



**Fundació**  
La Marató de TV3

21è SIMPOSIUM  
Malalties del cor



# **DESENVOLUPAMENT I APLICACIÓ DE MODELS DE MIÒCITS AURICULARS PER INVESTIGAR MECANISMES QUE CONFEREIXEN PACIENTS UN RISC ALT DE FIBRIL·LACIÓ AURICULAR**

**Blas Echebarría Domínguez**

Escola Politècnica Superior d'Edificació de Barcelona.

Universitat Politècnica de Catalunya

## 1. Resum

### Introducció

L'objectiu principal d'aquest projecte va ser desenvolupar i adaptar models computacionals auriculars humans per estudiar els mecanismes pels quals factors de risc poden donar lloc a la fibril·lació auricular. Com a objectiu més específic, es plantejava estudiar l'efecte d'una variant genètica, relacionada amb la deficiència en el factor de transcripció PITX2, que afecta el tampó de calci mediat per la calsequestrina, l'activitat de SERCA i l'activació de RyR2. La hipòtesi principal és que la relació mecànica de la fibril·lació auricular (FA) i els polimorfismes associats a aquesta es produeix a través d'una modificació de l'homeòstasi del calci, que condueix a esdeveniments espontanis d'alliberament de calci i l'aparició d'arrítmies. Per tant, l'objectiu del projecte és desenvolupar un model *in silico* multiescala dels miòcits auriculars i provar, usant aquest model, la capacitat dels esdeveniments d'alliberament espontani de produir despolaritzacions espontànies de membrana de caràcter arritmogènic en miòcits i teixits auriculars humans. Per explorar el paper d'aquests mecanismes, utilitzem models matemàtics de miòcits auriculars a nivell cel·lular i multicel·lular. Els models a nivell cel·lular permeten investigar el risc que suposa el canvi en un únic mecanisme molecular sobre el funcionament cel·lular. Particularment estudiem els resultats de la pèrdua de la funció del canal SK3, la regulació positiva de SERCA, calsequestrina (CSQ), estrès mecànic, etc., i analitzem els seus efectes arritmogènics a nivell subcel·lular, cel·lular i tissular.

### Objectius

L'objectiu general d'aquest projecte és identificar els factors electrofisiològics moleculars i cel·lulars que confereixen als pacients un alt risc de patir fibril·lació auricular.

Els objectius específics del projecte són:

1. Desenvolupament d'un model de miòcits auriculars humans (tant unicel·lular com multicel·lular) amb una descripció detallada de la regulació del calci luminal (tamponament per CSQ, activitat de SERCA, activació de RyR2) i dels canals de potassi activats per calci.

2. Estudi de les conseqüències funcionals de les alteracions en la unió de calci a la CSQ, l'activitat de SERCA i l'activació de RyR2.
3. Interrelació entre la regulació del calci i els canals SK3 en el control de l'activitat elèctrica auricular.
4. Modificació del model de miòcits auriculars per investigar com l'acoblament electromecànic modifica l'activitat elèctrica auricular.
5. Introducció de l'estructura subcel·lular en el model auricular. Estudi de les condicions que donen lloc a esdeveniments locals d'alliberament de calci, ones de calci i despolaritzacions de membrana.

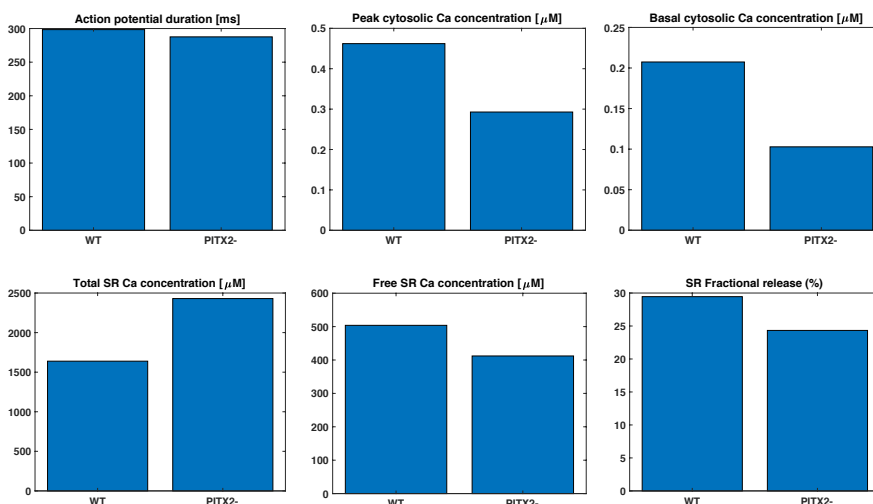
## **Metodologia**

Es basa en el desenvolupament i la simulació de models matemàtics en les aurícules, que van des de la dinàmica del calci a nivell subcel·lular fins a la propagació del potencial d'acció en teixit. Fins al dia d'avui hi ha diversos models disponibles de cèl·lules auriculars humanes (per exemple, el model de Grandi [Grandi *et al.*, *Circ Res*, 2011] o de Lugo [Lugo *et al.*, *Am J Physiol*, 2014]), que consideren les concentracions mitjanes de calci en diferents compartiments cel·lulars (citosol, reticle sarcoplasmàtic, etc.). Són, per tant, ràpids des d'un punt de vista computacional, fet que els converteix en una molt bona eina per estudiar les conseqüències funcionals de les modificacions en els corrents iònics o la regulació del calci. No obstant això, són models deterministes i, per tant, no tenen en compte els esdeveniments estocàstics d'alliberament de calci, incloent-hi, per exemple, l'alliberament espontani de calci que dona lloc a DADs o EADs. A més, no consideren els gradients de concentració dins de la cèl·lula i, per tant, no poden descriure esdeveniments d'alliberament local, com *sparks* de calci, o esdeveniments globals, com ones de calci. Això pot tenir un efecte important quan s'estudia la resposta homeostàtica de la cèl·lula. Per superar aquestes deficiències, en aquest projecte vam proposar desenvolupar un model detallat de la dinàmica del calci en cèl·lules auriculars humanes, que tingui en compte la distribució dels clústers de RyR en la cèl·lula i permeti l'estudi dels esdeveniments d'alliberament de calci subcel·lular.

## 2. Resultats obtinguts

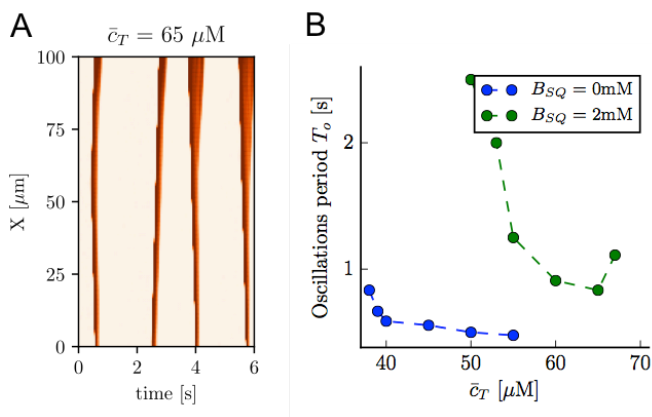
### 1) Estudi de les conseqüències funcionals de les alteracions en el tampó de calci mediat per CSQ, l'activitat de SERCA i l'activació de RyR2.

Utilitzant models auriculars humans ja publicats i validats, hem fet simulacions per a un conjunt de variacions en aquests paràmetres, tant individualment com combinades. Posteriorment hem mesurat els canvis en el calci citosòlic, tant sistòlic com diastòlic, en les concentracions de calci en l'SR (lliure i unit a CSQ), en la fracció d'alliberament de l'SR i en la durada del potencial d'acció (APD). Trobem que un canvi en la velocitat màxima de recaptació de SERCA té poc efecte en si mateix, excepte a velocitats d'estimulació ràpides. Un augment en la capacitat del tampó CSQ augmenta la concentració de calci diastòlic SR, així com el contingut global de calci, mentre que un augment en l'activitat del RyR té els efectes oposats. A més de l'interès intrínsec de comprendre com les variacions en els factors reguladors de l'ús del calci poden donar lloc a canvis en l'homeòstasi del calci i la forma i durada del potencial d'acció, ens hem centrat en un cas específic: una menor expressió de PITX2, que s'ha observat que dona com a resultat una reducció de la conductància màxima d' $I_{CaL}$ , una sobreexpressió de Casq2, Atp2a2 i un augment de l'activitat del RyR. Seguint els resultats experimentals de Lozano-Velasco *et al.*, Cardiovasc Res, 2016, considerem una disminució del 30% en la conductància màxima d' $I_{CaL}$  i un augment de l'activitat de RyR, SERCA i CSQ. Això dona com a resultat nivells més baixos de concentracions de calci citosòlic i SR, en comparació amb el WT, mentre que la concentració total de calci en l'SR (lliure i lligat a CSQ) augmenta.



**Figura.** Comparació del model original de Grandi (WT) i el modificat per tenir en compte la deficiència de PITX2.

A continuació, es va abordar l'efecte d'aquests canvis homeostàtics en l'aparició d'ones de calci. Així, vam fer simulacions del model de calci subcel·lular desenvolupat en aquest projecte amb diferents nivells de concentració mitjana de calci i del tampó de calsequestrina (CSQ). S'observa que quan la càrrega de calci augmenta, el sistema comença a mostrar espontàniament ones de calci. Aquestes ones persisteixen en el temps amb formes i duracions diferents, tot donant lloc a una oscil·lació gairebé periòdica en el senyal de calci global. Aproximadament, s'observa una ona de calci per segon. Les ones s'inicien normalment en llocs diferents cada vegada, però apareixen sistemàticament. En reduir la concentració de CSQ, les oscil·lacions apareixen a valors inferiors de concentració mitjana total, tenen una freqüència més alta i el rang d'oscil·lacions esdevé més ampli.



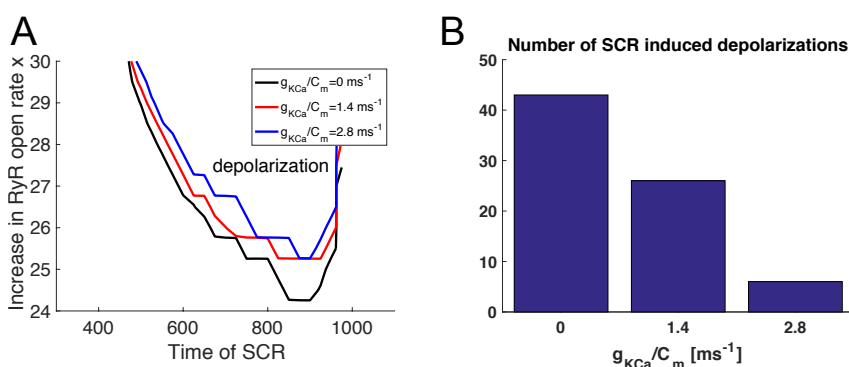
**Figures. A)** Line-scan que mostra l'aparició d'ones de calci periòdiques. **B)** Període mitjà d'oscil·lacions a diferents valors de la concentració mitjana de calci  $c_T$ , per a una concentració de CSQ de  $B_{SQ} = 2 \text{ mM}$  (punts verds) i en absència de CSQ (punts blaus).

## 2) Interrelació entre la regulació de la calor i els canals SK3 en el control de l'activitat elèctrica auricular.

Hem efectuat un estudi dels diferents models existents per als canals SK3 i els seus efectes per a la forma del potencial d'acció. El corrent es modelitza assumint una dependència òhmica del voltatge de membrana i una porta d'activació per als canals SK, l'estat estacionari del qual presenta una dependència sigmoïdal del calci intracel·lular a l'espai subsarcolemmal. Hem introduït aquest corrent en quatre models auriculars humans diferents i hem estudiat els canvis resultants en APD, homeòstasi de calci, etc., per a diferents valors dels paràmetres del corrent: conductància màxima, exponent de Hill d'activació, concentració mitjana d'activació i temps d'activació. El

corrent de potassi activat per calci,  $I_{KCa}$ , té el seu efecte esperat de disminuir la durada del potencial d'acció (APD), però aquesta reducció només es pot apreciar a freqüències majors a 1 Hz. Els resultats obtinguts amb el model de Lugo *et al.* mostren una gran dependència del corrent  $I_{KCa}$  amb la seva conductivitat i el tipus de dinàmica de la porta. Un canvi en la sensibilitat al calci dels canals, en canviar la constant d'activació de  $Ca^{2+}$ ,  $K_{KCa}$ , també mostra dos règims diferents. Amb  $K_{KCa}$  per sobre de  $\sim 500$  nM, reduir la sensibilitat del canal (augmentar  $K_{KCa}$ ) no canvia gaire el valor de l'APD. Pel contrari, disminuir-lo per sota d'aquest valor produeix una reducció ràpida de l'APD. En introduir el corrent  $I_{KCa}$  en altres models auriculars, com Nygren, Courtemanche i Grandi, hem observat que els efectes del corrent són qualitativament similars.

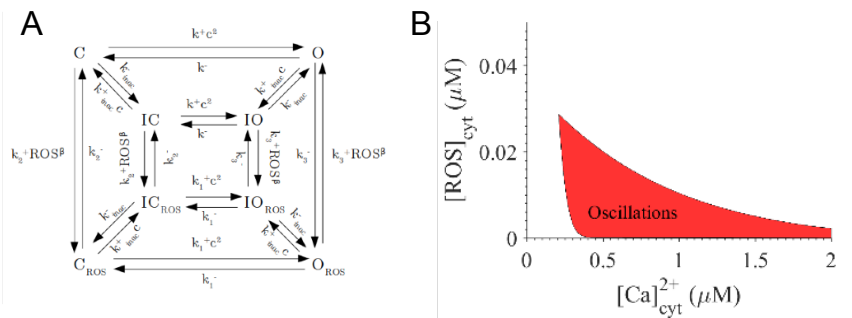
Després hem estudiat si la presència d'un fort corrent d' $I_{KCa}$  podria evitar els efectes proarrítmics (EAD, DAD) dels esdeveniments d'alliberament espontani de calci (SCR). Hem inclòs SCR en les simulacions tot permetent l'obertura dels receptors de rianodina en moments aleatoris. Hem comparat condicions similars amb i sense corrent d' $I_{KCa}$  i s'observa que, de fet, els corrents d' $I_{KCa}$  redueixen l'efecte d'SCR en les extradespolaritzacions. La presència del corrent  $I_{KCa}$  prevé les despolaritzacions induïdes per SCR en una regió estreta de paràmetres, però això sembla suficient per reduir la possibilitat de despolaritzacions induïdes. No obstant això, no és clar si aquest efecte protector prové del corrent mateix que contraresta l'efecte del bescanviador de sodi i calci, o del canvi en el potencial de repòs, que presumiblement afecta el període refractari.



**Figures. A)** Esdeveniments de despolarització en funció del temps i la força d'SCR, per a diferents valors de la conductància d' $I_{KCa}$ . **B)** Nombre de despolaritzacions en una simulació amb 1.000 estimulacions i un període d'estimulació de  $T = 1.000$  ms, on es produeix un esdeveniment SCR en un moment triat a l'atzar en cada període d'estimulació.

### **3) Modificació del model de miòcits auriculars per investigar com l'acoblament electromecànic modifica l'activitat elèctrica auricular.**

Existeix evidència creixent del paper potencial de l'estrès oxidatiu en la patogènesi de la FA. La producció excessiva d'espècies reactives d'oxigen (ROS) probablement està involucrada en la remodelació estructural i elèctrica del cor. L'estirament auricular pot augmentar la producció de ROS i afectar la probabilitat d'obertura del RyR, tot donant com a resultat l'aparició d'alliberaments espontanis de calci i ones de calci. Hem introduït aquest efecte modificant la descripció del RyR2, de manera que la transició entre els seus diferents estats depèn de la quantitat d'espècies reactives d'oxigen (ROS). A més, considerem que el RyR pot estar en estats oxidats, amb una major probabilitat d'obertura. Hem fet simulacions introduint aquest nou model per a l'activació del RyR en un model de calci. Trobem que un augment en el nivell de ROS dona lloc a oscil·lacions espontànies de calci en una àmplia gamma de paràmetres. Posteriorment hem introduït aquesta descripció de l'efecte de ROS en el model subcel·lular desenvolupat en aquest projecte, amb la finalitat d'estudiar l'efecte d'un augment en la producció de ROS en la freqüència d'*sparks* i ones de calci espontànies. Per donar compte de la producció, difusió i degradació de ROS, es van fer algunes modificacions al model. Es va assumir que NOX2 produïa ROS a una velocitat constant en la membrana. El procés de difusió pel que fa a ROS es va establir amb la mateixa constant de difusió que el  $\text{Ca}^{2+}$ , però també vam tenir en compte la degradació amb una taxa de  $2 \cdot 10^3 \text{ms}^{-1}$ . Hem fet simulacions amb diferents magnituds de producció de ROS. Per a un valor basal baix de producció de ROS ( $j_{\text{ROS}} = 10^{-3} \text{M} \cdot \text{m} \cdot \text{ms}^{-1}$ ) el nombre observat d'*sparks* és baix. Per a valors creixents de la producció, s'observa un major nombre d'*sparks*, que també són de més amplitud. Dels nostres resultats es desprèn que el nombre d'*sparks* mostra una dependència de la concentració de ROS de la forma:  $N_{\text{sparks}} = a + b \log [\text{ROS}]$ . A més, quan la producció de ROS augmenta dos ordres de magnitud sobre el valor basal baix, apareixen ones de calci en la cèl·lula.



**Figures. A)** Model de vuit estats del RyR, incloent-hi els estats oxidats per ROS. Els quatre estats centrals estan inactivats i els quatre inferiors són els oxidats. Hi ha dos estats oberts, O i ORS. **B)** Regió d'existència d'oscil·lacions en funció de les concentracions citosòliques de  $\text{Ca}^{2+}$  i ROS.

#### 4) Introducció de l'estructura subcel·lular en el model auricular. Estudi de les condicions que donen lloc a esdeveniments locals d'alliberament de calci, ones de calci i despolaritzacions de membrana.

Hem desenvolupat un model detallat de la cèl·lula auricular, amb una discretització a escala submicromètrica, que ens permet estudiar l'efecte dels canvis en l'amplitud i la distribució dels clústers de RyR durant la FA, d'acord amb les dades experimentals disponibles en aquesta escala. Per a això, hem seguit diversos passos, tot definint:

1. L'estructura interna de la cèl·lula. Hem introduït la xarxa de túbuls transversals i axials (TAT) i hem estudiat l'efecte de les variacions en la quantitat de túbuls t (TT) i túbuls axials (AT).
2. La grandària i la forma dels clústers de RyR. Hem incorporat al model un algoritme per construir distribucions heterogènies de grandàries de clústers de RyR.
3. La dinàmica d'activació del RyR. Hem millorat els models existents d'activació del RyR mitjançant la identificació dels mecanismes d'inactivació del RyR.

Posteriorment hem modificat el model de calci subcel·lular per tenir en compte les condicions patològiques, com els canvis homeostàtics o l'estrès oxidatiu, explicats en els punts anteriors. També hem tingut accés a dades experimentals del grup de Leif Hove-Madsen, de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques Barcelona, CSIC, Barcelona, pel que fa a la distribució subcel·lular dels nivells de CSQ i la fosforilació de RyR en miòcits auriculars de pacients amb FA. Utilitzem el model de calci subcel·lular amb



algunes modificacions per incloure la modulació de l'obertura del RyR pel nivell de CSQ i la fosforilació del RyR2 observada en els experiments. La modelització matemàtica tenint en compte aquesta distribució espacial de CSQ, RyR2 i fosforilació mostra un augment diferencial en els esdeveniments d'alliberament de calci al subsarcolemma que afavoreixen l'intercanvi de Na-Ca i, en conseqüència, una major incidència i amplitud dels corrents transitoris interns, la qual cosa es tradueix en una major incidència de DADs o APs espontanis, que poden afectar l'activitat elèctrica normal.

### **3. Rellevància i possibles implicacions futures**

Els resultats d'aquest projecte tindran un impacte en el coneixement dels mecanismes subjacents de les arrítmies cardíques, i més específicament la fibril·lació auricular (FA). Una de les principals preguntes sobre la FA és com la remodelació auricular que l'acompanya afecta la recurrència dels episodis de FA fins que es torna permanent. El nou model auricular humà desenvolupat en aquest projecte pot ajudar a predir com les alteracions estructurals i moleculars a nivell subcel·lular poden afectar l'homeòstasi del calci i l'activitat elèctrica espontània. En particular, en aquest projecte hem estudiat l'impacte de diversos elements que es modifiquen durant la remodelació (corrent de potassi activada per calci, espècies oxidatives reactives, canvis en la fosforilació i concentració de tampó de calsequestrina, etc.) i com això afecta el nombre d'esdeveniments d'alliberament espontani de calci, que poden provocar una despolarització retardada que pot interrompre l'activitat elèctrica normal. Per tant, els models que hem desenvolupat es poden considerar models *in silico*, que poden usar-se, en una primera etapa, per comprendre els diferents factors que afecten la FA o per provar els efectes de nous tractaments farmacològics.

### **4. Bibliografia científica generada**

#### **Publicacions**

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 (sotmès a revisió).*

Marchena M, Echebarria B, Shiferaw Y, Alvarez-Lacalle E.  
*Buffering and total calcium levels determine the presence of oscillatory regimes in cardiac cells (sotmès a revisió).*

Marchena M, Echebarria B.  
*Influence of t-tubular network on the characteristics of calcium transients in cardiac myocytes (sotmès a revisió).*

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 (sotmès a revisió).*

A més, s'han presentat 10 comunicacions relacionades amb aquest projecte en conferències i congressos.

### **Tesis doctorals i formació d'estudiants**

Miquel Marchena presentarà pròximament la seva tesi doctoral centrada en l'estudi d'aquest projecte. Miquel Marchena va ser contractat amb l'ajut concedit per la Fundació La Marató de TV3.

A més, s'han dirigit tres treballs de màster: Miquel Marchena (2016), Nikolina Krizanec (2017), David Conesa (2019) i dos treballs finals de grau: David Conesa (2018) i Miquel Bosch (2019), associats a aquest projecte.