



**Fundació**  
La Marató de TV3  
21º SIMPOSIUM  
Enfermedades del corazón



# **DESARROLLO Y APLICACIÓN DE MODELOS DE MIOCITOS AURICULARES PARA INVESTIGAR MECANISMOS QUE CONFIEREN A LOS PACIENTES UN RIESGO ALTO DE FIBRILACIÓN AURICULAR**

**Blas Echebarría Domínguez**

Escola Politècnica Superior d'Edificació de Barcelona.

Universitat Politècnica de Catalunya

## 1. Resumen

### Introducción

El objetivo principal del presente proyecto fue desarrollar y adaptar modelos computacionales auriculares humanos para estudiar los mecanismos por los cuales factores de riesgo pueden dar lugar a la fibrilación auricular. Como objetivo más específico, planteamos estudiar el efecto de una variante genética, relacionada con la deficiencia en el factor de transcripción PITX2, que afecta el tampón de calcio mediado por la calsequestrina, la actividad de SERCA y la activación de RyR2. La hipótesis principal es que la relación mecánica de la fibrilación auricular (FA) y los polimorfismos asociados a ella se produce a través de una modificación de la homeostasis del calcio, que conduce a eventos espontáneos de liberación de calcio y la aparición de arritmias. Por lo tanto, el objetivo del proyecto es desarrollar un modelo *in silico* multiescala de los miocitos auriculares y probar, usando este modelo, la capacidad de los eventos de liberación espontánea para producir despolarizaciones espontáneas de membrana de carácter arritmogénico en miocitos y tejidos auriculares humanos. Para explorar el papel de estos mecanismos, utilizamos modelos matemáticos de miocitos auriculares a nivel celular y multicelular. Los modelos a nivel celular permiten investigar el riesgo que supone el cambio en un único mecanismo molecular sobre el funcionamiento celular. En particular, estudiamos los resultados de la pérdida de la función del canal SK3, la regulación positiva de SERCA, calsequestrina (CSQ), estrés mecánico, etc., y analizamos sus efectos arritmogénicos a nivel subcelular, celular y tisular.

### Objetivos

El objetivo general de este proyecto es identificar los factores electrofisiológicos moleculares y celulares que confieren a los pacientes un alto riesgo de sufrir fibrilación auricular.

Los objetivos específicos del proyecto son:

1. Desarrollo de un modelo de miocitos auriculares humanos (tanto unicelular como multicelular) con una descripción detallada de la regulación del calcio luminal (tamponamiento por CSQ, actividad de SERCA, activación de RyR2) y de los canales de potasio activados por calcio.

2. Estudio de las consecuencias funcionales de las alteraciones en el tampón de calcio mediado por CSQ, la actividad de SERCA y la activación de RyR2.
3. Interrelación entre la regulación del calcio y los canales SK3 en el control de la actividad eléctrica auricular.
4. Modificación del modelo de miocitos auriculares para investigar cómo el acoplamiento electromecánico modifica la actividad eléctrica auricular.
5. Introducción de la estructura subcelular en el modelo auricular. Estudio de las condiciones que dan lugar a eventos locales de liberación de calcio, ondas de calcio y despolarizaciones de membrana.

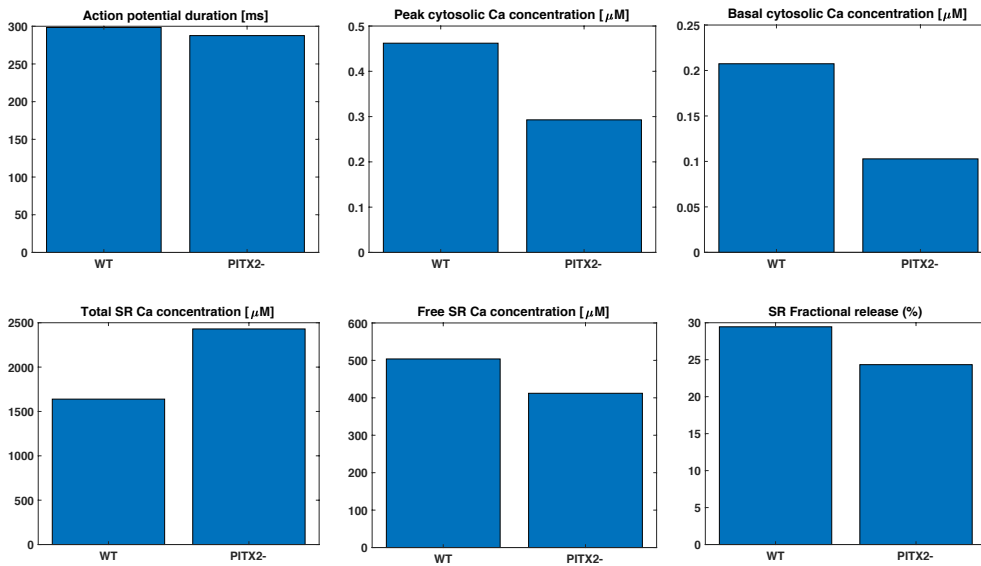
## **Metodología**

Se basa en el desarrollo y la simulación de modelos matemáticos en las aurículas, que van desde la dinámica del calcio a nivel subcelular hasta la propagación del potencial de acción en tejido. A día de hoy existen varios modelos disponibles de células auriculares humanas (por ejemplo, el modelo de Grandi [Grandi *et al.*, *Circ Res*, 2011] o de Lugo [Lugo *et al.*, *Am J Physiol*, 2014]), que consideran las concentraciones medias de calcio en diferentes compartimentos celulares (citosol, retículo sarcoplasmático, etc.). Son, por lo tanto, rápidos desde un punto de vista computacional, lo que los convierte en una muy buena herramienta para estudiar las consecuencias funcionales de las modificaciones en las corrientes iónicas o la regulación del calcio. Sin embargo, son modelos deterministas y, por tanto, no tienen en cuenta los eventos estocásticos de liberación de calcio, incluida, por ejemplo, la liberación espontánea de calcio que da lugar a DAD o EAD. Además, no consideran los gradientes de concentración dentro de la célula y, por tanto, no pueden describir eventos de liberación local, como *sparks* de calcio, o eventos globales, como ondas de calcio. Esto puede tener un efecto importante cuando se estudia la respuesta homeostática de la célula. Para superar estas deficiencias, en este proyecto propusimos desarrollar un modelo detallado de la dinámica del calcio en células auriculares humanas, que tenga en consideración la distribución de los clústeres de RyR en la célula y permita el estudio de los eventos de liberación de calcio subcelular.

## 2. Resultados obtenidos

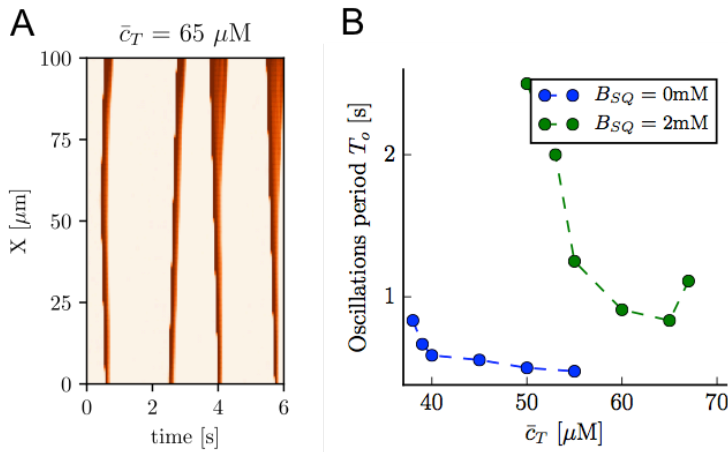
### 1) Estudio de las consecuencias funcionales de las alteraciones en el tampón de calcio mediado por CSQ, la actividad de SERCA y la activación de RyR2.

Utilizando modelos auriculares humanos ya publicados y validados, hemos realizado simulaciones para un conjunto de variaciones en estos parámetros, tanto individualmente como combinadas. Posteriormente hemos medido los cambios en el calcio citosólico, tanto sistólico como diastólico, en las concentraciones de calcio en el SR (libre y unido a CSQ), en la fracción de liberación del SR y en la duración del potencial de acción (APD). Encontramos que un cambio en la velocidad máxima de captación de SERCA tiene poco efecto en sí mismo, excepto a velocidades de estimulación rápidas. Un aumento en la capacidad del tampón CSQ aumenta la concentración de calcio diastólico SR, así como el contenido global de calcio, mientras que un aumento en la actividad del RyR conlleva efectos opuestos. Además del interés intrínseco en comprender de qué modo las variaciones en los factores reguladores del calcio pueden dar lugar a cambios en la homeostasis del calcio y la forma y duración del potencial de acción, nos hemos centrado en un caso específico: una menor expresión de PITX2, que se ha observado que da como resultado una reducción de la conductancia máxima de  $I_{CaL}$ , una sobreexpresión de *Casq2*, *Atp2a2* y un aumento de la actividad del RyR. Siguiendo los resultados experimentales de Lozano-Velasco *et al.*, Cardiovasc Res, 2016, consideramos una disminución del 30% en la conductancia máxima de  $I_{CaL}$  y un aumento de la actividad de RyR, SERCA y CSQ. Esto da como resultado niveles más bajos de concentraciones de calcio citosólico y SR, en comparación con el WT, mientras que la concentración total de calcio en el SR (libre y ligado a CSQ) aumenta.



**Figura.** Comparación del modelo original de Grandi (WT) y el modificado para tener en cuenta la deficiencia de PITX2.

Posteriormente abordamos el efecto de estos cambios homeostáticos en la aparición de ondas de calcio. Para eso realizamos simulaciones del modelo de calcio subcelular desarrollado en este proyecto, con diferentes niveles de concentración media de calcio y del tampón de calsequestrina (CSQ). Observamos que cuando aumenta la carga de calcio, el sistema comienza a mostrar ondas de calcio espontáneas. Estas ondas persisten en el tiempo con diferentes formas y duraciones, dando lugar a una oscilación casi periódica en la señal global de calcio. Observamos, aproximadamente, una onda de calcio por segundo. Las ondas habitualmente se inician en sitios distintos cada vez, pero aparecen sistemáticamente. Tras la reducción de la concentración de CSQ, las oscilaciones aparecen a valores más bajos de la concentración media total, tienen una frecuencia más alta y el rango de oscilaciones se hace más amplio.

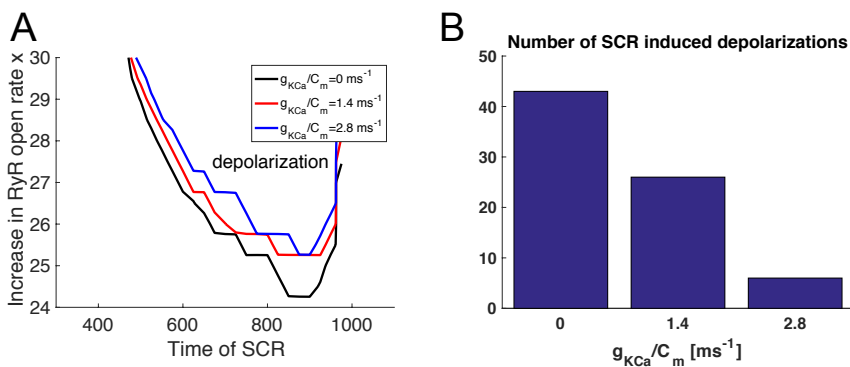


**Figuras. A)** Line-scan que muestra la aparición de ondas periódicas de calcio. **B)** Período medio de las oscilaciones a diferentes valores de la concentración media de calcio  $c_T$ , para una concentración de CSQ de  $B_{SQ} = 2 \text{ mM}$  (puntos verdes) y en ausencia de CSQ (puntos azules).

## 2) Interrelación entre la regulación del calcio y los canales SK3 en el control de la actividad eléctrica auricular.

Hemos realizado un estudio de los diferentes modelos existentes para los canales SK3 y sus efectos para la forma del potencial de acción. La corriente se modeliza asumiendo una dependencia óhmica del voltaje de membrana y una puerta de activación para los canales SK, cuyo estado estacionario presenta una dependencia sigmoïdal del calcio intracelular en el espacio subsarcolemal. Hemos introducido esta corriente en cuatro modelos auriculares humanos diferentes y estudiado los cambios resultantes en APD, homeostasis de calcio, etc., para diferentes valores de los parámetros de la corriente: conductancia máxima, exponente de Hill de activación, concentración media de activación y tiempo de activación. La corriente de potasio activada por calcio,  $I_{KCa}$ , tiene el efecto esperado de reducir la duración del potencial de acción (APD), pero esta reducción solo es apreciable a frecuencias mayores de 1 Hz. Los resultados obtenidos con el modelo de Lugo *et al.* muestran una gran dependencia de la corriente  $I_{KCa}$  con su conductividad y el tipo de dinámica de la puerta. Un cambio en la sensibilidad al calcio de los canales, al cambiar la constante de activación de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $K_{KCa}$ , también muestra dos regímenes diferentes. Para  $K_{KCa}$  por encima de  $\sim 500 \text{ nM}$ , reducir la sensibilidad del canal (aumentar  $K_{KCa}$ ) no cambia mucho el valor del APD. Por el contrario, disminuirlo por debajo de este valor produce una reducción rápida del APD. Al introducir la corriente  $I_{KCa}$  en otros modelos auriculares, como Nygren, Courtemanche y Grandi, hemos observado que los efectos de la corriente son cualitativamente similares.

Luego hemos estudiado si la presencia de una fuerte corriente de  $I_{KCa}$  podría evitar los efectos proarrítmicos (EAD, DAD) de los eventos de liberación espontánea de calcio (SCR). Hemos incluido SCR en las simulaciones permitiendo la apertura de los receptores de rianodina en momentos aleatorios. Comparamos condiciones similares con y sin corriente de  $I_{KCa}$  y observamos que, de hecho, las corrientes de  $I_{KCa}$  reducen el efecto de SCR en las extradespolarizaciones. La presencia de la corriente  $I_{KCa}$  previene las despolarizaciones inducidas por SCR en una estrecha región de parámetros, pero esto parece ser suficiente para reducir la posibilidad de despolarizaciones inducidas. Sin embargo, no queda claro si este efecto protector proviene de la propia corriente que contrarresta el efecto del intercambiador de sodio y calcio, o del cambio en el potencial de reposo, que presumiblemente afecta al período refractario.

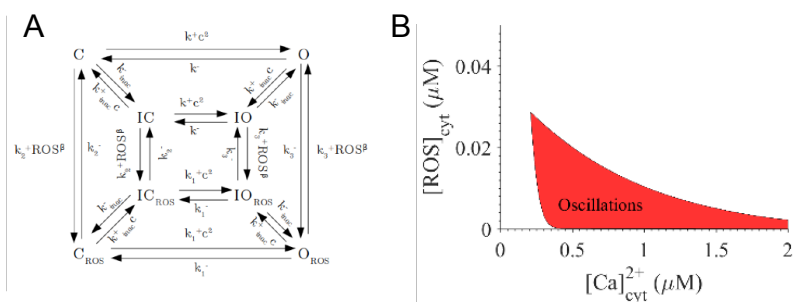


**Figuras. A)** Eventos de despolarización en función del tiempo y la fuerza de SCR, para diferentes valores de la conductancia de  $I_{KCa}$ . **B)** Número de despolarizaciones en una simulación con 1.000 estimulaciones y un período de estimulación de  $T = 1.000 \text{ ms}$ , donde se produce un evento de SCR en un momento elegido al azar en cada período de estimulación.

### 3) Modificación del modelo de miocitos auriculares para investigar cómo el acoplamiento electromecánico modifica la actividad eléctrica auricular.

Existe creciente evidencia de la influencia del estrés oxidativo en la patogénesis de la FA. La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) probablemente esté involucrada en la remodelación estructural y eléctrica del corazón. El estiramiento auricular puede aumentar la producción de ROS, afectando a la probabilidad de apertura del RyR, dando como resultado la aparición de liberaciones espontáneas de calcio y ondas de calcio. Hemos introducido este efecto modificando la descripción del RyR2, de modo que la transición entre sus diferentes estados depende de la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, consideramos que el RyR puede

estar en estados oxidados, con mayor probabilidad de apertura. Hemos realizado simulaciones introduciendo este nuevo modelo para la activación del RyR en un modelo de calcio. Encontramos que un aumento en el nivel de ROS da lugar a oscilaciones espontáneas de calcio en una amplia gama de parámetros. Posteriormente introducimos esta descripción del efecto de ROS en el modelo subcelular desarrollado en este proyecto, con el fin de estudiar el efecto de un aumento en la producción de ROS en la frecuencia de *sparks* y ondas de calcio espontáneas. Para dar cuenta de la producción, difusión y degradación de ROS, se hicieron algunas modificaciones en el modelo. Se asumió que NOX2 producía ROS a una velocidad constante en la membrana. El proceso de difusión con respecto a ROS se estableció con la misma constante de difusión que el  $\text{Ca}^{2+}$ , pero también tuvimos en cuenta la degradación con una tasa de  $2 \cdot 10^3 \text{ms}^{-1}$ . Realizamos simulaciones con diferentes magnitudes de producción de ROS. Para un valor basal bajo de producción de ROS ( $j_{\text{ROS}} = 10^{-3} \mu\text{M} \mu\text{m} \text{ms}^{-1}$ ) el número observado de *sparks* es bajo. Para valores crecientes de la producción, se observa un mayor número de *sparks*, que también son de mayor tamaño. De nuestros resultados se desprende que el número de *sparks* muestra una dependencia de la concentración de ROS de la forma:  $N_{\text{sparks}} = a + b \log [\text{ROS}]$ . Además, cuando la producción de ROS aumenta dos órdenes de magnitud sobre el valor basal bajo, aparecen ondas de calcio en la célula.



**Figuras. A)** Modelo de ocho estados del RyR, incluidos los estados oxidados por ROS. Los cuatro estados centrales están inactivados y los cuatro inferiores son los oxidados. Hay dos estados abiertos, O y  $O_{\text{ROS}}$ . **B)** Región de existencia de oscilaciones en función de las concentraciones citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  y ROS.

**4) Introducción de la estructura subcelular en el modelo auricular. Estudio de las condiciones que dan lugar a eventos locales de liberación de calcio, ondas de calcio y despolarizaciones de membrana.**



Hemos desarrollado un modelo detallado de la célula auricular, con una discretización a escala submicrométrica, que nos permite estudiar el efecto de los cambios en el tamaño y la distribución de los clústeres de RyR durante la FA, conforme a los datos experimentales disponibles a esta escala. Para ello, hemos seguido diferentes pasos, definiendo:

1. La estructura interna de la célula. Hemos introducido la red de túbulos transversales y axiales (TAT) y estudiado el efecto de las variaciones en la cantidad de túbulos t (TT) y túbulos axiales (AT).
2. El tamaño y la forma de los clústeres de RyR. Hemos incorporado al modelo un algoritmo para construir distribuciones heterogéneas de tamaños de clústeres de RyR.
3. La dinámica de activación de RyR. Hemos mejorado los modelos existentes de activación del RyR mediante la identificación de los mecanismos de inactivación del RyR.

Posteriormente hemos modificado el modelo de calcio subcelular para tener en cuenta las condiciones patológicas, como los cambios homeostáticos o el estrés oxidativo, explicados en los puntos anteriores. También hemos tenido acceso a datos experimentales del grupo de Leif Hove-Madsen, del Institut d'Investigacions Biomèdiques Barcelona, CSIC, Barcelona, respecto a la distribución subcelular de los niveles de CSQ y la fosforilación de RyR en miocitos auriculares de pacientes con FA. Utilizamos el modelo de calcio subcelular con algunas modificaciones para incluir la modulación de la apertura de RyR por el nivel de CSQ y la fosforilación de RyR2 observada en los experimentos. La modelización matemática teniendo en cuenta esta distribución espacial de CSQ, RyR2 y fosforilación muestra un aumento diferencial en los eventos de liberación de calcio subsarcolemal que favorecen el intercambio de Na-Ca y, en consecuencia, una mayor incidencia y amplitud de las corrientes transitorias internas, lo que se traduce en una mayor incidencia de DAD o AP espontáneos, que pueden afectar a la actividad eléctrica normal.

### 3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Los resultados de este proyecto tendrán un impacto en el conocimiento de los mecanismos subyacentes de las arritmias cardíacas y, más específicamente, la fibrilación auricular (FA). Una de las principales preguntas sobre la FA es cómo la remodelación auricular que le acompaña afecta a la recurrencia de los episodios de FA hasta que se convierte en permanente. El nuevo modelo auricular humano desarrollado en el presente proyecto puede ayudar a predecir cómo las alteraciones estructurales y moleculares a nivel subcelular pueden afectar a la homeostasis del calcio y la actividad eléctrica espontánea. En particular, en este proyecto hemos estudiado el impacto de varios elementos que se modifican durante la remodelación (corriente de potasio activada por calcio, especies oxidativas reactivas, cambios en la fosforilación y concentración de tampón de calsequestrina, etc.) y cómo esto afecta al número de eventos de liberaciones espontáneas de calcio, que pueden provocar una despolarización retrasada, interrumpiendo la actividad eléctrica normal. Por tanto, los modelos que hemos desarrollado pueden considerarse modelos *in silico*, que pueden usarse, en una primera etapa, para comprender los diferentes factores que afectan la FA o para probar los efectos de nuevos tratamientos farmacológicos.

### 4. Bibliografía científica generada

#### Publicaciones

Cantalapiedra IR, Alvarez-Lacalle E, Peñaranda A, Echebarria B.

*Minimal model for calcium alternans due to SR release refractoriness.*

Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science 27, 093928 (2017).

Peñaranda A, Cantalapiedra IR, Alvarez-Lacalle E, Echebarria B.

*Effects of Small Conductance Calcium Activated Potassium Channels in Cardiac Myocytes.*

Computing in Cardiology 44 (2017).

Marchena M, Echebarria B.

*Computational model of calcium signaling in cardiac atrial cells at the submicron scale.*

Frontiers in Physiology 9, 1760 (2018).

Peñaranda A, Cantalapiedra IR, Alvarez-Lacalle E, Echebarria B.

*Electrophysiological effects of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in atrial myocytes.*

Nonlinear Dynamics in Biological Systems, J. Carballido-Landeira, B. Escibano (eds.), SEMA SIMAI Springer Series 7 (2019).

Romero L, Alvarez-Lacalle E, Shiferaw Y.

*Stochastic coupled map model of subcellular calcium cycling in cardiac cells.*

Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science 29, 023125 (2019).

Conesa D, Echebarria B, Peñaranda A, Cantalapiedra IR, Shiferaw Y, Alvarez-Lacalle E.

*Two-variable nullcline analysis of ionic general equilibrium predicts calcium homeostasis in ventricular myocytes (sometido a revisión).*

Marchena M, Echebarria B, Shiferaw Y, Alvarez-Lacalle E.

*Buffering and total calcium levels determine the presence of oscillatory regimes in cardiac cells (sometido a revisión).*

Marchena M, Echebarria B.

*Influence of t-tubular network on the characteristics of calcium transients in cardiac myocytes (sometido a revisión).*

Wei J, Belke D, Zhong X, Sun B, Guo W, Yao J, Wang R, Vallmitjana A, Benitez R, Hove-Madsen L, Alvarez-Lacalle E, Echebarria B, Chen SRW.

*Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin Dependent Inactivation of Cardiac Ryanodine Receptor Underlies Ca<sup>2+</sup> Alternans in Intact Hearts (sometido a revisión).*

Además se han presentado 10 comunicaciones en conferencias y talleres.

### **Tesis doctorales y formación de estudiantes**

Miquel Marchena presentará próximamente su tesis doctoral centrada en el estudio de este proyecto. Miquel Marchena fue contratado con la ayuda concedida por la Fundació La Marató de TV3.

Además, se han dirigido tres trabajos de máster: Miquel Marchena (2016), Nikolina Krizanec (2017), David Conesa (2019) y dos trabajos finales de grado: David Conesa (2018), Miquel Bosch (2019), asociados a este proyecto.