

Estudio mediante simulación de la regulación del calcio intracelular en cardiomiocitos caninos

E. Renú Carretero, J.M. Ferrero de Loma-Ororio

Ci2B, Universitat Politècnica de València, Valencia, España, estefaniarenu@gmail.com, cferrero@ci2b.upv.es

Resumen

La regulación del calcio intracelular (Ca_i) en los cardiomiocitos es crucial debido a su relación con la contractilidad celular y la arritmogénesis. Las intervenciones farmacológicas y/o las mutaciones que afecten al nivel de expresión de canales iónicos pueden alterar las corrientes iónicas y, en consecuencia, el manejo del Ca_i . Debido a la dificultad para realizar un análisis sistemático del efecto de las variaciones de las corrientes iónicas utilizando únicamente medios experimentales, hemos llevado a cabo simulaciones computacionales con el fin de caracterizar los efectos de las alteraciones en los canales iónicos en determinados parámetros del Ca_i en cardiomiocitos de perro. Empleando el modelo de Decker-Rudy, se han simulado tanto potenciaciones como bloqueos de los canales iónicos, bombas e intercambiadores del sarcolema y del retículo sarcoplásmico utilizando valores desde el 0% al 200% respecto a sus valores de control. Posteriormente, se realizó un análisis de sensibilidad de los efectos de estas variaciones en una serie de parámetros del Ca_i a distintas frecuencias de estimulación. Nuestros resultados muestran que tanto la bomba SERCA como la bomba Na^+-K^+ son claves controlando el calcio diastólico (CaD), calcio sistólico (CaS), la duración transitoria de calcio (CaTD90) y la máxima velocidad de ascenso (CaDotMax). Otros factores relevantes son la corriente a través de los canales de calcio tipo L y el intercambiador Na^+-K^+ presente en el sarcolema. A altas frecuencias de estimulación, la importancia de I_{CaL} es más significativa.

1. Introducción

La regulación del calcio intracelular es un proceso clave en la electrofisiología de los cardiomiocitos [1,2]. Por un lado, determina la contractilidad celular [1], pues el calcio intracelular es el principal regulador del acoplamiento excitación-contracción miocárdico. Por otro lado, está íntimamente relacionada con la arritmogénesis, ya que la sobrecarga de calcio puede desencadenar una despolarización celular anormal [2,3]. Los cambios dinámicos en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) durante el potencial de acción son complejos. Tras la despolarización celular al inicio de un potencial de acción (PA), el calcio entra en la célula a través de los canales de calcio tipo L. Esto desencadena una liberación masiva de calcio desde el retículo sarcoplásmico (RS) al citosol a través de los receptores de rianodina, un proceso que puede elevar $[Ca^{+2}]_i$ alrededor de una orden de magnitud comparado con su valor basal (nivel diastólico de calcio). Tras el máximo de $[Ca^{+2}]_i$ (alcanzando su nivel sistólico), disminuye lentamente debido a (a) salida hacia el medio extracelular a través del intercambiador sodio-calcio (NCX) localizado en el sarcolema, y (b) entrada al RS a través de la bomba SERCA [4].

En las últimas dos décadas, el modelado matemático y las simulaciones computacionales han sido herramientas muy potentes utilizadas para lograr una mejor comprensión de los mecanismos intrínsecos relacionados con la electrofisiología celular de los cardiomiocitos (ver [5] para ampliar información). Estos estudios computacionales se basan en modelos matemáticos detallados y exhaustivos de potenciales de acción para distintas especies animales [6-8], incluyendo la humana [9]. Utilizando estos modelos, distintos estudios han conseguido caracterizar la influencia de las diferentes corrientes iónicas del sarcolema y del RS en el potencial de acción y biomarcadores preclínicos de Ca^{+2} intracelular [10, 11], pero ninguno de ellos se ha llevado a cabo en perro, un animal que ha sido ampliamente utilizado en el pasado en estudios sobre el efecto de fármacos y mutaciones [12, 13].

En este estudio, hemos hecho uso de un modelo existente muy conocido de potencial de acción y corrientes iónicas de un miocito ventricular de perro [7] para realizar posteriormente un análisis de sensibilidad con el fin de dilucidar los mecanismos iónicos que afectan a la regulación del Ca^{+2}_i .

2. Material y Métodos

El potencial de acción, corrientes iónicas subyacentes y los cambios dinámicos en las concentraciones iónicas de un miocito ventricular canino fueron simulados empleando una versión modificada del modelo de Decker-Rudy [7, 13], el cual incluye una formulación detallada de la dinámica del calcio. Se realizó un análisis de sensibilidad aplicando variaciones de un paso de tiempo en las corrientes iónicas presentes en la membrana del RS y del sarcolema. Específicamente, cada corriente se multiplicó por 0 (bloqueo completo), 0.3, 0.7, 1 (sin cambios) y 2 con tal de estudiar su impacto en biomarcadores relacionados con el calcio. Estos cambios podrían representar el efecto de fármacos o mutaciones, o simplemente variabilidad fisiológica interindividual [14]. Las simulaciones se llevaron a cabo a tres frecuencias de estimulación diferentes (1 Hz, 2 Hz y 3 Hz) y corrieron hasta alcanzar un estado estable. Los biomarcadores de calcio que se midieron incluían concentraciones de Ca^{+2} intracelular sistólica (CaS) y diastólica (CaD), duración transitoria de calcio a un 30% de recuperación (CaTD30) y a un 90% de recuperación (CaTD90), y la máxima velocidad de ascenso (CaDotMax).

La sensibilidad entre la variación de corriente más severa y la condición de “sin cambios” fue calculada tal y como se explica en [10]. Finalmente, las sensibilidades fueron normalizadas respecto a la máxima sensibilidad absoluta para cada biomarcador [10].

3. Resultados y Discusión

Las Figuras 1 y 2 muestran ejemplos representativos de los resultados de las simulaciones para dos corrientes iónicas que mostraron una mayor influencia en los biomarcadores de calcio: I_{NaK} (bomba Na^+-K^+ , Fig. 1) e I_{up} (bomba SERCA, Fig. 2). Los paneles superiores de estas figuras muestran registros de potencial de acción, mientras que los paneles inferiores representan transitorios de calcio intracelular. Las tres curvas en cada panel representan una simulación control (líneas sólidas), una simulación en la cual la corriente iónica correspondiente había sido parcialmente bloqueada ($\times 0.7$, líneas discontinuas) y una tercera en la cual la corriente fue potenciada ($\times 2$, líneas punteadas).

Los resultados observados en las figuras indican que, por lo general, las variaciones en las corrientes iónicas tienen un mayor impacto en los transitorios de calcio intracelular que en el potencial de acción en sí mismo. Por ejemplo, bloquear la bomba Na^+-K^+ un 30% reduce la duración del PA (APD) ligeramente pero aumenta la concentración máxima de calcio sistólico (CaS) un 219%. De manera similar, si la corriente de la bomba es duplicada, el APD aumenta levemente, mientras que el CaS disminuye un 71% respecto a su valor control. Un efecto similar se observa cuando la corriente de la bomba SERCA varía (Figura 2).

Las variaciones en el resto de corrientes iónicas afectan a los biomarcadores de calcio en una menor proporción y con diferentes tendencias. El caso de I_{Kr} (Fig. 4) tenía un particular interés: las variaciones en esta corriente, la cual es un objetivo farmacológico muy común, cambiaron el APD considerablemente pero, por el contrario, apenas tuvieron efecto en los biomarcadores de calcio.

Los resultados obtenidos en el análisis de sensibilidad fueron luego compilados y representados en la Figura 3 para dos frecuencias de estimulación distintas (1 Hz, correspondiendo a una longitud de ciclo básica (BCL) de 1000 ms, y 3 Hz, correspondiendo a un BCL de 333 ms). Las barras verticales representan los valores de los biomarcadores, normalizados respecto a sus valores de control (100%), como una función del factor multiplicativo de la corriente iónica. Únicamente se muestran los resultados de la corriente SERCA (I_{up}), pero se obtuvieron gráficas similares para cada corriente iónica. La figura destaca el efecto de la frecuencia de estimulación en la influencia de la bomba SERCA en la dinámica del calcio intracelular. Por ejemplo, un bloqueo completo de I_{up} tiene un efecto más pronunciado en el CaD a 3 Hz (aumento del 237%) que a 1 Hz (165%), y por el contrario, su influencia sobre el CaS es de un 72% y 100%, respectivamente.

Finalmente, los resultados mencionados anteriormente fueron normalizados y expresados como sensibilidades relativas, tal y como se explica en [10].

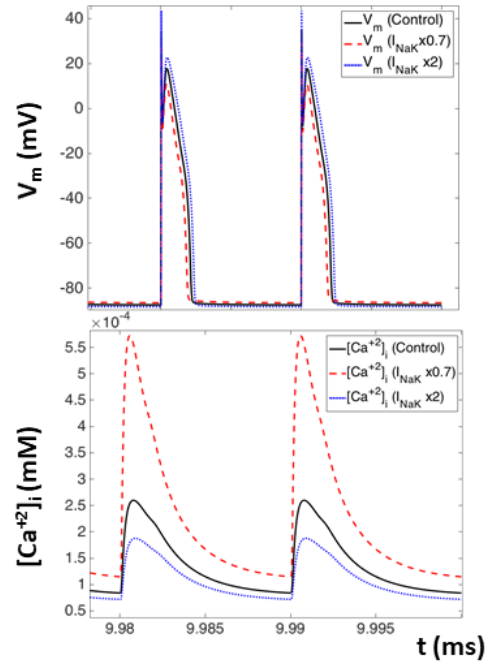


Figura 1. Potenciales de acción (panel superior) y transitorios de calcio intracelular (panel inferior) de la simulación control (línea continua negra), I_{NaK} bloqueada un 30% (línea discontinua roja) y potenciación de un 100% de I_{NaK} (línea de puntos azul)

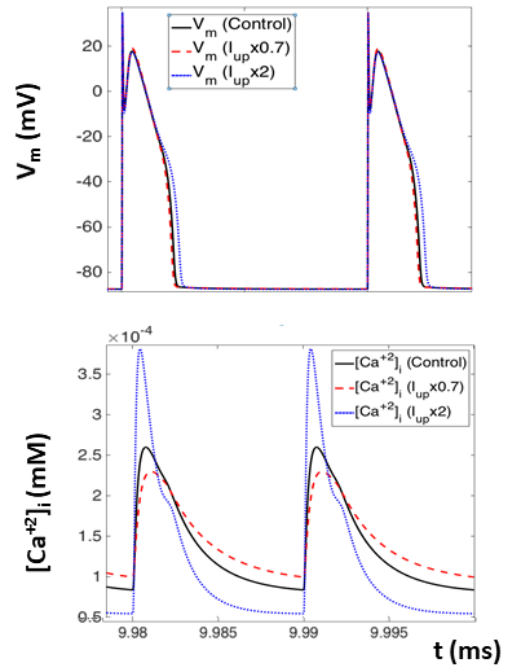


Figura 2. Potenciales de acción (panel superior) y transitorios de calcio intracelular (panel inferior) de la simulación control (línea continua negra), bloqueo del 30% de I_{SERCA} (línea discontinua roja) y potenciación del 100% de I_{SERCA} (línea de puntos azul)

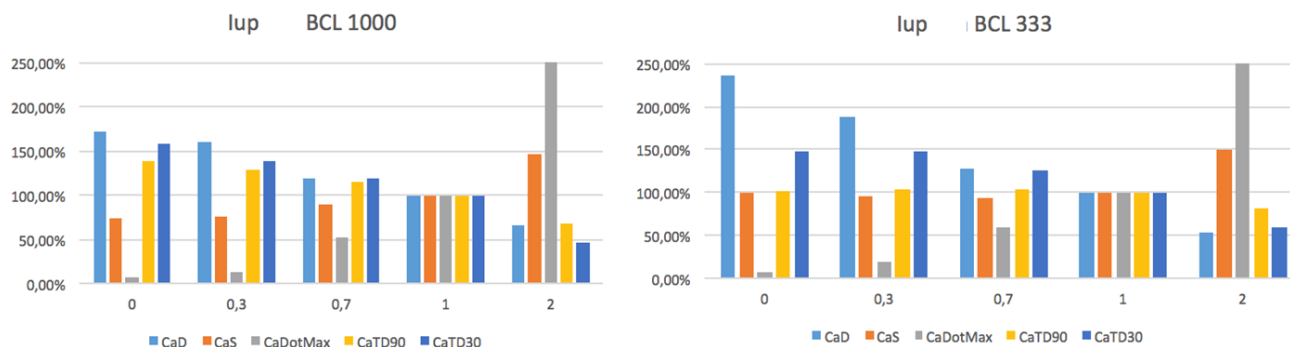


Figura 3. Resultados compilados del análisis de sensibilidad para el bloqueo (x_0 , $x_{0.3}$), control (x_1) y potenciación (x_2) de SERCA (I_{up}) a dos frecuencias de estimulación. Las barras muestran el valor relativo para cada biomarcador de calcio.

BCL 1000													
Rc,p	IKr	IKs	IK1	INa	INaL	INaK	INaCa_cai	INaCa_ss	ICaL	IpCa	Irel	lup	lto1
CaD	0,028	0,002	0,031	0,038	0,024	0,953	0,318	0,304	0,349	0,068	0,054	1,000	0,013
CaS	0,025	0,002	0,031	0,023	0,017	1,000	0,178	0,220	0,422	0,046	0,017	0,393	0,011
CaDotMax	0,020	0,002	0,026	0,017	0,014	1,000	0,160	0,187	0,370	0,038	0,035	0,827	0,019
CaTD90	0,189	0,038	0,071	0,009	0,123	0,433	0,033	0,056	0,320	0,012	0,069	1,000	0,007
CaTD30	0,378	0,030	0,111	0,043	0,194	0,575	0,074	0,087	0,486	0,003	0,110	1,000	0,065

Tabla 1. Sensibilidades relativas de los biomarcadores de calcio respecto a cambios en las corrientes iónicas a una frecuencia de estimulación de 1 Hz.

BCL 500													
Rc,p	IKr	IKs	IK1	INa	INaL	INaK	INaCa_cai	INaCa_ss	ICaL	IpCa	Irel	lup	lto1
CaD	0,009	0,001	0,034	0,061	0,037	0,880	0,220	0,219	0,437	0,056	0,037	1,000	0,003
CaS	0,017	0,001	0,030	0,032	0,018	1,000	0,084	0,121	0,541	0,030	0,010	0,148	0,004
CaDotMax	0,014	0,001	0,025	0,025	0,015	1,000	0,073	0,103	0,559	0,025	0,016	0,373	0,008
CaTD90	0,101	0,002	0,089	0,084	0,123	0,869	0,024	0,077	0,728	0,020	0,050	1,000	0,048
CaTD30	0,120	0,008	0,061	0,053	0,038	0,900	0,190	0,238	0,786	0,050	0,111	1,000	0,042

Tabla 2. Sensibilidades relativas de los biomarcadores de calcio respecto a cambios en las corrientes iónicas a una frecuencia de estimulación de 2 Hz.

BCL 333													
Rc,p	IKr	IKs	IK1	INa	INaL	INaK	INaCa_cai	INaCa_ss	ICaL	IpCa	Irel	lup	lto1
CaD	0,014	0,001	0,043	0,071	0,029	1,000	0,131	0,157	0,568	0,047	0,020	0,663	0,018
CaS	0,038	0,002	0,059	0,065	0,021	1,000	0,082	0,144	0,792	0,040	0,011	0,194	0,011
CaDotMax	0,010	0,001	0,015	0,015	0,004	1,000	0,020	0,034	0,412	0,010	0,005	0,114	0,003
CaTD90	0,250	0,040	0,191	0,072	0,057	0,919	0,070	0,143	0,933	0,012	0,116	1,000	0,033
CaTD30	0,010	0,001	0,022	0,070	0,048	1,000	0,205	0,308	0,749	0,063	0,041	0,879	0,0003

Tabla 3. Sensibilidades relativas de los biomarcadores de calcio respecto a cambios en las corrientes iónicas a una frecuencia de estimulación de 3 Hz.

Para cada biomarcador, la corriente cuyas variaciones tengan un mayor efecto sobre el mismo, tendrán un valor de referencia de 1.0, por lo que el efecto de las variaciones del resto de corrientes recibirá un valor entre 0 y 1. Los resultados están recogidos en la Tabla 1 (para 1 Hz, BCL = 1000 ms), Tabla 2 (2 Hz, BCL = 500 ms) y Tabla 3 (3 Hz, BCL = 333 ms). Los números en negrita indican una relación directa (esto es, el biomarcador aumenta con el factor multiplicativo), mientras que los números en cursiva indican una relación inversa. Los

tonos más oscuros indican la sensibilidad más fuerte de cada fila (valor igual a 1), mientras que los tonos más suaves corresponden a una falta de dependencia entre el biomarcador y el factor multiplicativo (valor igual a 0).

Los resultados que se muestran en las tablas indican que la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (I_{NaK}), la corriente a través de los canales de calcio tipo L (I_{CaL}) y la bomba SERCA (I_{up}) son las tres corrientes con mayor impacto sobre los biomarcadores de calcio. Sorprendentemente, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ sólo presenta una leve influencia

en la dinámica del calcio (lo cual concuerda con resultados experimentales recientes [15]), así como ocurre con la corriente de liberación de RyR en el RS (I_{rel}). El resto de las corrientes del sarcolema juegan un papel muy poco significativo.

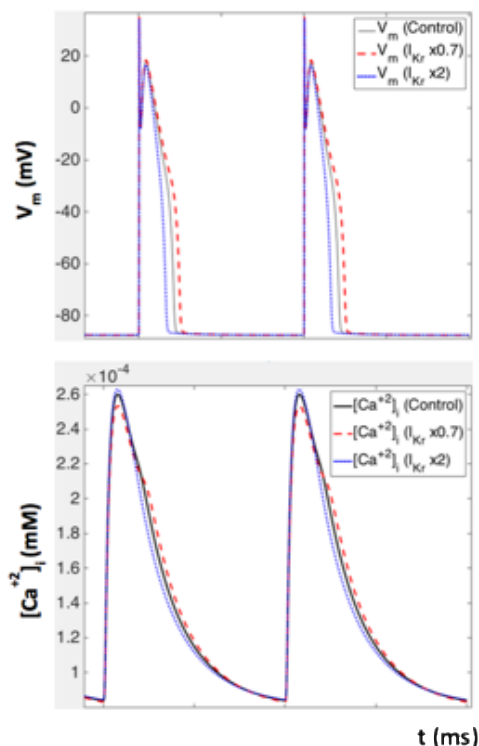


Figura 4: Potenciales de acción (panel superior) y transitorios de calcio intracelular (panel inferior) de la simulación control (línea continua negra), bloqueo del 30% de I_{Kr} (línea discontinua roja) y potenciación del 100% de I_{Kr} (línea de puntos azul)

4. Conclusión

Según los resultados de nuestras simulaciones, las corrientes iónicas que presentan una mayor influencia en los transitorios de calcio intracelular durante un potencial de acción cardíaco ventricular canino son la bomba Na^+/K^+ , la corriente a través de los canales de calcio tipo L y la bomba SERCA, jugando el resto de corrientes del sarcolema y del RS un papel menor.

Habiendo obtenido estos resultados, se plantea la posibilidad de buscar aquellos fármacos cuyo efecto sea el simulado mediante los distintos factores de bloqueo empleados, así como la búsqueda de aquellas mutaciones que podrían causar una sobreexpresión o inhibición de determinados canales iónicos con una mayor afectación respecto al calcio intracelular.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido apoyado parcialmente por la Dirección General de Política Científica de la Generalitat Valenciana (PROMETEO 2016/088), y por el “Plan Estatal de Investigación Científica y Tecnológica y de

Innovación 2013-2016” del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad de España (DPI2016-75799-R) y AEI/FEDER, UE.

Referencias

- [1] Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res.* 2017 Jul 7;121(2):181-195.
- [2] Ter Keurs HEDJ, Boyden PA. Calcium and Arrhythmogenesis. *Physiol Rev.* 2007 Apr; 87(2): 457–506.
- [3] Piacentino V, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, et al. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res.* 2003;92(6):651–8.
- [4] Bers DM, Shannon TR. Calcium Movements Inside the Sarcoplasmic Reticulum of Cardiac Myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 May; 58: 59–66.
- [5] Trénor B, Romero L, Cardona K, Gomis J, Saiz J, Ferrero JM. Multiscale Modeling of Myocardial Electrical Activity: From Cell to Organ. *Applied Biomedical Engineering*, Dr. Gaetano Gargiulo (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/22907.
- [6] Luo CH, Rudy Y. A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction. *Circ Res.* 1991 Jun;68(6):1501
- [7] Decker KF, Heijman J, Silva JR, Hund TJ, Rudy Y. Properties and ionic mechanisms of action potential adaptation, restitution, and accommodation in canine epicardium. 1D simulation study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Apr;296(4):H1017-26.
- [8] Shannon TR, Wang F, Puglisi J, Weber C, Bers DM. A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocyte. *Biophys J.* 2004 Nov;87(5):3351–71.
- [9] O’Hara T, Virág L, Varró A, Rudy Y. Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: Model formulation and experimental validation. *PLoS Comput Biol.* 2011;7(5).
- [10] Romero L, Carbonell B, Trenor B, Rodríguez B, Saiz J, Ferrero JM. Systematic characterization of the ionic basis of rabbit cellular electrophysiology using two ventricular models. *Prog Biophys Mol Biol.* 2011 Oct;107(1):60-73.
- [11] Gomez JF, Cardona K, Romero L, Ferrero JM, Trenor B. Electrophysiological and structural remodeling in heart failure modulate arrhythmogenesis. 1D simulation study. *PLoS One.* 2014;9(9).
- [12] Antzelevitch C, Belardinelli L et al. Electrophysiologic Effects of Ranolazine. A Novel Anti-Anginal Agent with Antiarrhythmic Properties. *Circulation.* 2004 Aug 24; 110(8): 904–910.
- [13] L Virág, N Jost, R Papp, I Koncz, A Kristóf, Z Kohajda, G Harmati, B Carbonell-Pascual, JM Ferrero Jr, JG Papp, PP Nánási, and A Varró. Analysis of the contribution of Ito to repolarization in canine ventricular myocardium. *Br J Pharmacol.* 2011 Sep; 164(1): 93–105.
- [14] Muszkiewicz A, Britton OJ, Gemmell P, Passini E, Sánchez C, Zhou X, Carusi A, Quinn TA, Burrage K, Bueno-Orovio A, Rodriguez B. Variability in cardiac electrophysiology: Using experimentally-calibrated populations of models to move beyond the single virtual physiological human paradigm. *Prog Biophys Mol Biol.* 2016 Jan;120(1-3):115-27.
- [15] Kohajda Z, et al. The Effect of a Novel Highly Selective Inhibitor of the Sodium/Calcium Exchanger (NCX) on Cardiac Arrhythmias in In Vitro and In Vivo Experiments. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0166041.