

Estudio Mediante Simulación de la Influencia de las Mitocondrias en la Dinámica del Calcio en Cardiomiocitos

A. Asensio, J.M. Ferrero

Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería (Ci2B), Universitat Politècnica de València, Valencia, España,
{aiasor@etsii.upv.es, cferrero@eln.upv.es}

Resumen

La regulación de calcio intracelular (Ca_i) en cardiomiocitos es crítica debido a su relación con la contractilidad de la célula y la arritmogénesis. Aunque las mitocondrias juegan un papel importante en la regulación de Ca_i , pocos modelos matemáticos del potencial de acción y las corrientes iónicas incluyen estos orgánulos. En el presente trabajo, se han introducido las mitocondrias en un modelo computacional de potencial de acción de cardiomiocito aislado de conejo con el objetivo de estudiar su influencia en la regulación de Ca_i . El modelo incluye un uniportador de calcio, un intercambiador sodio-calcio y un buffer intramitocondrial. Se han llevado a cabo simulaciones en las que se compararon los resultados obtenidos para los biomarcadores de Ca_i en presencia y ausencia de mitocondrias en el modelo. En algunas simulaciones se alteraron ciertas corrientes iónicas para simular el efecto de fármacos o mutaciones en la célula. Nuestros resultados sugieren que la ausencia de mitocondrias en modelos computacionales de potencial de acción introduce errores significativos en la simulación de la regulación de Ca_i , especialmente en condiciones en que las corrientes iónicas están alteradas.

1. Introducción

La regulación calcio intracelular es un proceso clave en los cardiomiocitos [1,2]. Por un lado, modula la contractilidad celular [1] debido a que el calcio intracelular es el principal mecanismo regulador del acoplamiento excitación-contracción miocárdico. Por otro lado, está muy relacionada con la arritmogénesis debido a que una sobrecarga de calcio puede provocar una despolarización anormal de la célula [2,3] e iniciar así una arritmia reentrante. Los cambios temporales de concentración de calcio intracelular ($[Ca_i]$) durante el potencial de acción (PA) son, ciertamente, complejos. Tras la despolarización celular al inicio del potencial de acción, el calcio entra en la célula a través de 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 la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) en casi en un orden de magnitud respecto a su valor basal o diastólico. Después del pico de $[Ca^{2+}]_i$ (alcanzando su nivel sistólico), éste desciende más lentamente gracias a su extracción al medio extracelular a través del intercambiador sodio-calcio (NCX) del sarcolema, y también de su recaptación por parte del RS a través de la bomba SERCA [4].

Es sabido que las mitocondrias tienen también un papel fundamental en la regulación de calcio intracelular [4,5]. Las mitocondrias se comportan como un almacén de calcio que puede intercambiar este ion con el citosol, principalmente a través de dos mecanismos de transporte de calcio presentes en la membrana mitocondrial: un uniportador de calcio [7] y un intercambiador sodio-calcio mitocondrial [8].

En las últimas dos décadas, el modelado matemático y la simulación computacional se han convertido en una potente herramienta utilizada para comprender mejor los mecanismos íntimos que explican la electrofisiología celular [9]. Estos estudios computacionales se apoyan en detallados y complejos modelos matemáticos de potencial de acción para diferentes especies animales [10-12], incluyendo modelos humanos [13]. Sin embargo, pocos de estos modelos incluyen una formulación del compartimento mitocondrial y su efecto en las dinámicas del ion calcio. Es más, todavía no existe un conocimiento teórico del error introducido por la ausencia de las mitocondrias en los modelos.

En el presente estudio, se ha introducido un nuevo modelo de las corrientes de calcio mitocondriales en un modelo ya existente de potencial de acción y corrientes iónicas de cardiomiocito ventricular de conejo [12]. Se ha utilizado este modelo integrado para llevar a cabo un análisis de sensibilidad con el objetivo de deducir los mecanismos iónicos que influyen en la regulación de calcio intracelular, tanto en ausencia como en presencia de mitocondrias en el modelo. Los resultados revelan que la ausencia de mitocondria en los modelos de PA “clásicos” introduce errores significativos en las simulaciones que pueden llegar a alcanzar, en algunos casos, el 21%.

2. Métodos

El potencial de acción, dependiente de las corrientes iónicas y de los cambios dinámicos de concentraciones iónicas en un cardiomiocito ventricular de conejo aislado, fue simulado utilizando una versión modificada del modelo de Shannon-Bers [12], que incluye una formulación muy detallada de la dinámica intracelular de calcio. Por un lado, se introdujo una formulación dinámica de la concentración intracelular de potasio (la cual es constante en el modelo original). Por otro lado, se introdujeron en el modelo ecuaciones que describen la influencia de las mitocondrias en la regulación

intracelular de calcio. En concreto, se utilizó el modelo de Kim *et al.* [14] para formular un modelo computacional del uniportador de calcio mitocondrial (I_{uni_mit}), el intercambiador sodio-calcio mitocondrial (I_{NCX_mit}) y el *buffer* de calcio intramitocondrial. Debido a que el modelo de Kim *et al.* se formuló para linfocitos B, los parámetros fueron ajustados a cardiomiocito de conejo utilizando datos experimentales de Lu *et al.* [15]. Las simulaciones se llevaron a cabo utilizando dos modelos diferentes (un modelo sin mitocondrias [modelo *noMit*] y un modelo con mitocondrias [modelo *Mit*]).

Se llevó a cabo un análisis de sensibilidad aplicando varios niveles de variación a las corrientes iónicas del sarcolemma y de la membrana del RS. En concreto, cada corriente fue multiplicada por 0.05, 0.5, 1.0 (control) y 2.0 con el objetivo de estudiar su efecto en los biomarcadores de calcio seleccionados. Estos cambios pueden representar el efecto de drogas o mutaciones, o simplemente la variabilidad fisiológica interindividual [16]. Todas las simulaciones se realizaron a 2 Hz y se mantuvieron hasta alcanzar la estabilidad. Los biomarcadores de calcio medidos incluyen el nivel sistólico (CaS) y diastólico (CaD) de $[Ca^{2+}]_i$, la duración del transitorio de Ca^{2+} al 80% de su recuperación ($CaTD80$) y el tiempo hasta el pico de $[Ca^{2+}]_i$ ($CaTTP$).

El cálculo de la sensibilidad entre las mayores variaciones de corrientes iónicas y la condición control se llevó a cabo como se explica en [17]. Finalmente, las sensibilidades se normalizaron al máximo absoluto de sensibilidad para cada biomarcador.

3. Resultados y discusión

Previamente a aplicar cualquier cambio a las corrientes iónicas, se llevó a cabo una simulación control utilizado ambos modelos (con y sin mitocondrias). Los resultados, representados en la Fig.1, muestran que la introducción de la mitocondria no cambia de forma notable la forma del PA (panel A) pero induce un ligero cambio en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ (panel B). El efecto en el CaS es prácticamente insignificante (0.1%), mientras que el CaD aumenta en un 2.6% en el modelo con mitocondria. Respecto a los parámetros de tiempo, $CaTD80$ y $CaTTP$ descienden un 2.0% y un 1.7%, respectivamente, en el modelo con mitocondria.

Con el objetivo de determinar si estos cambios se ven potenciados en condiciones en que las corrientes iónicas se ven alteradas, se realizó el análisis de sensibilidad mencionado anteriormente. Un ejemplo representativo de $[Ca^{2+}]_i$ se muestra en la Fig.2, donde el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ se muestra en condiciones control y con un bloqueo casi total del intercambiador NCX del sarcolemma ($\times 0.05$). La figura muestra que, al bloquear el NCX, el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ se desplaza hacia arriba. La introducción de las mitocondrias en el modelo reduce esta subida, disminuyendo el CaS en un 9%. Respecto al resto de biomarcadores, el CaD aumenta un 13%, el $CaTTP$ desciende un 20% y el $CaTD80$ desciende un 4% cuando las mitocondrias están presentes en el modelo. Estos

porcentajes deben entenderse como errores introducidos debido a la ausencia de mitocondria en el modelo.

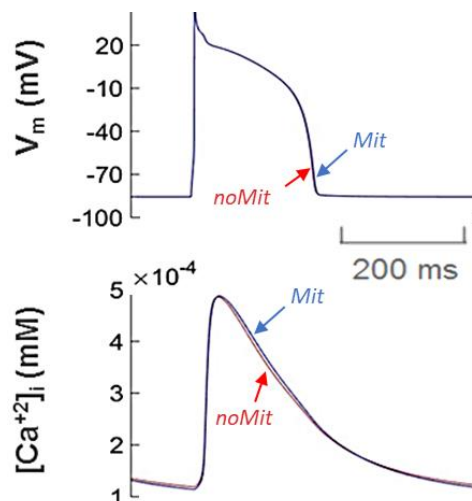


Figura 1. Potenciales de acción (panel superior) y transitorios de calcio intracelular (panel inferior) en presencia y ausencia de mitocondria (*Mit* y *noMit*, respectivamente).

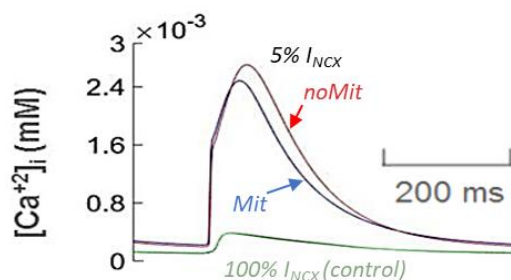


Figura 2. Transitorios de calcio intracelular en presencia y ausencia de mitocondria (*Mit* y *noMit*, respectivamente). Las dos trazas superiores corresponden con un bloqueo del 95% de la corriente del NCX del sarcolemma ($0.05 \times INCX$ en el modelo), mientras que las dos trazas inferiores corresponden con simulaciones control ($100\% INCX$).

Los resultados obtenidos en el análisis de sensibilidad fueron posteriormente compilados y se representan en la Fig.3, en la que se muestran los valores de los biomarcadores en el eje Y frente al factor multiplicativo aplicado a la corriente en el eje X para los cuatro biomarcadores medidos. En aras de la claridad, se han representado únicamente los efectos de las tres corrientes que más afectan a cada biomarcador. Las líneas continuas y líneas discontinuas corresponden a los resultados con y sin presencia de mitocondrias en el modelo, respectivamente.

Los resultados muestran que la corriente cuyas variaciones influyen en mayor medida sobre los biomarcadores de calcio es la corriente SERCA, exceptuando en el caso del CaS , donde la corriente del NCX del sarcolemma tiene un efecto mayor. Otras corrientes que afectan a los biomarcadores de calcio cuando se ven alteradas son la corriente de calcio tipo L y la corriente de extracción de calcio del RS a través de los canales RyR.

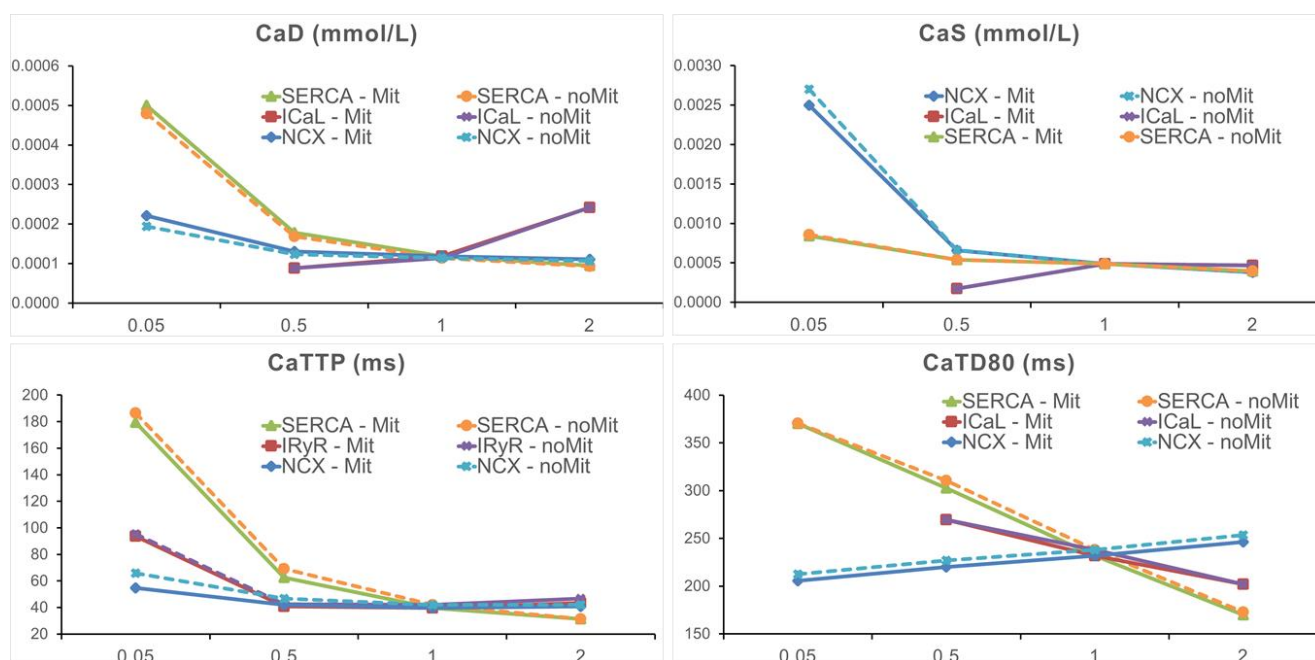


Figura 3. Resultados del análisis de sensibilidad. Cada panel muestra la variación de un biomarcador en función del factor multiplicativo aplicado a las corrientes iónicas. Las líneas discontinuas corresponden con el modelo sin mitocondrias, mientras que las líneas continuas corresponden al modelo que incluye los orgánulos.

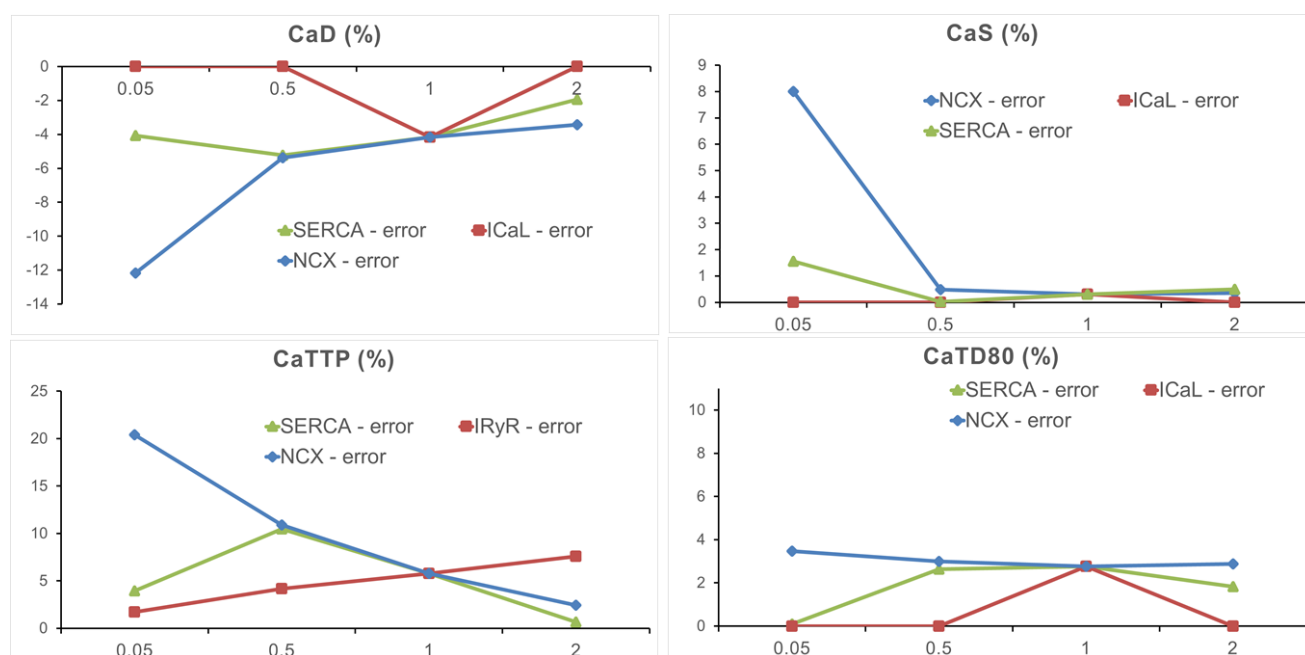


Figura 4. Resultados del análisis de sensibilidad de la Figura 3 mostrados como error relativo entre el modelo con mitocondrias y el modelo sin ellas.

La Figura 4, obtenida a partir de los valores mostrados en la Figura 3, muestra las diferencias entre los modelos con y sin mitocondrias. Estas diferencias se cuantifican como errores relativos, calculados como la diferencia entre los valores del biomarcador en los dos modelos normalizada por el valor del biomarcador en el modelo con mitocondria. Los valores se ofrecen en porcentaje en la figura. Como se observa en las curvas, los errores son particularmente grandes en algunos casos. Por ejemplo, un bloqueo del 95% ($\times 0.05$) de la corriente NCX, por

ejemplo, introduce un error de un 12.1% en el CaD y un error del 21.3% en el CaTTP entre los modelos con y sin mitocondrias. Al bloquear la SERCA, los errores pueden llegar al 5.4% (en el caso de CaD) y al 10.1% (para el CaTTP). Bloqueos y/o potenciaciones de otras corrientes introducen errores menores, como se aprecia en la Figura 4. Entre ellos, el bloqueo de la corriente de calcio a través de los canales tipo L puede causar un error del 2.9% en la CaS.

4. Conclusión

Atendiendo a los resultados, la ausencia de mitocondrias en un modelo computacional de potencial de acción puede introducir errores considerables en el transitorio intracelular de calcio simulado. Estos errores se ven magnificados cuando se alteran las corrientes iónicas y son más elevados bajo condiciones de variación de la corriente NCX del sarcolema y de la SERCA en el RS. Por tanto, la introducción de mitocondrias en los modelos de potencial de acción es altamente recomendable en casos en los que se simule la acción de fármacos y/o mutaciones y siempre que la dinámica intracelular de calcio sea relevante.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Beatriz Carbonell-Pascual por su participación en la génesis del trabajo.

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] Murgia M, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R. Controlling metabolism and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Jun;46(6):781-8.
- [6] Bers DM1, Bassani JW, Bassani RA. Competition and redistribution among calcium transport systems in rabbit cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 1993 Oct;27(10):1772-7.
- [7] Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.* 2004 Jan 22;427(6972):360-4.
- [8] Palty R, Silverman WF, Hershfinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvili D, Sekler I. NCLX is an essential component of mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 5;107(1):436-41.
- [9] 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.
- [10] Luo CH, Rudy Y. A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction. *Circ Res.* 1991 Jun;68(6):1501-26.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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).
- [14] Kim B, Takeuchi A, Koga O, Hikida M, Matsuoka S. Pivotal role of mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in antigen receptor mediated Ca^{2+} signalling in DT40 and A20 B lymphocytes. *J Physiol.* 2012 Feb 1;590(3):459-74.
- [15] Lu X1, Ginsburg KS, Kettlewell S, Bossuyt J, Smith GL, Bers DM. Measuring local gradients of intramitochondrial $[\text{Ca}(2+)]$ in cardiac myocytes during sarcoplasmic reticulum $\text{Ca}(2+)$ release. *Circ Res.* 2013 Feb 1;112(3):424-31.
- [16] 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.
- [17] 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.