Ca^{2+}	20
2.3 Modelo de difusión de Ca^{2+}	24
2.5 Modelo de secreción	26
3. SIMULACIONES	31
3.1 Simulaciones de corriente de Ca^{2+}	32
3.2 Dinámicas de secreción	36
3.3 Predicciones de secreción: micro y nanodominios de Ca^{2+}	42
4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	46
REFERENCIAS	48
ANEXOS	54
Trabajos derivados de esta tesis	54
Glosario	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Clasificación de SNHL basada en la fisiología.	5
Figura 2. El oído y las diferentes estructuras involucradas en el procesamiento del sonido.	7
Figura 3. Nanodominio y microdominio de Ca^{2+} .	9
Figura 4. Diagrama de flujo del código principal.	13
Figura 5. Modelo geométrico de la zona activa.	15
Figura 6. Modelo de Markov de tres estados para un canal de Ca^{2+} tipo L de una IHC.	16
Figura 7. Diagrama de flujo del algoritmo del canal de Ca^{2+} .	23
Figura 8. Modelo cinético de la otoferlina en IHC.	26
Figura 9. Diagrama de flujo del algoritmo del modelo de secreción.	29
Figura 10. Estimación de la velocidad de transición α .	33
Figura 11. Porcentaje de canales de Ca^{2+} inactivos, abiertos y cerrados en una zona activa de una IHC.	34
Figura 12. Ejemplo de corrientes de despolarización en canales de Ca^{2+} tipo L.	35
Figura 13. Relación Intensidad-voltaje del modelo para el canal de Ca^{2+} tipo L en una IHC.	35
Figura 14. Dinámicas de Ca^{2+} y secreción en respuesta a pulsos de diferentes intensidades, con duración fija de 50 ms.	37
Figura 15. Dinámicas de Ca^{2+} y secreción para pulsos despolarizantes con amplitud de 65 mV en respuesta a diferentes duraciones.	38
Figura 16. Dependencia de Ca^{2+} en la exocitosis en IHC.	39
Figura 17. Relación secreción acumulada-voltaje empleando distintos porcentajes de vesículas.	40
Figura 18. Efecto de la otoferlina en la secreción.	42
Figura 19. Distribución de canales de Ca^{2+} y vesículas en la zona activa.	43
Figura 20. Relación Secreción acumulada-Tiempo para un voltaje de membrana de -15 mV para dos configuraciones espaciales.	44
Figura 21. Relación Secreción acumulada-voltaje para dos configuraciones espaciales.	45
Tabla 1. Parámetros empleados en las simulaciones de secreción	30

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Motivación

A través del sentido del oído se obtiene información de la presencia, ubicación y relevancia de los sonidos en el entorno. Según la Organización Mundial de la Salud actualmente 466 millones de personas en todo el mundo padecen pérdida de audición discapacitante, de las cuales 34 millones son niños (OMS, 2019).

Para que el cerebro pueda descifrar entre una amplia gama de sonidos, la información de los estímulos acústicos debe ser preservada a lo largo de la vía auditiva, desde la detección inicial del sonido en las células ciliadas internas (IHC, por sus siglas en inglés) ubicadas en la cóclea, hasta su interpretación en el cerebro (Yu y Goodrich, 2014).

Existen diferentes modelos computacionales que simulan la codificación del sonido en diferentes etapas de la vía auditiva, a partir de mediciones fisiológicas en especies animales, principalmente en roedores (Wittig y Parsons, 2008; Gil y González-Vélez, 2010; Zilany et al., 2014). Un modelo global de las primeras etapas de la vía auditiva debería contener tres etapas principales: 1) un modelo del comportamiento del oído externo y medio, 2) la etapa

que modela la exocitosis del neurotransmisor glutamato controlada por Ca^{2+} en las IHCs, y 3) la etapa que modela la tasa de disparo por parte del nervio auditivo. Todas estas etapas son necesarias para entender principalmente cómo se generan las formas de onda de los potenciales evocados auditivos de tallo cerebral, utilizados para determinar objetivamente los umbrales de audición humana en estudios clínicos (Rønnet al., 2012).

El procesamiento del sonido en el sistema auditivo se caracteriza por una precisión temporal extrema y multiescala –entre milisegundos y segundos- la cual es fundamental para la audición de sonidos de múltiples frecuencias e intensidades. Actualmente las técnicas experimentales no permiten estimular y medir respuestas de las IHCs a una escala temporal de milisegundos, escala a la cual se lleva a cabo la fase rápida de la exocitosis; por lo que el algoritmo desarrollado en el presente trabajo, mediante el uso de herramientas de cinética enzimática, de fenómenos del transporte, métodos matemáticos y computacionales, permite simular el cómo se lleva a cabo éste proceso biológico de gran importancia para el ser humano.

1.2 Marco teórico

1.2.1 Sordera

La sordera o hipoacusia es un término que designa la disminución de la audición y se clasifica en:

- Pérdida auditiva conductiva (CHL, por sus siglas en inglés): provocada por una transmisión deficiente de las ondas de sonido a través del oído externo al oído medio (Takesian et al., 2004).
- Pérdida auditiva neurosensorial (SNHL, por sus siglas en inglés): patologías del nervio auditivo y del oído interno, específicamente en las células ciliadas (Figura 1).



Figura 1. Clasificación de SNHL basada en la fisiología. Las sinaptopatías auditivas de las células ciliadas externas (OHC, por sus siglas en inglés) interrumpen la amplificación coclear; las sinaptopatías auditivas de las IHCs interrumpen la codificación sináptica del sonido y las sinaptopatías auditivas de neuronas (SGN, por sus siglas en inglés) interrumpen la codificación y/o conducción de la información auditiva (Moser et al., 2013).

Estas patologías, denominadas sinaptopatías auditivas provocan un deterioro gradual de la audición, vértigo y en algunos casos parálisis facial y acufenos; pueden tener un origen

congénito o ser causadas por factores ambientales incluyendo infecciones virales, sobreestimulación sonora, medicamentos ototóxicos o envejecimiento. La mayoría de las formas de SNHL son irreversibles y son tratados con audífonos o prótesis cocleares, pero la capacidad de estas prótesis para restablecer la función auditiva depende entre otras cosas de la edad de implantación (Kenna, 2004; Takesian et al., 2009).

1.2.2 Células ciliadas internas

Las IHCs -células sensoriales del oído- ubicadas en la membrana basilar en la cóclea, constituyen la etapa presináptica de la primera sinapsis del trayecto auditivo (Figura 2), donde se lleva a cabo el control de la secreción del neurotransmisor glutamato, el cual es fundamental en la decodificación de la información de los estímulos acústicos (Nicolson, 2012) y la deficiencia en el funcionamiento de la otoferlina -sensor de Ca^{2+} de las vesículas secretoras de las IHCs- está relacionado con la hipoacusia genética (Roux et al., 2006; Seal et al., 2008; Moser et al., 2013). El estímulo de las IHCs proviene de la transducción del sonido en cambios en el potencial de membrana de estas células, lo cual estimula la liberación de glutamato proveniente de las vesículas secretoras. Esto es controlado por la activación graduada de los canales de Ca^{2+} $\text{Ca}_v1.3$ tipo L (Spasova, 2001; Brandt et al., 2005) ubicados muy cerca de las vesículas adosadas en la membrana plasmática, en la región denominada zona activa.

Una zona activa representa el área donde se secreta el neurotransmisor y la célula está conectada con una terminación aferente. Una IHC presenta en promedio de 10 a 30 zonas activas (Zampini et al., 2010), y cada zona activa tiene aproximadamente 90 canales de Ca^{2+} y 32 vesículas adosadas a la membrana plasmática (Brandt et al., 2005) responsables de la fase rápida de la excitación (Mennerick y Matthews, 1996).

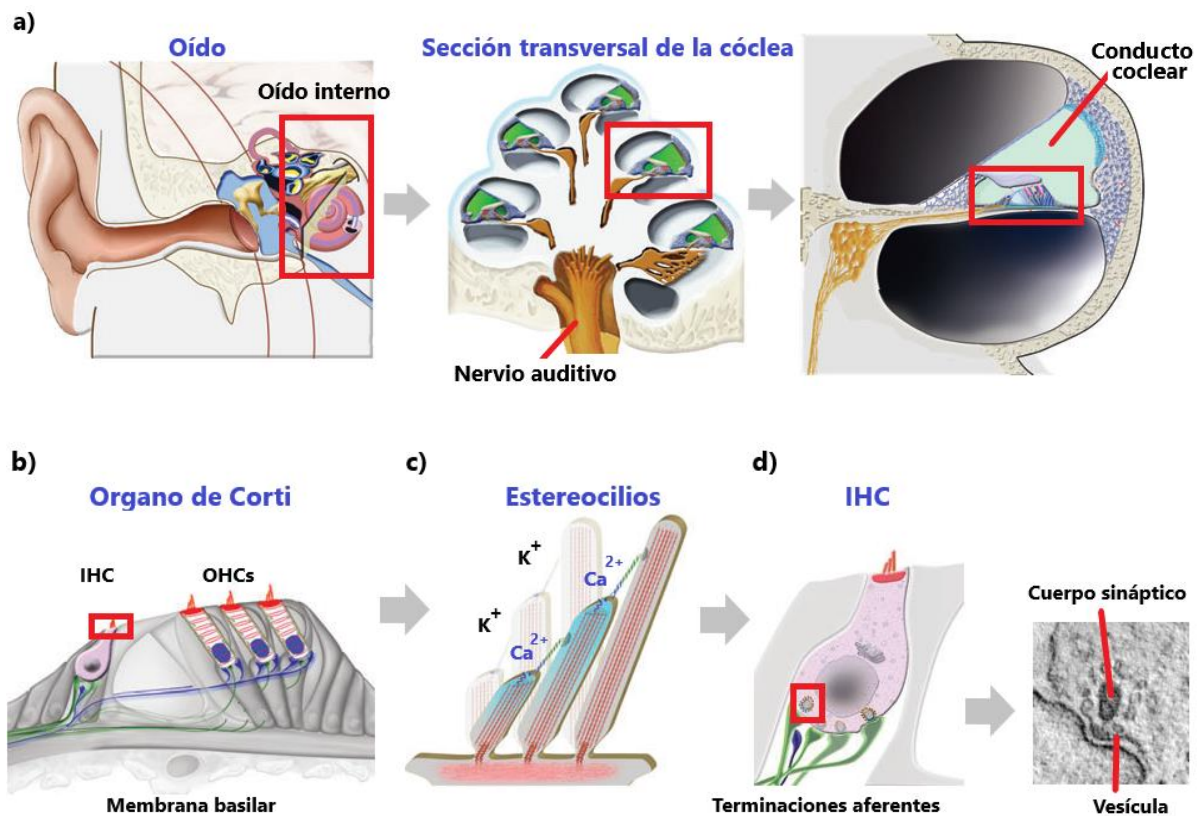


Figura 2. El oído y las diferentes estructuras involucradas en el procesamiento del sonido (Adaptado de Safieddine et al., 2012).

(a) El oído está compuesto por el oído externo y medio que garantizan el paso de ondas sonoras al oído interno específicamente a la cóclea, encargada de transformar el estímulo sonoro en un mensaje nervioso.

(b) Las células sensoriales del órgano de Corti: células ciliadas externas (OHCs, por sus siglas en inglés) que amplifican el sonido y células ciliadas internas (IHCs).

(c) Los estereocilios de la IHC son el lugar de la transducción mecano-eléctrica: el desplazamiento de estos hacia la estría vascular abre los canales catiónicos permitiendo la entrada del potasio (K^+) proveniente de la endolinfa, lo que ocasiona la despolarización de la IHC, y la subsecuente apertura de los canales de Ca^{2+} .

(d) Cada zona activa en la IHC está conectada con una terminación aferente y presenta un cuerpo sináptico cubierto por una monocapa de vesículas sinápticas. La unión de iones Ca^{2+} a la otoferlina produce la fusión de las vesículas sinápticas. Cada vesícula sináptica almacena un cuanto de glutamato y libera su contenido en un sitio especializado en la membrana plasmática en la zona activa, de una manera todo o nada.

1.2.3 Exocitosis sináptica

Las vesículas sinápticas son organelos revestidos que contienen glutamato. A partir de un potencial de acción en la IHC se induce la apertura de los canales de Ca^{2+} , esto aumenta los niveles de Ca^{2+} intracelular y activa la exocitosis de las vesículas sinápticas que liberan el glutamato hacia la hendidura sináptica. Luego de la exocitosis, la membrana de la vesícula sináptica se integra con la membrana plasmática y ocurre un proceso de reciclado.

Las vesículas de fase rápida (RRP "*Ready Releasable Pool*") se definen funcionalmente como un pequeño grupo de vesículas adosadas a la membrana plasmática debajo del cuerpo sináptico –zona activa- que se liberan más fácil y rápidamente que otras vesículas; en ratón, éstas vesículas presentan constantes de tiempo de agotamiento de 10 ms. La eficiencia con la que un potencial de acción evoca la liberación del neurotransmisor depende del tamaño del RRP, de la probabilidad inicial de liberación de cada vesícula y de la cantidad de iones Ca^{2+} cerca de ella, además de otros factores adicionales que regulan las respuestas sinápticas. Al agotarse las vesículas de fase rápida, éstas se reponen a partir de un grupo de vesículas de reserva, y esta reposición es vital para sostener las respuestas sinápticas ante estímulos persistentes (Nouvian et al., 2006; Safieddine et al., 2012; Kaeser y Regehr, 2017).

Kaeser y Regehr, (2017) proponen que la activación del sitio de liberación limita la velocidad para generar nuevas vesículas RRP, ya que, al liberarse de inmediato las vesículas adosadas en los sitios activados, las vesículas de reserva pueden reclutarse rápidamente a los sitios activados desocupados para contribuir al RRP. La activación e inactivación de los sitios de liberación y el reclutamiento de vesículas en estos sitios permite cambios dinámicos en el RRP, ya que se ha observado que el RRP y el acoplamiento de vesículas no son estáticos. En el presente trabajo, se simula la exocitosis de las vesículas RRP y no se modela el proceso de endocitosis ni del movimiento de las vesículas de reserva.

La distribución y espaciamiento de los canales de Ca^{2+} y las vesículas sinápticas rápidas en una zona activa de una IHC y cómo afecta esto la transmisión del sonido son desconocidos, pero se ha propuesto que la liberación de glutamato está controlada ya sea por un nanodominio de Ca^{2+} formado por la activación de uno o muy pocos canales de Ca^{2+} (Brandt et al., 2005), o bien, por un microdominio de Ca^{2+} producido por la cooperación de muchos canales donde se promedian las propiedades de un solo canal (Roberts, 1994) (Figura 3). En general, los nanodominios han sido propuestos para explicar la respuesta rápida en neuronas de sistema nervioso central donde canales y vesículas están muy cercanos, y los microdominios se han asociado a respuestas sinápticas de latencia corta y larga para estímulos de diferentes frecuencias (Oheim et al., 2006).

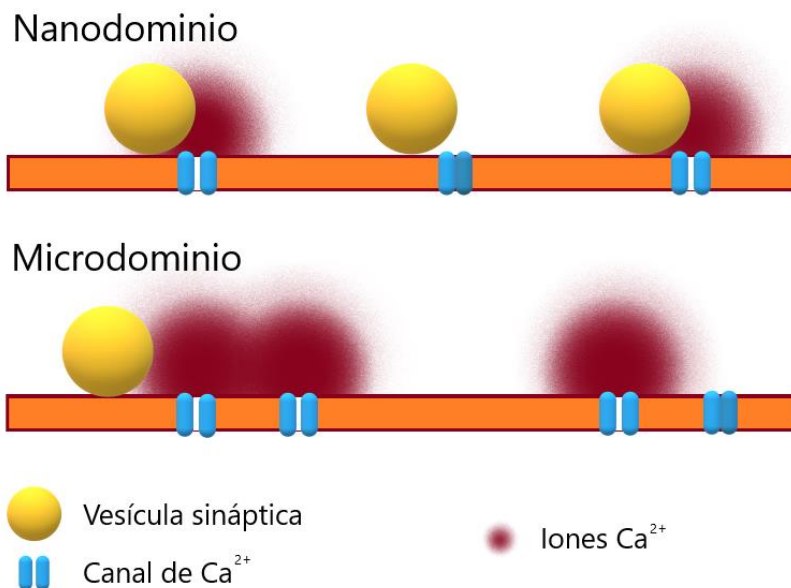


Figura 3. Nanodominio y microdominio de Ca^{2+} . Los nanodominios han sido propuestos para explicar la respuesta rápida en neuronas de sistema nervioso central donde canales y vesículas están muy cercanos, y los microdominios se han asociado a respuestas sinápticas de latencia corta y larga para estímulos de diferentes frecuencias.

Microdominio de Ca^{2+}

Roberts, (1994) sugiere que decenas de canales de Ca^{2+} cooperan para imponer un microdominio de Ca^{2+} en los sitios de liberación de vesículas sinápticas en cada zona activa. Aquí, la distancia promedio entre las vesículas y los canales de Ca^{2+} es de aproximadamente del diámetro de una vesícula.

Nanodominio de Ca^{2+}

Se sugiere en (Brandt et al., 2005) que la exocitosis está bajo control de nanodominios de Ca^{2+} durante la codificación del sonido, es decir, las vesículas adosadas en la membrana están localizadas a pocos nanómetros de los canales presinápticos de Ca^{2+} . Este fenómeno se puede observar como una dependencia no lineal del voltaje de membrana y la corriente de Ca^{2+} . Esto se sugiere debido a estudios previos en IHCs (Beutner et al., 2001; Brandt et al., 2005) que han demostrado que:

- La apertura de unos pocos canales de Ca^{2+} son suficientes para la exocitosis de una vesícula.
- Se tiene inicialmente un aumento lineal en la exocitosis bajo concentraciones de Ca^{2+} bajas (micromolar).
- Mayores corrientes de Ca^{2+} provocan la saturación de la exocitosis debido al agotamiento de las vesículas adosadas, o bien, a que el Ca^{2+} en los sitios de liberación ya han conducido la exocitosis a la máxima velocidad, de modo que un aumento de Ca^{2+} no causaría un cambio importante en ella.

1.2.4 Sensor de Ca²⁺

Cerca de 20 proteínas han sido identificadas como componentes en la sinapsis de IHCs, de las cuales Myosina VI, Basson, VGLUT3, Sinaptotagmina 4 y otoferlina han demostrado tener roles esenciales en la exocitosis sináptica (Safieddine et al., 2012). Sin embargo, la otoferlina -proteína de membrana que se une a iones Ca²⁺ con seis dominios C₂ (C₂A-F) y dos dominios Fer- ha sido propuesta como el sensor de Ca²⁺ en las vesículas sinápticas en IHCs, con base en:

- La otoferlina está asociada a las vesículas sinápticas y se ha detectado a lo largo de la membrana plasmática presináptica y del citosol en la IHC (Seal et al., 2008).
- En presencia del complejo SNARE (*“Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor”*), la otoferlina promueve la fusión dependiente de Ca²⁺ en ensayos *in vitro* con la unión de Ca²⁺ en cinco de sus seis dominios (Johnson y Chapman, 2010).
- La otoferlina interactúa directamente con las proteínas del complejo SNARE dependiente de Ca²⁺, encargadas de ensamblar la maquinaria molecular que desencadena la exocitosis (Roux et al., 2006; Johnson y Chapman, 2010).
- La otoferlina se une a los canales Ca_v1.3 (Ramakrishnan et al., 2009).
- Otros miembros de la familia ferlina (FER-1 en *C. elegans*, mioferlina y disferlina en humanos y ratones) al presentar anomalías, afectan la exocitosis (Seal et al., 2008).
- Estudios en IHCs de ratones mutados en el dominio C₂F (Pachanga Otof^{F_{ga}/P_{ga}}) (Pangrsic et al., 2010) y en el dominio C₂C (Otof^{F_{C2C}/C_{2C}}) (Michalski et al., 2017) de la otoferlina, mostraron depresión de la exocitosis y una menor sensibilidad al Ca²⁺.

1.2.5 Canal de Ca²⁺ tipo L

La entrada de iones Ca²⁺ en las IHCs es causada por la apertura de canales de Ca²⁺ tipo L Ca_v1.3, los cuales representan la mayoría de canales de Ca²⁺ expresados en IHCs en mamíferos. Estos canales consisten en subunidades alfa Ca_v1.3 sensibles a la dihidropiridina, tienen un rango de activación a un voltaje de -20 mV aproximadamente (Brandt et al., 2005), y están ubicados en la membrana plasmática debajo de los cuerpos sinápticos. Los canales de Ca²⁺ tipo L se activan rápidamente por los cambios en el voltaje de la membrana y solo unos pocos permanecen inactivos, dos propiedades altamente propicias para la fase rápida de la exocitosis (Platzner et al., 2000; Spassova et al., 2001; Brandt et al., 2005; Zampini et al., 2010).

1.3 Antecedentes

Actualmente, la investigación de la sinapsis en IHCs ha tenido un mayor auge, por lo que se han empleado diversos métodos experimentales para evaluar su estructura y función en combinación con la manipulación genética y el uso de fármacos durante la sinapsis. A la par, se ha hecho uso de herramientas computacionales y matemáticas para obtener modelos que simulen el comportamiento de éstas células.

Entre los protocolos experimentales usados en el estudio de la sinapsis en IHCs están:

- Inmunohistoquímica y microscopía de alta resolución, junto con análisis de RNA y de proteínas para obtener la composición molecular de las vesículas sinápticas (Moser et al., 2015).
- Tomografía electrónica de diferentes estados funcionales de la IHC, seguida de una fractura por congelación y la subsiguiente microscopía electrónica, esto para el estudio de la sinapsis (Roberts et al., 1990; Lenzi et al., 1999).
- Técnica de Patch-Clamp empleada para medir la corriente de iones Ca^{2+} y la capacitancia de la membrana celular, con el fin de estudiar la exocitosis de fase rápida (Brandt et al., 2005).
- Inmunotinción y análisis de microscopía confocal para investigar la distribución de los canales de Ca^{2+} en una zona activa (Brandt et al., 2005).
- Estudio en IHCs de ratones mutantes defectuosos para proteínas sinápticas y modelos en ratón de la sordera humana (Pangrsic et al., 2010; Michalski et al., 2017).

Se ha avanzado mucho en la disección de la anatomía y la fisiología de la sinapsis en estas células gracias a técnicas de Patch-Clamp, imágenes funcionales de alta resolución, microscopía de luz de superresolución y tomografías de electrones después de la congelación a alta presión de las IHCs. Sin embargo, estas técnicas no proporcionan la

resolución temporal adecuada para la observación de la exocitosis en vesículas RRP, ya que no es posible aplicar estímulos muy cortos (milisegundos) e investigar a las células durante y en momentos definidos después de la estimulación. Por lo tanto, se necesitan enfoques que cumplan dos requisitos: un protocolo de estimulación preciso combinado con la inmovilización rápida de la muestra, por ejemplo, mediante congelación a alta presión (Moser et al., 2015).

Es aquí, donde entra el modelado y simulación de la sinapsis apoyada en las observaciones experimentales. El método Monte Carlo se ha utilizado para modelar y simular con mayor precisión que los métodos determinísticos la exocitosis en diversas sinapsis, por ejemplo:

- La exocitosis controlada por Ca^{2+} en una zona activa del cáliz de Held (Gil y González-Vélez, 2010), que es otro relevo sináptico clave en el trayecto auditivo.
- La exocitosis controlada por Ca^{2+} en un modelo de IHC completa (Bortolozzia et al., 2008) y en una zona activa (Wittig y Parsons, 2008).
- Las dinámicas de Ca^{2+} involucradas en la secreción del neurotransmisor en una zona activa en terminaciones nerviosas (Gibson et al., 2001; Glavinović y Rabie, 2001; Shahrezaei et al., 2006).

El método Monte Carlo es un método matemático estocástico basado en el muestreo repetitivo para calcular los resultados. Éste método, por ejemplo, se emplea para obtener la solución mediante el uso de números aleatorios en modelos de fenómenos con incertidumbre en los datos de entrada o para resolver modelos microscópicos donde las principales variables son iones o moléculas con movimientos aleatorios, como en nuestro caso. Es un método adecuado para simulaciones con escalas temporales cortas y de alta resolución espacial; sin embargo, requiere mucho tiempo de cómputo (González-Vélez, 2011).

1.4 Justificación

Los defectos en o la pérdida de las células ciliadas internas, así como las alteraciones en su sinapsis ocasionan el deterioro gradual de la audición, acufenos y disminución en la calidad de vida.

Debido a la complejidad de realizar experimentos *in vivo* e *in vitro* para estudiar la sinapsis en las células ciliadas internas y debido a sus tiempos cortos de respuesta, el utilizar herramientas de modelado y simulación estocástica para desarrollar un modelo de zona activa es una opción adecuada para entender los procesos bioquímicos relacionados con estos padecimientos.

1.5 Hipótesis

La distribución espacial de los canales de Ca^{2+} y las vesículas sinápticas adosadas a la membrana plasmática en las células ciliadas internas afecta la dinámica de secreción del glutamato, lo que tiene repercusiones en la transmisión de la información auditiva. Esto puede estudiarse usando un modelo de nanodominios o microdominios de Ca^{2+} .

1.6 Objetivos

Objetivo general

Desarrollar un modelo computacional que permita estudiar la secreción de las células ciliadas internas en función de la distribución espacial de los canales de Ca^{2+} y las vesículas rápidas.

Objetivos particulares

1. Definir un modelo geométrico de una zona activa de la IHC.
2. Desarrollar un algoritmo estocástico que permita estudiar la dinámica de secreción del glutamato.

CAPÍTULO 2

MODELADO MATEMÁTICO

Para la presente tesis, se adaptó el código que implementa el algoritmo Monte Carlo desarrollado por (Gil y González-Vélez, 2010) mostrado en la Figura 4.

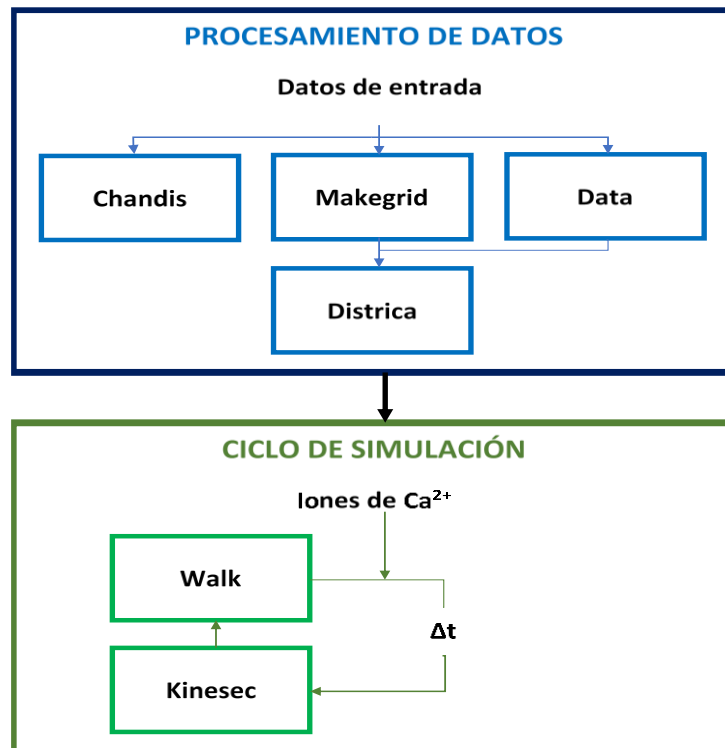


Figura 4. Diagrama de flujo del código principal. Se muestran las rutinas principales que distribuyen a los canales y las vesículas en el dominio, y que calculan las cinéticas.

A continuación, se describen las rutinas que conforman dicho código:

- **Datos de entrada:** se define el tiempo de simulación, la altura y radio del dominio cilíndrico, el número de vesículas sinápticas y canales de Ca^{2+} , el voltaje de despolarización y las propiedades cinéticas de los buffers y de la cinética de exocitosis.
- **Data:** transforma los datos de entrada a cantidades microscópicas utilizadas en la simulación y establece las condiciones iniciales
- **Makegrid:** realiza la discretización del dominio de la zona activa.
- **Chandis:** genera una distribución aleatoria de los canales de Ca^{2+} y de las vesículas sinápticas.
- **Corre:** acopla las vesículas sinápticas con los canales de Ca^{2+} .
- **Districa:** distribuye los iones Ca^{2+} y las moléculas del buffer en la primera capa del dominio.
- **Walk:** implementa el algoritmo Random-Walk en 3D para la difusión de las partículas en cada compartimento del dominio.
- **Kinesec:** implementa las reacciones cinéticas de los buffers y de la otoferlina en cada compartimento del dominio.

2.1 Modelo del dominio de la zona activa

Se modeló la zona activa como un dominio cilíndrico, tal como se propone en (Gil y Segura, 2000) para terminales sinápticas. Este dominio tiene un radio de $0.178 \mu\text{m}$, como se reporta en (Roberts et al., 1990) para una zona activa y una altura de $0.4 \mu\text{m}$, correspondiente al diámetro de una vesícula sináptica (Lenzi et al., 1999). El dominio está discretizado en compartimientos cúbicos de lado Δx , en los cuales los iones Ca^{2+} se pueden o no ligar a una molécula del buffer endógeno y exógeno siguiendo una cinética tipo enzimática, y se difunden de un compartimento a otro. Así mismo, en la primera fila de compartimentos se

localizan las vesículas con su sensor otoferlina, el cual puede o no activarse por la presencia de iones Ca^{2+} (Figura 5). Estos procesos reactivo-difusivos se resuelven usando el método Monte Carlo, por lo cual se hace un seguimiento individual de cada partícula (ion Ca^{2+} , canal, vesícula) presente en el dominio, lo que permite conocer los eventos discretos de secreción en cada paso de tiempo (Δt).

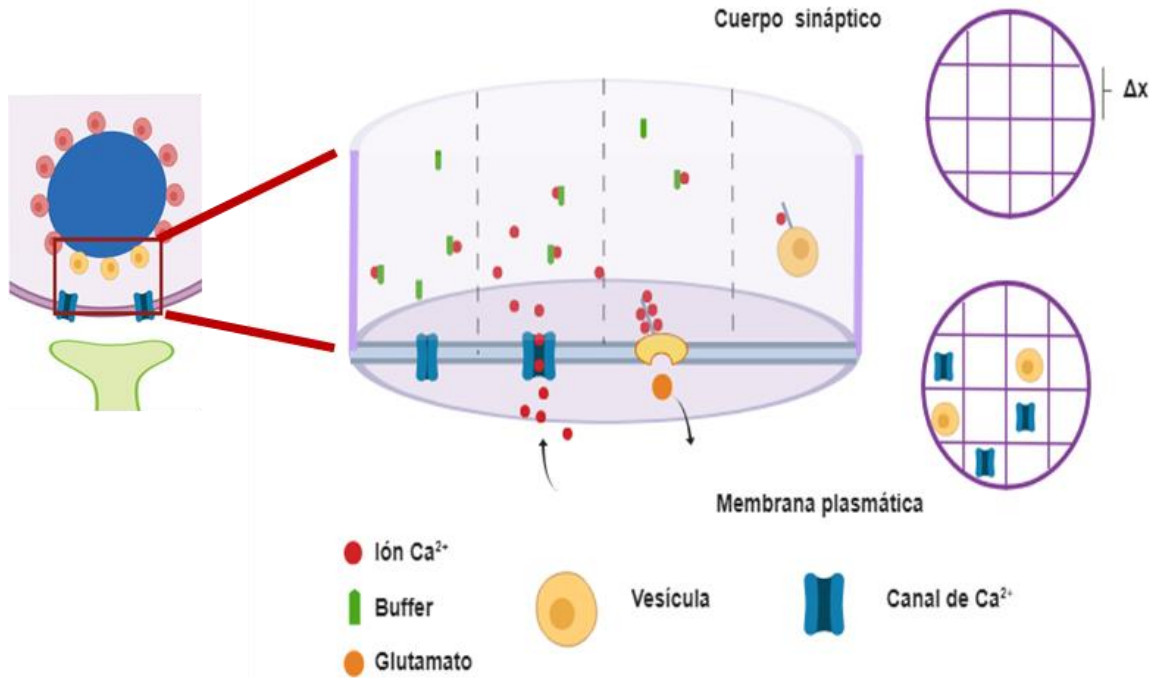


Figura 5. Modelo geométrico de la zona activa. Dentro del dominio de la zona activa se incluyen modelos para la difusión de iones Ca^{2+} , esquemas de unión cooperativo de iones Ca^{2+} para la fusión de las vesículas y un modelo para los canales de Ca^{2+} tipo L.

Los principales elementos involucrados en la exocitosis rápida de glutamato en las IHCs son los canales de Ca^{2+} y las vesículas RRP. Estos elementos son representados en el modelo como elementos puntuales ubicados en la primera capa del dominio, la cual representa la membrana celular y son distribuidos aleatoriamente. Se asume que cada vesícula sináptica almacena un quanta de glutamato (Del Castillo y Katz, 1954).

2.2 Modelo del Canal de Ca^{2+}

El comportamiento de la corriente de muchos canales del mismo tipo se puede aproximar mediante una expresión matemática que incluya una conductancia promedio de cada canal y el número de canales activos. Al sumar la corriente unitaria de muchos canales del mismo tipo, se obtiene la corriente de células completas en el caso, de que sean los únicos canales presentes en la célula (Ochi, 1993). Por otro lado, las propiedades cinéticas de un canal iónico se pueden representar de forma estocástica mediante un modelo de tipo Markov; éste modelo se define en términos de las probabilidades de transición entre los estados que lo componen y supone que el estado presente está en función sólo del estado anterior inmediato (Ávila-Pozos et al., 2006).

Se propone para los canales de Ca^{2+} tipo L un modelo tipo Markov de tres estados: abierto, cerrado e inactivo (Figura 6), siendo el estado abierto el único estado conductor, por lo tanto, la probabilidad de apertura se calcula en función del número de canales que alcanzan este estado. El modelo incluye los dos casos de inactivación que presentan este tipo de canales: la inactivación dependiente de voltaje y la inactivación dependiente de Ca^{2+} (Zamponi, 2005).

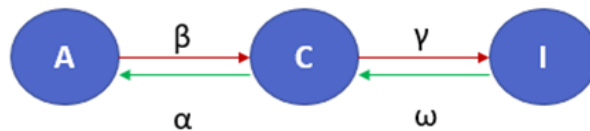


Figura 6. Modelo de Markov de tres estados para un canal de Ca^{2+} tipo L de una IHC. Estados: abierto (A), cerrado (C) e inactivo (I). Velocidades de transición dependientes del tiempo: α , β , γ y ω .

El sistema de ecuaciones diferenciales que describen la evolución en el tiempo de la probabilidad de que un canal se encuentre en un estado particular son:

$$\frac{dP_A}{dt} = \alpha P_C - \beta P_A \quad [2.1]$$

$$\frac{dP_C}{dt} = (\beta P_A + \omega P_I) - (\alpha + \gamma) P_C \quad [2.2]$$

$$\frac{dP_I}{dt} = \gamma P_C - \omega P_I \quad [2.3]$$

La solución en estado estacionario proporciona la probabilidad de que cada uno de los canales pueda estar en uno de los tres estados P_A , P_C o P_I . Estas ecuaciones se expresan en términos de las velocidades de transición:

$$P_X = \alpha\omega + \gamma\beta + \beta\omega \quad [2.4]$$

$$P_A = \frac{\alpha\omega}{P_X} \quad [2.5]$$

$$P_C = \frac{\beta\omega}{P_X} \quad [2.6]$$

$$P_I = 1 - (P_C + P_A) \quad [2.7]$$

$$P_A + P_C + P_I = 1 \quad [2.8]$$

Es importante notar que: α y β son la activación e inactivación dependientes de voltaje, γ representa la inactivación dependiente de la concentración de Ca^{2+} y ω representa la recuperación de la inactivación de Ca^{2+} .

$$\alpha = 0.7161 \exp [0.1183 (V_m - 32)] \quad [2.9]$$

$$\beta = 0.000364 \exp [- 0.0385 (V_m - 32)] \quad [2.10]$$

$$\gamma = 2.4798 [Ca_i / Ca_o] \quad [2.11]$$

$$\omega = 0.302 \quad [2.12]$$

donde V_m es el potencial de membrana específico de la IHC, Ca_i es la concentración de calcio presente dentro del dominio y Ca_o la concentración de calcio externa.

La estimación de la corriente unitaria de los canales de Ca^{2+} tipo L así como la estimación de las velocidades de transición se realizó utilizando un algoritmo Monte Carlo que busca el conjunto de parámetros que se ajusten con un error mínimo a una curva Corriente-Voltaje (curva IV) experimental obtenida en IHCs de ratón (Brandt et al., 2005). Se tomó como valores de inicio las velocidades de transición y la corriente unitaria reportadas en (González-Vélez, 2011) para canales de Ca^{2+} tipo L en Cáliz de Held.

El algoritmo desarrollado (Figura 7) sigue la siguiente secuencia:

- 1) Calcula el número de ensayos en función del número de parámetros a determinar.
- 2) Se usan pulsos despolarizantes como entrada del algoritmo (V_m).
- 1) Se ajusta el modelo y se cambian los parámetros a determinar (corriente unitaria y velocidades de transición) partiendo de los valores iniciales.
- 2) Se estima el número de canales abiertos para cada Δt [Ecuaciones 2.1-2.3]. Se supone que todos los canales están cerrados como condición inicial.
- 3) La corriente total se calcula multiplicando la corriente unitaria por la población de canales abiertos para cada Δt . Se genera la curva Corriente-Tiempo.
- 4) Se obtiene la máxima corriente para cada voltaje y se genera la curva IV.
- 5) Mediante el método de mínimos cuadrados [Ecuación 2.13], se comparan las corrientes máximas simuladas con las experimentales (Brandt et al., 2005) y se da el conjunto de parámetros que generan el error mínimo.

$$error = \sum_i^n [I_{exp}(V_m) - I_i(V_m)]^2 \quad [2.13]$$

donde V_m es el potencial de membrana específico de la IHC, I_{exp} es la corriente de Ca^{2+} obtenida en estudios experimentales, I_i es la corriente obtenida en la simulación.

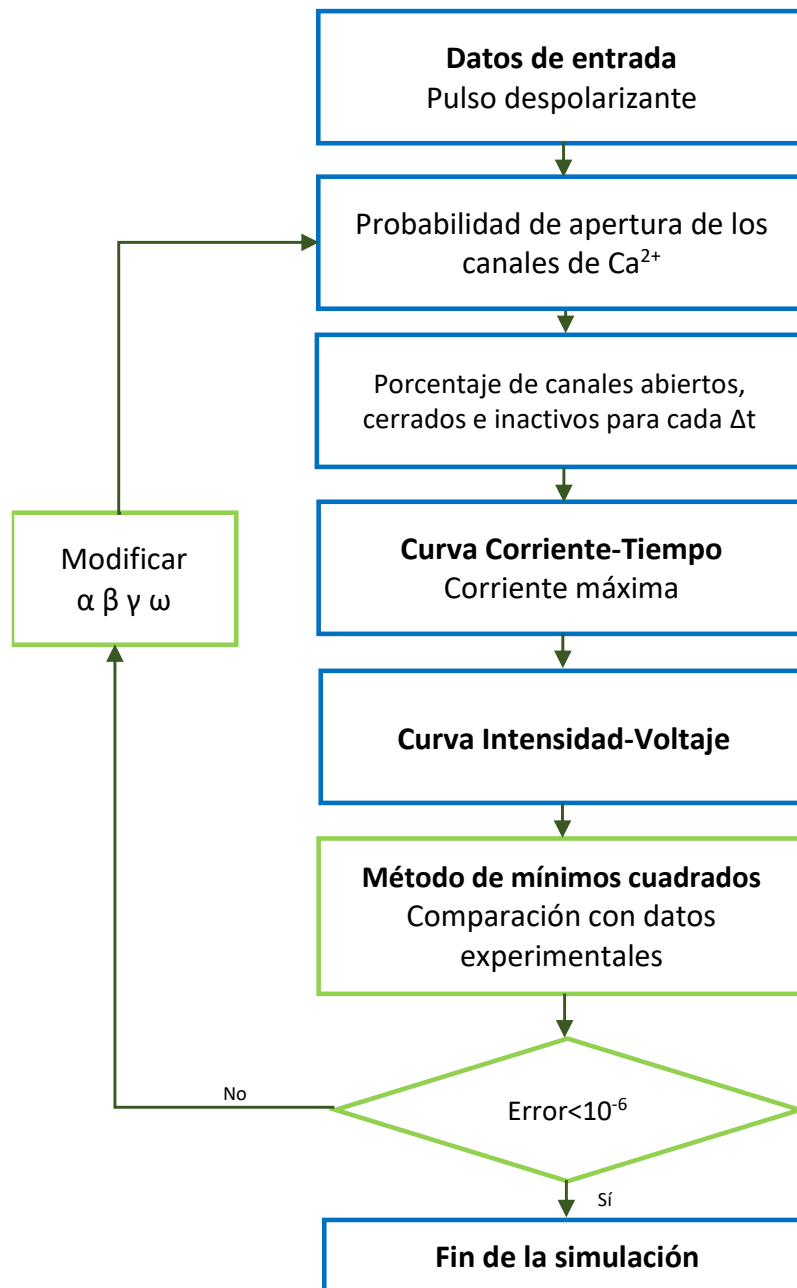


Figura 7. Diagrama de flujo del algoritmo del canal de Ca^{2+} .

2.3 Modelo de difusión de Ca^{2+}

En una célula, se sabe que gran cantidad de los iones Ca^{2+} que entran del exterior son amortiguados por proteínas específicas denominadas buffers de Ca^{2+} , por lo que el proceso difusivo de este ion al interior celular debe modelarse como una difusión amortiguada (Sala y Hernández-Cruz, 1990). En este trabajo se considera que los iones Ca^{2+} y las moléculas del buffer se mueven de un compartimiento a otro por acción de la difusión. El algoritmo Random-Walk 3D empleado, es el previamente reportado en (Gil y Segura, 2000), el cual define una relación entre la resolución temporal Δt y la discretización espacial Δx , dada por:

$$\Delta t = \frac{(\Delta x)^2}{4D_{Ca}} \quad [2.14]$$

donde D_{Ca} es el coeficiente de difusión de los iones Ca^{2+} en un medio como el interior celular (Allbritton et al., 1992). Esta relación implica que al reducir Δx , es decir al incrementar la resolución espacial de micras a nanómetros, por ejemplo, el paso de tiempo se incrementa de forma cuadrática y, por lo tanto, el trabajo computacional para resolver los modelos también se incrementa.

La parte de amortiguamiento del ion Ca^{2+} se modela como la probabilidad de unión de iones Ca^{2+} a:

- Buffer endógeno: para IHC se usa un modelo de la proteína Calbindina, reportada como una proteína intracelular afín al Ca^{2+} en (Wittig y Parsons, 2008).
- Buffer exógeno: se empleó el EGTA, que es un amortiguador exógeno empleado en protocolos experimentales para registrar la dinámica del calcio intracelular (Beutner et al., 2001).

El proceso reactivo de amortiguamiento se modela asumiendo que es una reacción cinética de primer orden:



donde B representa la molécula de buffer libre, BCa es la molécula de buffer unido a un ion Ca^{2+} , k_{on} y k_{off} son la velocidad de unión y desunión de la reacción respectivamente.

Al considerar dos buffers, el sistema de ecuaciones diferenciales que describen las reacciones cinéticas correspondientes, son:

$$\frac{d[Ca]}{dt} = \sum_i (k_{off}^i [B_i Ca] - k_{on}^i [B_i] [Ca]) \quad [2.16]$$

$$\sum_i \frac{d[B_i]}{dt} = \frac{d[Ca]}{dt} \quad [2.17]$$

$$\frac{d[B_i Ca]}{dt} = -\frac{d[B_i]}{dt} \quad [2.18]$$

donde $[Ca]$ es la concentración de Ca^{2+} libre al tiempo t , k_{on}^i y k_{off}^i son las velocidades de unión y desunión para el buffer i , y $[B_i]$ es la concentración del buffer i al tiempo t .

2.5 Modelo de secreción

Se modeló la exocitosis de las vesículas RRP, sin tomar en cuenta el reciclaje de las vesículas fusionadas. Se utilizó el modelo cinético propuesto en (Beutner et al., 2001) para el sensor otoferlina observado en IHCs de ratón (Figura 8). Es un modelo cooperativo y considera que con la unión de cinco iones Ca^{2+} a la otoferlina se procede a la fusión irreversible de la vesícula. Las transiciones entre estados son controladas por las velocidades γ , K_{on} y K_{off} , las cuales son la velocidad de fusión, de activación y de desactivación, respectivamente. Tanto K_{on} y K_{off} muestran cooperatividad, es decir, las velocidades aumentan conforme se lleva a cabo la unión de cada ion Ca^{2+} .

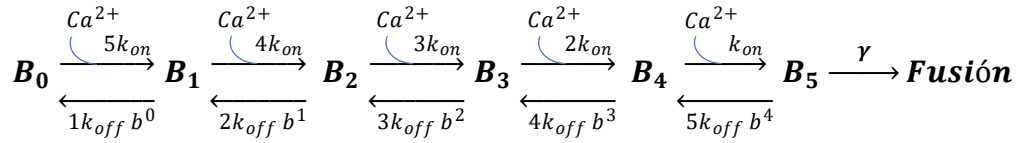


Figura 8. Modelo cinético de la otoferlina en IHC. Donde B_i son los estados de la vesícula con i iones Ca^{2+} , b es el factor de cooperatividad. γ , K_{on} y K_{off} , son la velocidad de fusión, de activación y de desactivación, respectivamente.

El sistema de ecuaciones diferenciales que describen la evolución en el tiempo de la probabilidad de que un ion Ca^{2+} se una a la otoferlina y posteriormente, ocurra la fusión de la vesícula es:

$$\frac{dP_{B_0}}{dt} = k_{off}P_{B_1} - 5k_{on}P_{B_0}Ca^{2+} \quad [2.19]$$

$$\frac{dP_{B_1}}{dt} = (5k_{on}P_{B_0}Ca^{2+} + 2k_{off}bP_{B_2}) - (k_{off}P_{B_1} + 4k_{on}P_{B_1}Ca^{2+}) \quad [2.20]$$

$$\frac{dP_{B_2}}{dt} = (4k_{on}P_{B_1}Ca^{2+} + 3k_{off}b^2P_{B_3}) - (2k_{off}bP_{B_2} + 3k_{on}P_{B_2}Ca^{2+}) \quad [2.21]$$

$$\frac{dP_{B_3}}{dt} = (3k_{on}P_{B_2}Ca^{2+} + 4k_{off}b^3P_{B_4}) - (3k_{off}b^2P_{B_3} + 2k_{on}P_{B_3}Ca^{2+}) \quad [2.22]$$

$$\frac{dP_{B_4}}{dt} = (2k_{on} P_{B_3} Ca^{2+} + 5k_{off} b^4 P_{B_5}) - (4k_{off} b^3 P_{B_4} + k_{on} P_{B_4} Ca^{2+}) \quad [2.23]$$

$$\frac{dP_{B_5}}{dt} = k_{on} P_{B_4} Ca^{2+} - (5k_{off} b^4 + \gamma) P_{B_5} \quad [2.24]$$

$$\frac{dP_{Fusión}}{dt} = \gamma P_{B_5} \quad [2.25]$$

El modelo cinético de la Figura 8 se resuelve usando un algoritmo Monte Carlo, dividido en dos etapas: 1) La unión de iones Ca^{2+} y 2) La fusión de la vesícula. En ambas etapas se empleó una matriz de probabilidad de transición Q , donde cada elemento de la matriz Q_{ij} (filas i , columnas j) representa la probabilidad de que la vesícula pase del estado j al i en cada paso de tiempo Δt y un vector de estados en transición P_B en la cual todos sus valores son cero excepto uno, que simboliza el estado actual de la vesícula, solo un estado es posible para cada paso de tiempo.

$$\vec{P}_B(t + \Delta t) = Q(t) \vec{P}_B(t) \quad [2.26]$$

Para la primera etapa, se modeló la unión de los iones Ca^{2+} al sensor. Donde P_{B1} es un vector de seis estados; en el caso de que no se ha unido ningún ion Ca^{2+} se tiene $\vec{P}_{B1} = [1, 0, 0, 0, 0, 0]$, la unión de un ion Ca^{2+} a la otoferlina provocará la ocupación del estado siguiente $\vec{P}_{B1} = [0, 1, 0, 0, 0, 0]$.

$$Q_1(t) = \begin{pmatrix} D_0 & k_{off} b^0 \Delta t & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 5k_{on} \Delta t [Ca^{2+}] & D_1 & 2k_{off} b \Delta t & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 4k_{on} \Delta t [Ca^{2+}] & D_2 & 3k_{off} b^2 \Delta t & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 3k_{on} \Delta t [Ca^{2+}] & D_3 & 4k_{off} b^3 \Delta t & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2k_{on} \Delta t [Ca^{2+}] & D_4 & 5k_{off} b^4 \Delta t \\ 0 & 0 & 0 & 0 & k_{on} \Delta t [Ca^{2+}] & D_5 \end{pmatrix} \quad [2.27]$$

$$D_0 = 1 - 5k_{on}[Ca^{2+}]\Delta t \quad [2.28]$$

$$D_1 = 1 - 4k_{on}[Ca^{2+}]\Delta t - k_{off}b^0\Delta t \quad [2.29]$$

$$D_2 = 1 - 3k_{on}[Ca^{2+}]\Delta t - 2k_{off}b\Delta t \quad [2.30]$$

$$D_3 = 1 - 2k_{on}[Ca^{2+}]\Delta t - 3k_{off}b^2\Delta t \quad [2.31]$$

$$D_4 = 1 - k_{on}[Ca^{2+}]\Delta t - 4k_{off}b^3\Delta t \quad [2.32]$$

$$D_5 = 1 - 5k_{off}b^4\Delta t \quad [2.33]$$

En la segunda etapa, se modela la probabilidad de que la vesícula se fusione o no. En esta etapa P_{B2} es un vector de dos estados, en donde $\overrightarrow{P_{B2}} = [1, 0]$ representa a la otoferlina unida a los cinco iones Ca^{2+} , esto no garantiza la fusión de la vesícula, ya que si un ion Ca^{2+} se separa del sensor antes de completar la fusión, la vesícula regresa al estado inicial $\overrightarrow{P_{B1}} = [1, 0, 0, 0, 0, 0]$. Al fusionarse la vesícula se tiene $\overrightarrow{P_{B2}} = [0, 1]$.

$$Q_2(t) = \begin{pmatrix} 1 - \gamma\Delta t & 0 \\ \gamma\Delta t & 1 \end{pmatrix} \quad [2.34]$$

Cada evento de fusión de una vesícula, se contabiliza como un evento de secreción; se calcula la secreción dinámica (número de eventos de secreción en cada paso de tiempo) y la acumulada (total de eventos acumulados a lo largo del tiempo).

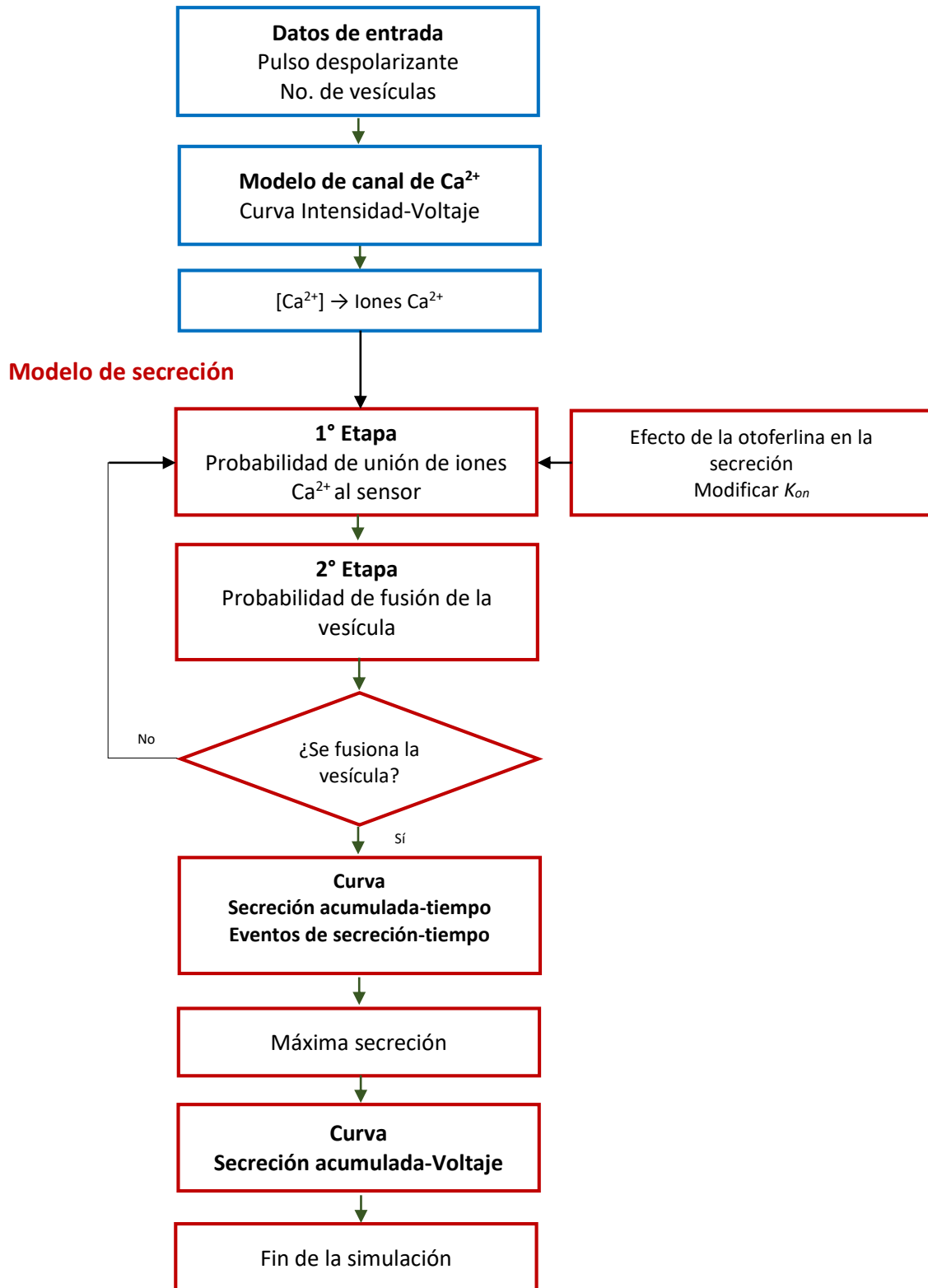


Figura 9. Diagrama de flujo del algoritmo del modelo de secreción.

Tabla 1. Parámetros empleados en las simulaciones de secreción.

PARÁMETRO	VALOR	REFERENCIA
DATOS TEMPORALES Y ESPACIALES		
Resolución espacial	10 nm	
Resolución temporal	0.01 μ s	
Tiempo de simulación	8 ms	
Tipo de dominio	Cilíndrico	(Gil y Segura, 2000)
Zonas activas en IHC	10-30	(Zampini et al., 2010)
ZONA ACTIVA		
Radio de la base	0.178 μ m	(Roberts et al., 1990)
Altura	0.4 μ m	(Lenzi et al., 1999)
Número de canales	90	(Roberts et al., 1990)
Número de vesículas	32	(Lenzi et al., 1999)
Distribución de canales	Aleatorio/ Acoplado	Test
Concentración de Ca^{2+}	5 μ M	(Roberts et al., 1990)
Coefficiente de difusión de Ca^{2+}	220 μ m ² s ⁻¹	(Allbritton et al., 1992)
ESQUEMA DE FUSIÓN DE VESÍCULAS		
Número de sitios de unión	5	(Roux et al., 2006)
Cooperativo		(Beutner et al., 2001)
Factor de cooperatividad	b=0.4,	
K_{on}	$K_{on} = 27.6 \mu$ M ⁻¹ s ⁻¹	
K_{off}	$K_{off} = 2150$ s ⁻¹	
Velocidad de fusión	$\gamma = 1695$ s ⁻¹	
CANAL DE Ca^{2+} TIPO L		
Velocidades de transición (ms ⁻¹)		Calculadas
α	$\alpha = 0.7161 \exp [0.1183 (V_m - 32)]$	
B	$\beta = 0.000364 \exp [- 0.0385 (V_m - 32)]$	
γ	$\gamma = 2.4798 [Ca_i / Ca_o]$	
ω	$\omega = 0.302$	
BUFFER ENDÓGENO		
		(Wittig y Parsons, 2008)
Coefficiente de difusión	32 μ m ² s ⁻¹	
Concentración	4.8 mM	
K_{on}	100 μ M ⁻¹ s ⁻¹	
Constante de disociación	1.5 μ M	
BUFFER EXÓGENO		
EGTA		
Coefficiente de difusión	113 μ m ² s ⁻¹	(Tsien, 1980)
Concentración	1 mM	(Beutner et al., 2001)
K_{on}	2.5 μ M ⁻¹ s ⁻¹	(Naraghi y Neher, 1997)
Constante de disociación	0.18 μ M	(Naraghi y Neher, 1997)

CAPÍTULO 3

SIMULACIONES

Las simulaciones mostradas en éste capítulo, muestran la capacidad del modelo desarrollado, el cual incluye los modelos matemáticos explicados en el capítulo anterior. La implementación de estos se hizo en GFortran para Linux y en Matlab versión R2016b para Windows. Los valores de los parámetros utilizados se muestran en la Tabla 1. El algoritmo se ejecutó de acuerdo con la siguiente secuencia:

➤ **Pre simulación**

Las moléculas de buffer dadas por las condiciones de equilibrio son distribuidas aleatoria y uniformemente en el dominio del cilindro.

Los canales de Ca^{2+} y las vesículas sinápticas son distribuidas aleatoria y uniformemente o bajo una configuración establecida en la base del dominio.

➤ **Simulación**

Las siguientes acciones se repiten para cada paso de la simulación hasta su final en éste orden: entrada de iones Ca^{2+} acorde al modelo de los canales de Ca^{2+} tipo L; cálculo de las reacciones cinéticas de la unión de los iones Ca^{2+} con los buffers o con la otoferlina; difusión de los iones Ca^{2+} y las moléculas de buffer; evaluación de un posible evento de secreción.

Los resultados obtenidos son las gráficas IV y el número total de eventos de secreción bajo diversas variables en cada paso de tiempo; estos son representados como el valor de la media \pm una desviación estándar (SD). En todos los escenarios se realizaron 100 simulaciones para generar el valor de la media.

Las simulaciones mostradas en éste capítulo fueron realizadas para:

- Validar los modelos propuestos.
- Probar la efectividad del modelo del canal de Ca^{2+} tipo L para reproducir observaciones experimentales.
- Estudiar la dinámica de secreción en una zona activa de IHC en función del porcentaje de vesícula sinápticas y de la presencia de micro y nanodomios de Ca^{2+} .

3.1 Simulaciones de corriente de Ca^{2+}

En una primera instancia, se estimaron las velocidades de transición de cada uno de los estados de los canales de Ca^{2+} ; se observó que la dependencia de voltaje en los canales, representado por la velocidad de transición α , es un parámetro clave para poder reproducir el comportamiento de estos canales con base en datos experimentales (Figura 10).

Se simularon las corrientes de Ca^{2+} presinápticas en una IHC causadas por la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L, inducidas por la despolarización de un pulso de 4 ms. Se empleó un Δt de 1 μs , una concentración interna de calcio de 0.1 μM , un potencial basal de -70 mV, voltajes de despolarización de -60 a 40 mV con pasos de 5 mV y sin la presencia de BayK8644, un agonista de dihidropiridina empleado en estudios experimentales para elevar el tiempo promedio de apertura de los canales de Ca^{2+} .

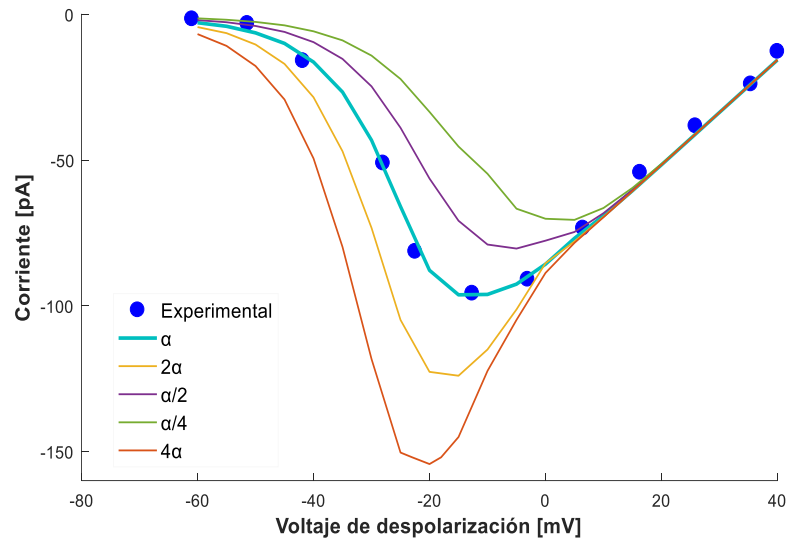


Figura 10. Estimación de la velocidad de transición α .

Para cada paso de tiempo se determinó el número total de canales de Ca^{2+} en cada uno de los estados: abierto, cerrado o inactivo (Figura 11). En la Figura 12 se observan corrientes de Ca^{2+} para pulsos de despolarización a -26, -11 y 19 mV. A partir de estas corrientes se construyó la curva intensidad-voltaje (IV) en estado estacionario bajo condiciones fisiológicas (Figura 13). Los resultados obtenidos se validaron con datos experimentales reportados en IHCs de ratón (Brant et al., 2005; Johnson et al., 2005).

Se empleó un potencial basal de -70 mV (Brant et al., 2005) debido a su gran parecido con un potencial fisiológico, ya que la despolarización a partir de este punto produce un aumento gradual y una disminución lenta de la corriente de Ca^{2+} , lo que permite detectar la activación rápida de los canales de Ca^{2+} tipo L. Se obtuvo la corriente máxima aproximadamente a -15 mV (Figura 14) con un porcentaje promedio del 50% de canales abiertos simultáneamente (Figura 12B) y se observa (Figura 12) que la mayoría de los canales están activos. Tanto la corriente máxima como la casi nula existencia de canales inactivos son características

observadas en estudios experimentales en los canales de Ca^{2+} tipo L en IHC (Platzter et al., 2000; Spassova et al., 2001; Brandt et al., 2005). En estudios experimentales en IHCs, se ha obtenido en promedio un 40% de canales de Ca^{2+} abiertos simultáneamente (Brandt et al., 2005), menor al porcentaje obtenido en las simulaciones; esto puede deberse a que las mediciones se realizaron a una temperatura menor a la fisiológica (20-25°C) y se sabe que las altas temperaturas incrementan la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} (Jonhson et al., 2005). El algoritmo diseñado no toma en cuenta el efecto de la temperatura.

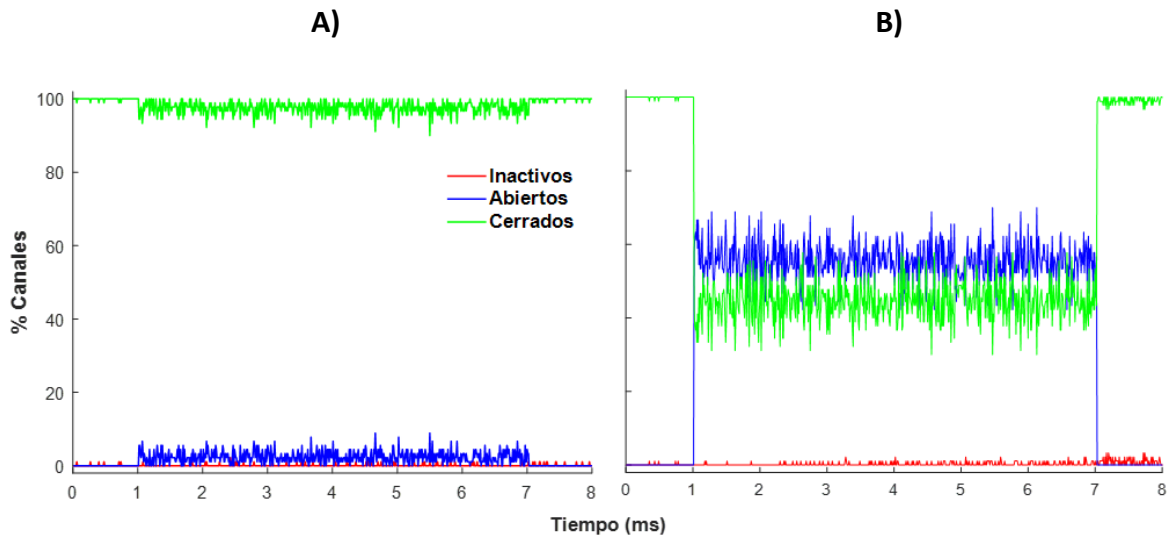


Figura 11. Porcentaje de canales de Ca^{2+} inactivos (●), abiertos (●) y cerrados (●) en una zona activa de una IHC. Se emplearon voltajes de -40 mV (A) y -15 mV (B).

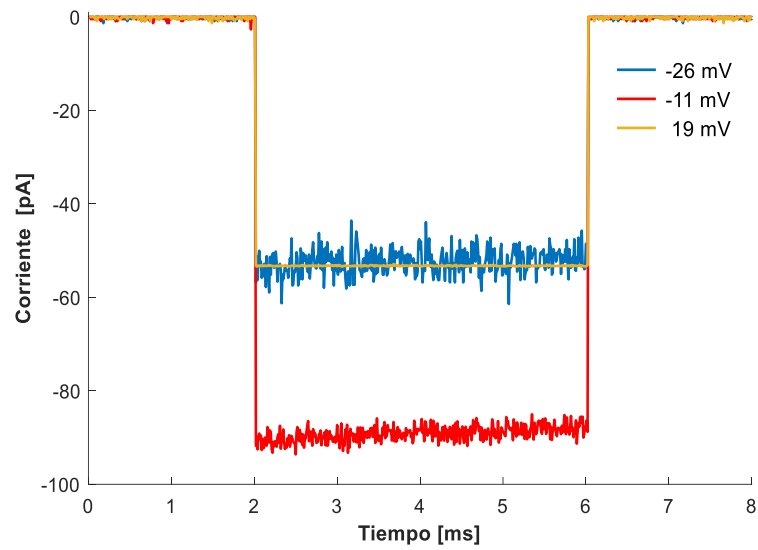


Figura 12. Ejemplo de corrientes de despolarización en canales de Ca^{2+} tipo L. Se emplearon voltajes de -26 (●), -11 (●) y 19 (●) mV.

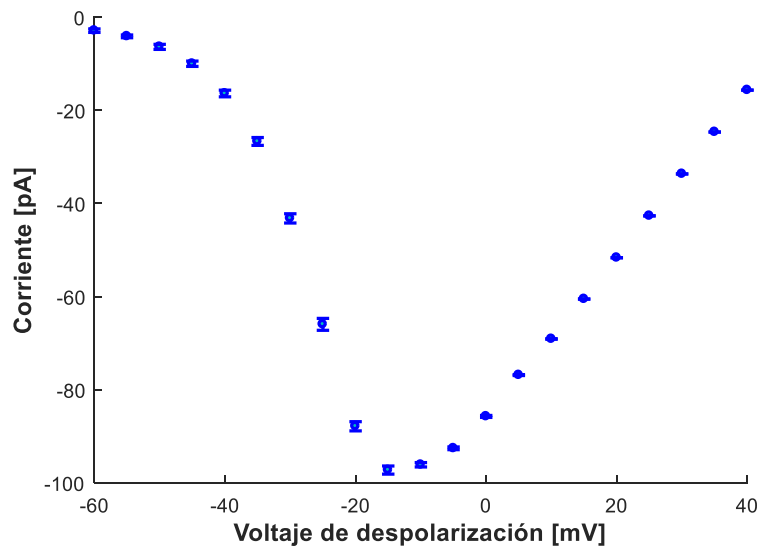


Figura 13. Relación Intensidad-voltaje del modelo para el canal de Ca^{2+} tipo L en una IHC. Se obtiene la corriente máxima para voltajes de membrana entre -20 y -10 mV. La corriente está normalizada al máximo. Los datos se presentan como la media \pm SD.

3.2 Dinámicas de secreción

La Figura 14 muestra las dinámicas de iones Ca^{2+} entrantes y de eventos de secreción que se producen en una zona activa de una IHC en respuesta a cinco pulsos despolarizantes de diferentes amplitudes. Esta metodología de simulación trata de reproducir lo que sucede realmente en la cóclea: un sonido genera movimiento de los estereocilios de una IHC lo cual a su vez provoca la despolarización de la célula. Se observa, que el flujo entrante de iones Ca^{2+} a la célula es máximo ante el pulso de intensidad media (gráficas del centro), mientras que es mínimo cuando la despolarización es muy intensa (gráficas de la extrema derecha) o muy débil (gráficas de la extrema izquierda). Esto es efecto de la inactivación dependiente de voltaje aunado a la inactivación por Ca^{2+} que presentan los canales tipo L (Zampini et al., 2010), ambos mecanismos incrementan de manera no lineal la efectividad con que los canales se cierran ante estímulos intensos. El modelo desarrollado, permite vislumbrar la capacidad de las células de modular la eficiencia de su respuesta de acuerdo a diferentes umbrales: si el estímulo es muy débil (subumbral) genera respuestas débiles por falta de señales de disparo; si es mayor (supraumbral), la respuesta es intensa, rápida y eficiente; y si es muy intenso, la respuesta se inhibe por protección.

En la Figura 15, se simularon las secreciones dinámicas y acumuladas en respuesta a estímulos de diferentes duraciones; estas simulaciones pretenden mostrar la modulación en frecuencia de las IHCs. En conjunto, las Figuras 15 y 16 destacan la modulación de la respuesta de la IHC, en cantidad y en temporalidad, en función de la intensidad (Figura 14) y de la duración (Figura 15) del estímulo. Por otro lado, las secreciones acumuladas de cada una de estas figuras permiten observar el efecto de la cooperatividad positiva o negativa del Ca^{2+} en la respuesta de la IHC. Nótese, que la secreción máxima se obtiene a unos cuantos milisegundos de que el estímulo (pulso de voltaje) inicie, lo cual indica que la respuesta de estas células está en una escala temporal de milisegundos.

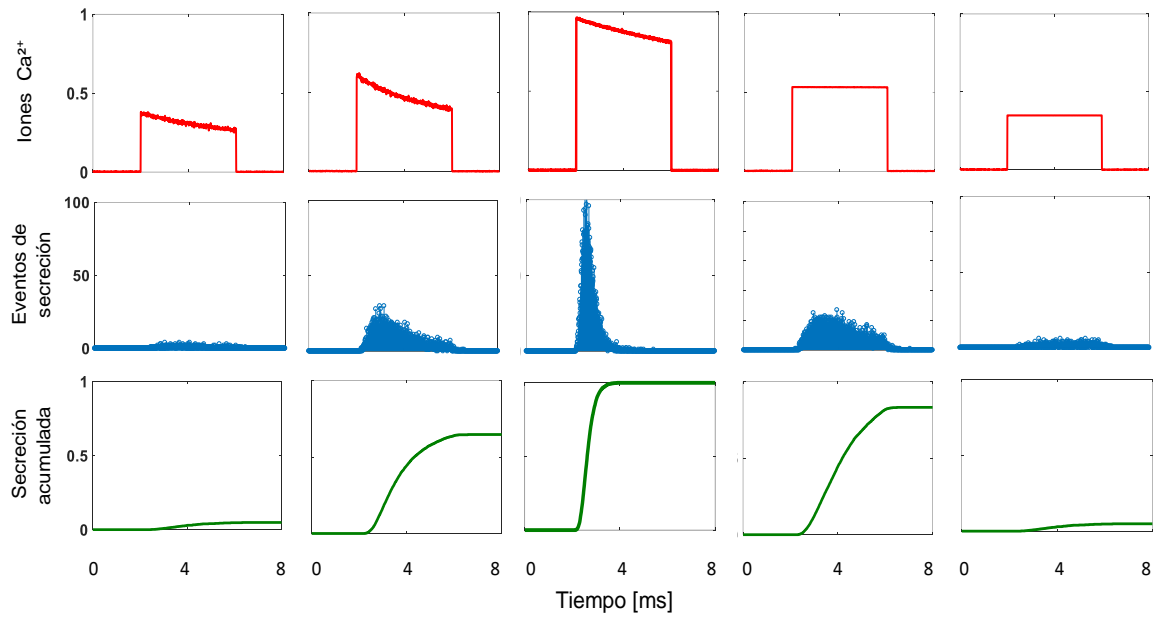


Figura 14. Dinámicas de Ca²⁺ y secreción en respuesta a pulsos de diferentes intensidades, con duración fija de 50 ms. Se muestra el flujo de Ca²⁺ (primera fila), eventos de secreción (segunda fila) y secreción acumulada (tercera fila), para cinco pulsos despolarizantes con amplitud de 40, 45, 65, 90 y 100 mV (de izquierda a derecha). El flujo de Ca²⁺ y la secreción acumulada se normalizaron con el máximo.

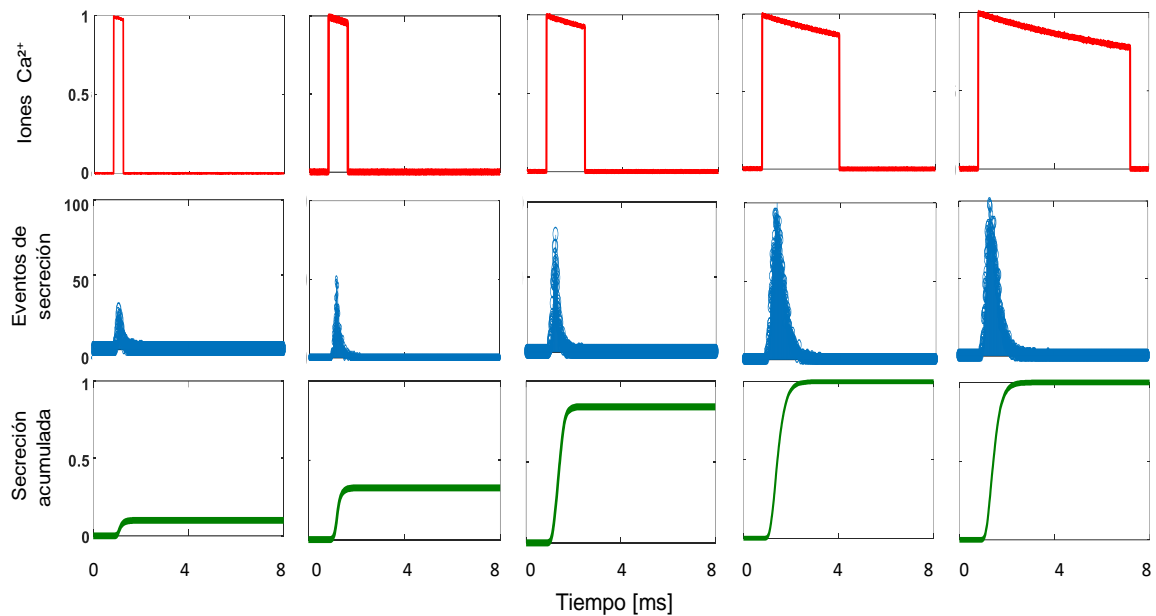


Figura 15. Dinámicas de Ca²⁺ y secreción para pulsos despolarizantes con amplitud de 65 mV en respuesta a diferentes duraciones. Se muestra el flujo de Ca²⁺ (primera fila), eventos de secreción (segunda fila) y secreción acumulada (tercera fila), para cinco pulsos con duraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 ms (de izquierda a derecha). El flujo de Ca²⁺ y la secreción acumulada se normalizaron al máximo.

La máxima secreción en una zona activa se obtuvo para un voltaje de -15 mV (Figura 16B), el cual concuerda con la máxima corriente de iones Ca²⁺ (Figura 16A), esto coincide con lo observado en registros de la sinapsis IHC-nervio auditivo, donde se sugieren que la tasa de fusión de vesículas es proporcional a la concentración de Ca²⁺ intracelular (Moser et al., 2013).

A continuación, se simuló la función de transferencia (Figura 16C), que define la relación entre la entrada de Ca^{2+} y la tasa de exocitosis sináptica, la cual presenta una relación no lineal (exponencial) en IHCs inmaduras (IHCs menores a 15 días postnatal P15), lo que indica la participación de una alta cooperatividad de Ca^{2+} en el proceso de exocitosis. Esta función cambia durante la maduración de la IHC, de una relación no lineal en IHCs inmaduras a una relación lineal en IHCs maduras, como se discute en (Safieddine et al., 2012).

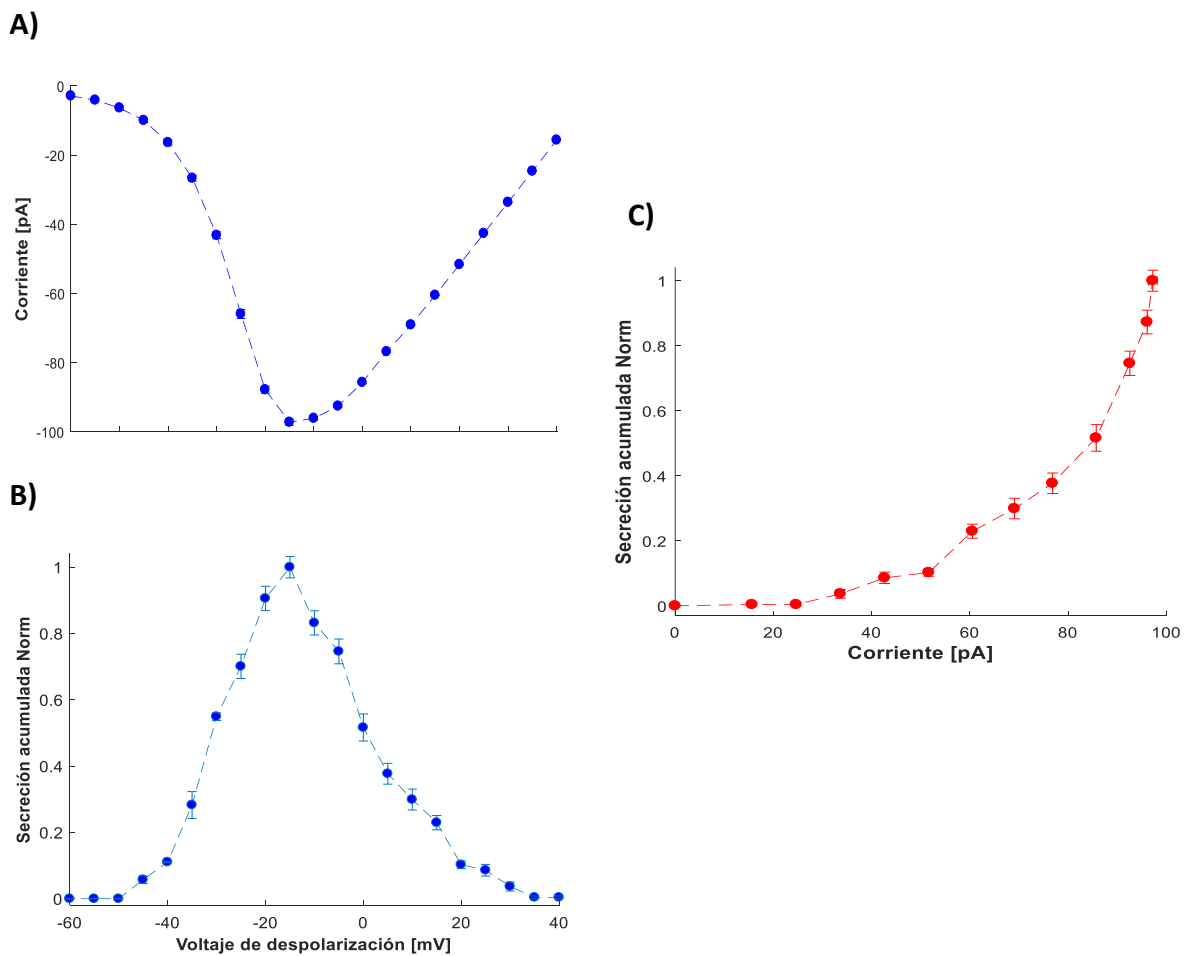


Figura 16. Dependencia de Ca^{2+} en la exocitosis en IHC. A) Corriente promedio de Ca^{2+} , B) Secreción acumulada, C) Función de transferencia en una zona activa de IHC. Secreción acumulada se normalizó al máximo. Los datos se presentan como la media \pm SD.

La sinapsis IHC-Nervio auditivo es altamente especializada en la codificación del sonido con la máxima precisión temporal. Cuando llegan a aparecer sinaptopatías auditivas, se afecta la capacidad auditiva de sonidos en diversos grados, afectando la codificación neural de señales acústicas temporales, esenciales para la comprensión del habla. Las sinaptopatías auditivas genéticas incluyen alteraciones en la concentración de glutamato en las vesículas sinápticas, el flujo sináptico de iones Ca^{2+} y en la endocitosis de las vesículas sinápticas (Moser et al., 2013). Alteraciones en la endocitosis pueden ser simuladas con nuestro modelo, si se varia el porcentaje de vesículas RRP iniciales, listas para fusionarse. Este escenario se muestra en la (Figura 17) donde se observa, que la máxima secreción es proporcional al número de vesículas RRP disponibles.

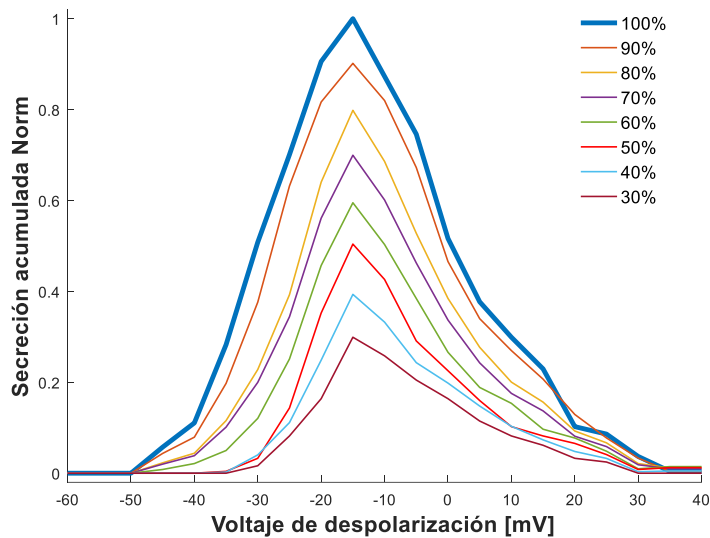


Figura 17. Relación secreción acumulada-voltaje empleando distintos porcentajes de vesículas. Secreción acumulada se normalizo al máximo.

La Figura 17, también puede representar alteraciones en la concentración de glutamato en las vesículas sinápticas. Se considera que cada vesícula contiene un quanta de glutamato, es decir, una vesícula en condiciones normales presentará un 100% del quanta, si hubiera alguna sinaptopatía genética que alterara la cantidad de glutamato contenida en cada vesícula, el porcentaje de secreción para un voltaje de despolarización dado cambiaría, lo cual también puede simularse con nuestro modelo

Los potenciales evocados auditivos del tallo cerebral (PEATC) representan la respuesta del sistema nervioso central ante un estímulo acústico detectado en los primeros 12 milisegundos (ms) posteriores al inicio del estímulo. Se suelen considerar las cinco primeras ondas (I, II, III, IV y V) que son constantes en todos los sujetos normales y reflejan la función del nervio auditivo y de la vía auditiva a lo largo del tronco cerebral. Los PEATC pueden identificar y localizar patologías auditivas, alteraciones sensoriales y la presencia de problemas en el sistema nervioso central. La onda I se produce tras la activación de las IHCs y el nervio auditivo, y puede ser modificada por múltiples factores aún desconocidos (Guerreiro y Ehrenberg, 1982).

Michalski et al., (2017) muestra un estudio de la sensibilidad de la secreción al Ca^{2+} intracelular, para lo cual emplea ratones mutados en el dominio C_2C de la otoferlina con el fin de reducir la afinidad de unión a iones Ca^{2+} . Se observó que la estructura del cuerpo sináptico, las corrientes sinápticas de Ca^{2+} y la distribución de las vesículas RRP no se vieron afectadas en estos ratones, pero se redujo la amplitud de la onda I del PEATC. En estos estudios la secreción acumulada disminuye aproximadamente un 50% para potenciales cercanos a la máxima secreción. Éste comportamiento se modeló disminuyendo drásticamente la constante de afinidad K_{on} en una de las transiciones del modelo cinético de la otoferlina (Figura 18), con la finalidad de reproducir la baja afinidad de Ca^{2+} de un sitio de unión específico en la otoferlina (Figura 9).

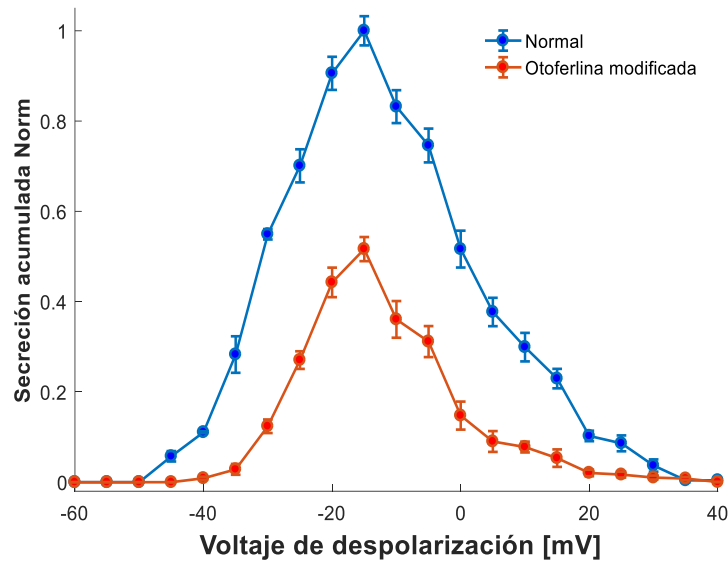


Figura 18. Efecto de la otoferrina en la secreción. Vesículas sinápticas con la otoferrina en condiciones normales (●) y con la otoferrina con uno de sus sitios de unión con una menor afinidad a Ca^{2+} (●). Secreción acumulada se normalizó al máximo. Los datos se presentan como la media \pm SD.

3.3 Predicciones de secreción: micro y nanodominios de Ca^{2+}

La distribución de los canales de Ca^{2+} y las vesículas sinápticas en la zona activa de la IHC es uno de los factores que afecta la exocitosis, ya que esta depende adicionalmente de las vesículas sinápticas disponibles, el número de canales de Ca^{2+} , la distribución y la probabilidad de apertura de estos (establecidas por el estímulo y la probabilidad de apertura máxima), la corriente de iones Ca^{2+} (establecido por la corriente del canal y los buffers en el citosol), y la sensibilidad al Ca^{2+} del sensor de Ca^{2+} . Estas observaciones han sido discutidas y relacionadas con la existencia de microdominios y nanodominios de Ca^{2+} en las IHCs (Moser et al., 2013; Brandt et al., 2005; Roberts, 1994).

Para observar el efecto de la distribución de los canales de Ca^{2+} y las vesículas en la secreción del glutamato, se realizaron simulaciones empleando dos distribuciones de las vesículas con respecto a los canales de Ca^{2+} :

- Una configuración donde las vesículas están distribuidas aleatoria y uniformemente (Figura 19A), en donde se observa la generación de microdominios de Ca^{2+} .
- Una configuración donde las vesículas están acopladas a los canales de Ca^{2+} , esto con el fin de simular un nanodominio de Ca^{2+} (Figura 19B).

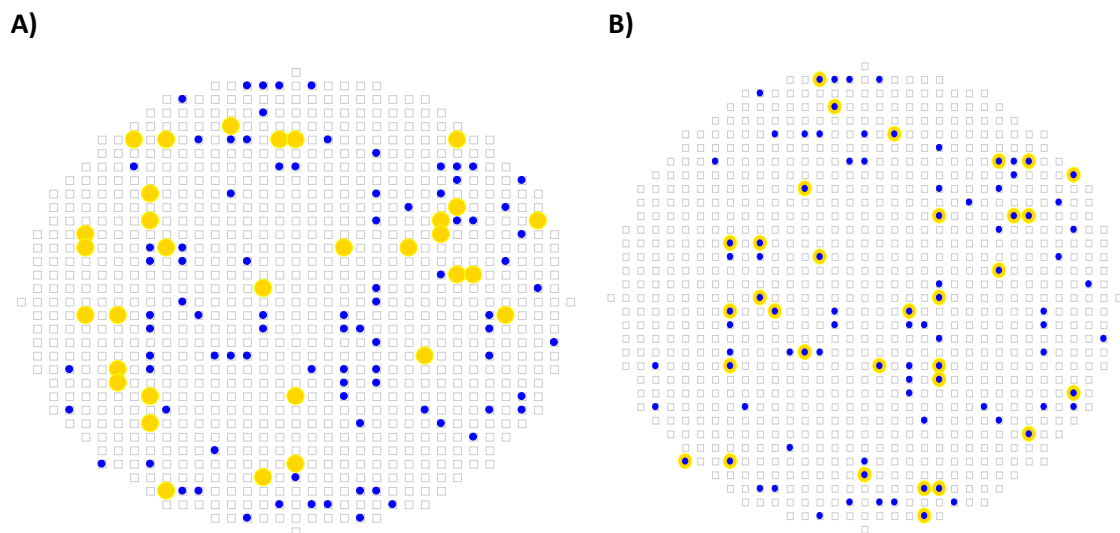


Figura 19. Distribución de canales de Ca^{2+} (●) y vesículas (●) en la zona activa. Se emplearon dos configuraciones espaciales de las vesículas: Aleatoria y uniforme (A) y Acoplada a los canales de Ca^{2+} (B).

En las Figuras 20 y 21 se observa que la secreción cambia drásticamente al emplear estas dos diferentes distribuciones ya que se obtiene aproximadamente un 20% más de secreción para potenciales cercanos a la máxima secreción cuando hay acoplamiento (cercanía) entre canales y vesículas. Según Moser et al., (2006) un control de la exocitosis de Ca^{2+} en un nanodominio daría lugar a una alta concentración de iones Ca^{2+} en el sitio de liberación de la

vesícula, lo que garantizaría una rápida exocitosis después de la activación del canal. Con esto se reduciría el tiempo necesario para la exocitosis de una vesícula y haría que la regulación del canal de Ca^{2+} sea el parámetro clave para definir la respuesta temporal de la sinapsis. Esto es particularmente interesante de estudiar ya que está asociado a la generación de señales en el trayecto auditivo para estímulos breves o de intensidad baja. Sin embargo, las técnicas experimentales no permiten hacerlo directamente, por lo que una herramienta computacional como el modeló desarrollado en esta tesis, es especialmente útil.

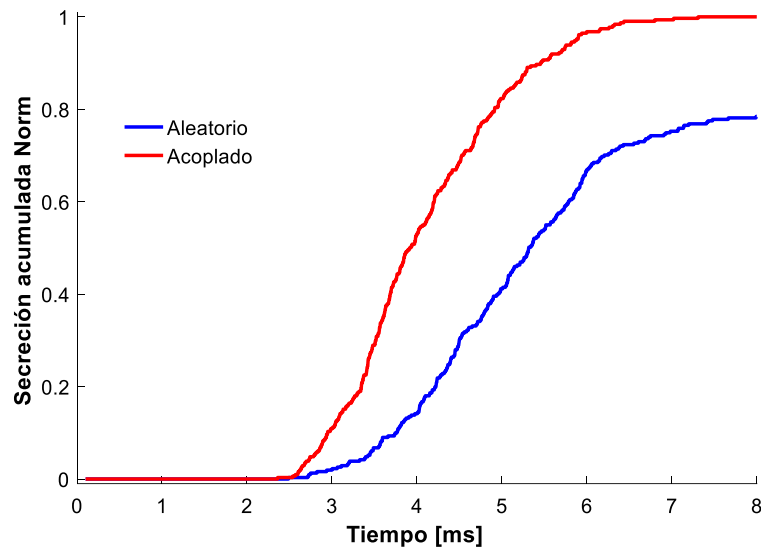


Figura 20. Relación Secreción acumulada-Tiempo para un voltaje de membrana de -15 mV para dos configuraciones espaciales. Se empleó una distribución de las vesículas sinápticas aleatoria (●) y acopladas (●). Secreción acumulada se normalizó al máximo.

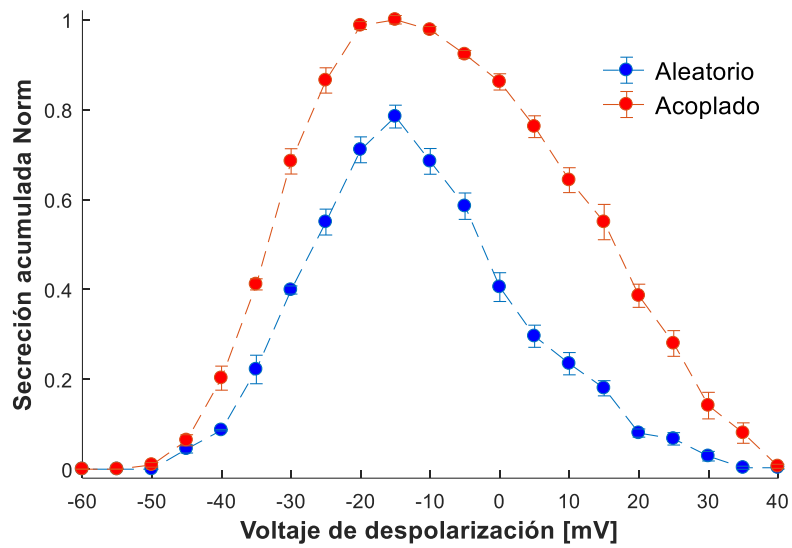


Figura 21. Relación Secreción acumulada-voltaje para dos configuraciones espaciales. Se empleó una distribución de las vesículas sinápticas aleatoria (●) y acopladas (●). Secreción acumulada se normalizó al máximo. Los datos se presentan como la media \pm SD.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La codificación de sonido implica varias etapas de procesamiento a lo largo de la vía auditiva. Específicamente las IHCs, actúan como receptores sensoriales y transducen información acústica –frecuencia, intensidad y duración del estímulo- en señales neuronales. Su estudio es importante para detectar patologías auditivas asociadas a IHC.

Se implementó un modelo estocástico para modelar un proceso biológico visto desde el enfoque de Ingeniería de Procesos, utilizando conocimientos y herramientas de esta disciplina para lograr una mayor comprensión de la sinapsis IHC-Nervio auditivo, en específico, el proceso de exocitosis de vesículas RRP, un proceso complicado de estudiar experimentalmente debido a que los protocolos experimentales actuales no proporcionan una resolución temporal adecuada, en el orden de milisegundos.

El modelo desarrollado se puede emplear para simular el cómo las mutaciones en la otoferlina, las alteraciones en la endocitosis o en la concentración de glutamato de las vesículas RRP, afectan la secreción de glutamato; ya que incluye modelos específicos para cada uno de los principales mecanismos intracelulares involucrados con la secreción rápida.

El modelo presentado permite predecir el tipo de dominio de Ca^{2+} que podría formarse durante la estimulación auditiva. Esto ajustando la distribución de las vesículas RRP dependiendo de la secreción observada experimentalmente, ya que empleando una configuración de nanodominios se obtuvo un 20% más de secreción.

Un trabajo a futuro, sería unir tanto la etapa presináptica con la postsináptica para estudiar en conjunto los mecanismos intracelulares involucrados en la primera sinapsis del trayecto auditivo bajo diferentes estímulos.

REFERENCIAS

Allbritton NL, Meyer T y Stryer L. (1992). Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science*, 258, 1812–1815.

Ávila-Pozos R, González-Vélez V y Godínez-Fernández R. (2006). Modelado de canales iónicos como procesos de Markov. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 27, 106-116.

Beutner D, Voets T, Neher E, y Moser T. (2001). Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse. *Neuron*, 29, 681–690.

Bortolozzia M, Lelli A y Mammano F. (2008). Calcium microdomains at presynaptic active zones of vertebrate hair cells unmasked by stochastic deconvolution. *Cell Calcium*, 44, 158–168.

Brandt A, Khimich D, y Moser T. (2005). Few CaV1.3 channels regulate the exocytosis of a synaptic vesicle at the hair cell ribbon synapse. *Journal of Neuroscience*, 25, 11577–11585.

Colquhoun D y Hawkes AG. (1981). On the stochastic properties of single ion channels. *Proceedings of the Royal Society London (Biological Sciences)*, 211, 205-235.

Del Castillo J y Katz B. (1954). Changes in end-plate activity produced by pre-synaptic polarization. *Journal of Physiology*, 124, 586-604.

Gibson WG, Farnell L y Bennett MR. (2001). A Monte Carlo analysis of calcium dynamics and facilitation in nerve terminals. *Neurocomputing*, 38(40), 17-22.

Glavinovic MI y Rabie HR. (2001). Monte Carlo evaluation of quantal analysis in the light of Ca^{2+} dynamics and the geometry of secretion. *European Journal of Physiology*, 443, 132–145.

Gil A y González-Vélez V. (2010). Exocytotic dynamics and calcium cooperativity effects in the calyx of Held synapse: A modelling study. *Journal of Computational Neuroscience*, 28, 65-76.

Gil A y Segura J. (2001). CA3D: Monte Carlo code to simulate 3D buffered diffusion of ions in sub-membrane domains. *Computer Physics Communications*, 136, 269–293.

González-Vélez V. (2011). *Mathematical models and multiscale simulations of cellular secretion processes* (tesis de doctorado). Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona, España.

Guerreiro CAM y Ehrenberg BL. (1982). Brainstem auditory evoked response. Application in Neurology. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 40(1), 21-28.

Hille B. (1975). Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four-barrier model. *The Journal of General Physiology*, 66, 535-560.

Johnson SL, Marcotti W, Kros CJ. (2005). Increase in efficiency and reduction in Ca^{2+} dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *Journal of Physiology*, 563, 177–191.

Johnson CP y Chapman ER. (2010). Otoferlin is a calcium sensor that directly regulates SNARE-mediated membrane fusion. *The Journal of Cell Biology*. 191, 187–97.

Kaeser PS y Regehr WG. (2017). The readily releasable pool of synaptic vesicles. *Current opinion in neurobiology*. 43, 63-70.

Kenna MA. (2004). Medical management of childhood hearing loss. *Pediatric Annals*, 33(12), 822–832.

Lenzi D, Runyeon JW, Crum J, Ellisman MH y Roberts ZM. (1999). Synaptic Vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *Journal of Neuroscience*, 19(1), 119–132.

Meddis R. (1986). Simulation of mechanical to neural transduction in the auditory receptor. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 79(3), 702–711.

Mennerick S y Matthews G. (1996). Ultrafast exocytosis elicited by calcium current in synaptic terminals or retinal bipolar neurons. *Neuron*, 17, 1241–1249.

Michalski N, Goutman JD, Auclair SM, Boutet de Monvel J, Tertrais M, Emptoz A, Parrin A, Nouaille S, Guillon M, Sachse M, Ciric D, Bahloul A, Hardelin J, Sutton RB, Avan P, Krishnakumar SS, Rothman JE, Dulon D, Safieddine S y Petit C. (2017). Otoferlin acts as a Ca²⁺ sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses. *ELife*, 6, 31013.

Moser T, Neef A y Khimich D. (2006). Mechanisms underlying the temporal precision of sound coding at the inner hair cell ribbon synapse. *The Journal of Physiology*, 576(1), 55–62.

Moser T, Predoehl F, y Starr A. (2013). Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otology & Neurotology*, 34, 995–1004.

Naraghi M y Neher E. (1997). Linearized buffered Ca²⁺ diffusion in microdomains and its implications for calculation of [Ca²⁺] at the mouth of a calcium channel. *Journal of Neuroscience*, 17, 6961–6973.

Nicolson T. (2012). The hair cell synapse. En LO Trussell, AN Popper y RR Fay (Eds.), *Synaptic mechanisms in the auditory system* (pp. 43-60). Nueva York: Springer.

Ochi R. (1993). Single-channel mechanism of β -adrenergic enhancement of cardiac L-type calcium current. *Japanese Journal of Physiology*, 43, 571-584.

Oheim M, Kirchhoff F y Stuhmer W. (2006). Calcium microdomains in regulated exocytosis. *Cell Calcium*, 40, 423–439.

Organización Mundial de la Salud (2019). *Sordera y pérdida de la audición*. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/es/>

Pangrsic T, Lasarow L, Reuter K, Takago H, Schwander M, Riedel D, Frank T, Tarantino LM, Bailey JS, Strenzke N, Brose N, Müller U, Reisinger E y Moser T. (2010). Hearing requires otoferlin-dependent efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells. *Nature Neuroscience*, 13, 869–76.

Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H y Striessnig J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca^{2+} channels. *Cell*, 102(1), 89–97.

Ramakrishnan NA, Drescher MJ y Drescher DG. (2009). Direct interaction of otoferlin with syntaxin 1A, SNAP-25, and the L-type voltage-gated calcium channel Cav1.3. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 1364–1372.

Roberts WM, Jacobs RA y Hudspeth AJ. (1990). Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *Journal of Neuroscience*, 10(11), 3664-3684.

Roberts W. (1994). Localization of calcium signals by a mobile calcium buffer in frog saccular hair cells. *The Journal of Neuroscience*, 14(5), 3246-3262.

Rønne FM, Dau T, Harte J y Elberling C. (2012). Modeling auditory evoked brainstem responses to transient stimuli. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 131(5), 3903-3913.

Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul A, Perfettini I, Le Gall M, Rostaing P, Hamard G, Triller A, Avan P, Moser T, y Petit C. (2006). Otoferlin, Defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell*, 127(2), 277–289.

Russell IJ, Cody AR y Richardson GP. (1986). The responses of inner and outer hair cells in the basal turn of the guinea-pig cochlea and in the mouse cochlea grown in vitro. *Hearing Research*, 22(1–3), 199–216.

Safieddine S, El-Amraoui A y Petit C. (2012). The auditory Hair cell ribbon synapse: from assembly to function. *Neuroscience*, 35, 509-528.

Sala F y Hernández-Cruz A. (1990). Calcium diffusion modeling in a spherical neuron. *Biophysical Journal*, 57, 313–324.

Seal RP, Akil O, Yi E, Weber CM, Grant L, Yoo J, Clause A, Kandler K, Noebels JL, Glowatzki E, Lustig LR y Edwards RH. (2008). Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron*, 57(2), 263–275.

Shahrezaei V, Cao A y Delaney KR. (2006). Ca²⁺ from one or two channels controls fusion of a single vesicle at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience*, 26(51), 13240 –13249.

Spassova M, Marc D, Saunders J y Parsons TD. (2001). Chick cochlear hair cell exocytosis mediated by dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Journal of Physiology*, 535, 689–696.

Takesian AE, Kotak VC y Sanes DH. (2009). Developmental hearing loss disrupts synaptic inhibition: implications for auditory processing. *Future Neurology*, 4(3), 331–349.

Tsien RY. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, 19, 2396–2404.

Wittig JH y Parsons TD. (2008). Synaptic Ribbon Enables Temporal Precision of Hair Cell Afferent Synapse by Increasing the Number of Readily Releasable Vesicles: A Modeling Study. *Journal of Neurophysiology*, 100, 1724 –1739.

Yu WM y Goodrich LV. (2014). Morphological and physiological development of auditory synapses. *Hearing Research*, 311, 3-16.

Zampini V, Johnson SL, Franz C, Lawrence ND, Munkner S, Engel J, Knipper M, Magistretti J, Massetto S y Marcotti W. (2010). Elementary properties of CaV1.3 Ca²⁺ channels expressed in mouse cochlear inner hair cells. *Journal of Physiology*, 588(1), 187–199.

Zamponi GW. (Ed.). (2005). *Voltage-gated calcium channels*. New York, USA: Landes Bioscience. KluwerAcademic/Plenum Publishers.

Zilany MS, Bruce IC y Carney LH. (2014). Updated parameters and expanded simulation options for a model of the auditory periphery. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 135(1), 283–286.

ANEXOS

Trabajos derivados de esta tesis

J. A. Soto-Bear, V. González-Vélez, N. Castañeda-Villa, A. Gil, *Stochastic Modeling of Secretion Dynamics in Inner Hair Cells of the Auditory Pathway*. Presentación tipo e-poster en el **ICABEMR 2018: 20th International Conference on Advanced Biomedical Engineering and Medical Robotics**. Praga, República Checa, 13-14 de agosto 2018.

Jessica A. Soto-Bear, Virginia González-Vélez, Amparo Gil-Gómez, Norma Castañeda-Villa, *Simulación de la dinámica de secreción en células ciliadas internas*. Poster presentado en el **Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica (CNIB 2018)**. Guanajuato, México, 18-20 de octubre 2018.

Glosario

Acufeno: percepción de ruido en los oídos o en la cabeza sin que exista una fuente exterior de sonido y sin que se registre una actividad vibratoria coclear, fenómeno que se produce ante un ruido exterior.

Célula ciliada interna IHC (*Inner Hair Cell*): células sensoriales del oído que constituyen la etapa presináptica de la primera sinapsis del trayecto auditivo.

Dominio: término para designar una región espacial dentro de la membrana, independientemente del tamaño o la morfología.

Vesículas de fase rápida RRP (*Ready Releasable Pool*): pequeño grupo de vesículas adosadas a la membrana plasmática debajo del cuerpo sináptico –zona activa- que se liberan más fácil y rápidamente que otras vesículas.

Medicamento ototóxico: medicamento con potencial de causar lesiones reversibles o permanentes en las estructuras del oído interno y el nervio auditivo.

Microdominio: es el dominio que se produce por la entrada de iones Ca^{2+} cuando varios canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática se abren.

Nanodominio: es el dominio que se produce por la entrada de iones Ca^{2+} cuando un solo canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática se abre.

Otoferlina: proteína de membrana que ha sido propuesta como el sensor de Ca^{2+} en las vesículas sinápticas en la exocitosis en IHCs. Para que ocurra un evento de secreción, se requiere la unión de cinco iones Ca^{2+} a la otoferlina.

Técnica de Patch-Clamp: técnica que permite caracterizar las propiedades biofísicas de los canales iónicos. Los registros electrofisiológicos se obtienen al posicionar un microelectrodo sobre la membrana de la célula de interés y se aplica una ligera succión que permite formar un sello de alta resistencia entre la punta del microelectrodo y la membrana celular.

Zona activa: área donde se lleva a cabo la exocitosis del neurotransmisor y la IHC está conectada con una terminación aferente. En la simulación esta área está representada como un dominio cilíndrico mapeado en una cuadrícula 3D con compartimientos cúbicos, en los cuales los iones Ca^{2+} se ligan a una molécula del buffer endógeno y exógeno y se difunden de un compartimiento a otro. Los canales de Ca^{2+} y las vesículas adosadas a la membrana plasmática, son representados como elementos puntuales ubicados en la primera capa del dominio, la cual representa la membrana celular.