

# Caracterización de la respuesta a la estimulación beta-adrenérgica en el síndrome LQT1

D. A. Sampedro-Puente<sup>1</sup>, J. Fernandez-Bes<sup>1,2</sup>, E. Pueyo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Grupo BSICoS, I3A, IIS Aragón, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España, {sampedro, jfbes, epueyo}@unizar.es

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), España

## Resumen

El síndrome de QT largo tipo 1 (LQT1) se asocia con mutaciones en los canales de la corriente rectificadora de potasio lenta,  $I_{Ks}$ . En este síndrome se ha documentado que la estimulación beta-adrenérgica ( $\beta$ -AS) conduce en numerosas ocasiones a eventos arritmicos. Sin embargo, no existe una descripción completa de los mecanismos iónicos subyacentes a la arritmogénesis asociada al LQT1 bajo condiciones de  $\beta$ -AS. En este trabajo, se ha desarrollado un conjunto de modelos estocásticos ventriculares humanos que reproducen las propiedades de potenciales de acción (AP) experimentales, tanto para condiciones de control como bajo bloqueos iónicos. Utilizando este conjunto de modelos ha podido demostrarse que tanto la duración del AP (APD) como su morfología y variabilidad latido-a-latido son muy dependientes de las características iónicas subyacentes. Del mismo modo, se ha observado que la respuesta de las células individuales a la simulación conjunta de bloqueo iónico de  $I_{Ks}$  y  $\beta$ -AS puede variar desde valores insignificantes a incrementos superiores al 200% en la variabilidad temporal del AP, siendo éste un reconocido marcador arritmogénico. Finalmente, por medio de un análisis de correlaciones parciales se han determinado los principales factores iónicos que favorecen los cambios en el AP asociados al síndrome de LQT1 bajo condiciones de  $\beta$ -AS.

## 1. Introducción

Los pacientes afectados por el síndrome de QT largo, enfermedad congénita que causa la prolongación anormal del intervalo QT, poseen un alto riesgo de experimentar arritmias potencialmente mortales. En los pacientes con la variante más común, el síndrome de QT largo tipo 1 (LQT1), el 90% de los eventos letales ocurren durante el estrés físico o emocional, condiciones asociadas a una mayor actividad simpática [1]. Por ello, encontrar marcadores que anticipen el riesgo proarrítmico en condiciones de LQT1 e identificar los mecanismos involucrados es esencial para el desarrollo de terapias individualizadas.

Estudios previos disponibles en la literatura han explorado anomalías potencialmente pro-arrítmicas en la duración y morfología de la repolarización ventricular en pacientes con LQT1, así como en experimentos animales que abordan esta canalopatía [2-3]. Se ha sugerido que la variabilidad latido-a-latido del potencial de acción (AP) ventricular y de la morfología de la onda T del electrocardiograma en respuesta a la estimulación simpática son marcadores de inestabilidad arrítmica en el síndrome LQT1 [4-5]. Sin embargo, es importante señalar que se han descrito reacciones muy variadas a la estimulación simpática y la generación de arritmias en

pacientes con la misma mutación LQT1 y también en animales en los que se ha inducido el síndrome LQT1 farmacológicamente.

En este estudio se han utilizado modelos computacionales estocásticos de la electrofisiología ventricular para investigar las respuestas individuales de las células humanas a la estimulación adrenérgica bajo condiciones de LQT1 y se han determinado los mecanismos subyacentes a dichas respuestas.

## 2. Métodos

### 2.1. Modelado y simulación del AP

El modelo ventricular humano propuesto por O'Hara *et al.* (ORd) [6] ha servido de base para construir un conjunto de modelos de AP seleccionados específicamente para cubrir una gama de características observadas experimentalmente. Se ha empleado el método *Latin Hypercube Sampling* para el muestreo de las conductancias, designadas como  $G$ , de las principales corrientes iónicas, entre las que se incluyen  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{CaL}$ ,  $I_{Na}$  e  $I_{K1}$ , dentro del rango de  $\pm 100\%$  de su valor nominal (refiriéndonos a estos incrementos o decrementos sobre el valor nominal como *sobrerregulación* e *infrarregulación*, respectivamente). El conjunto inicial de 100 modelos se redujo posteriormente a 35 modelos viables, eliminando aquellos que no reproducían las propiedades fisiológicas del AP en estado estacionario a distintas frecuencias de estimulación y en respuesta a bloqueos iónicos [7-9]. Cada uno de estos modelos representa una célula virtual con características iónicas diferenciadas.

Para investigar la variabilidad latido-a-latido de la repolarización observada en experimentos *in-vivo* e *in-vitro*, se ha añadido estocasticidad a cada uno de los modelos AP construidos. Específicamente, las ecuaciones que describen el comportamiento de apertura de los canales iónicos de  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{to}$  e  $I_{CaL}$  se modificaron añadiendo un término aleatorio inversamente proporcional a la raíz cuadrada del número de canales [10]. Este número de canales se obtuvo, para cada tipología iónica, dividiendo la conductancia global del modelo entre la conductancia iónica unitaria descrita experimentalmente [11-12].

Para simular el síndrome de LQT1 se bloqueó al 90% la corriente  $I_{Ks}$ . Los efectos de la estimulación beta-adrenérgica ( $\beta$ -AS) sobre la electrofisiología ventricular humana se modelaron utilizando el enfoque descrito en [13], calculando los niveles de fosforilación de los

sustratos celulares de proteína quinasa A (PKA) calculados de acuerdo a [14] y a las actualizaciones posteriores descritas en [15]. Se simuló una dosis de 1  $\mu\text{M}$  del agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol (ISO), nivel que conduce a efectos máximos.

La integración numérica se realizó por medio del método Euler-Maruyama, con un paso de tiempo  $dt = 0.02$  ms. Para asegurar la convergencia de los resultados, la longitud total de cada una de las simulaciones se definió en 2500 ciclos, con una frecuencia de estimulación de 1 Hz, donde los primeros 500 ciclos correspondieron a las condiciones de control, los siguientes 500 ciclos a condiciones de LQT1 y, finalmente, 1500 ciclos en los que se simularon condiciones conjuntas de  $\beta$ -AS y LQT1.

## 2.2. Marcadores del AP

Se evaluaron los siguientes marcadores derivados del AP, tradicionalmente empleados para caracterizar su duración y forma [11], en los últimos 100 ciclos de cada condición simulada (control, LQT1 y LQT1 junto con  $\beta$ -AS):

- Promedio de la duración del AP al 90% de repolarización (APD):

$$\text{APD} = \frac{1}{100} \sum_{n=1}^{100} \text{APD}_{90}(n) \quad (1)$$

donde  $\text{APD}_{90}(n)$  es la duración del AP al 90% de repolarización para el latido  $n$  de los últimos 100 ciclos de cada condición.

- Promedio de la triangulación del AP (TR), calculado como:

$$\text{TR} = \frac{1}{100} \sum_{n=1}^{100} \text{TR}(n) \quad (2)$$

donde  $\text{TR}(n) = \text{APD}_{90}(n) - \text{APD}_{50}(n)$ , siendo  $\text{APD}_{50}(n)$  la duración del AP al 50% de repolarización para el latido  $n$  de los últimos 100 latidos de cada condición.

- Promedio de la variabilidad a corto plazo (STV, Short-Term Variability):

$$\text{STV} = \frac{1}{K} \sum_{i=1}^K \sum_{n=1}^{N-1} \frac{|\text{APD}_{90}(n+1) - \text{APD}_{90}(n+1+i)|}{(N-1)\sqrt{2}} \quad (3)$$

donde  $K = 100 - N + 1$ . Los valores instantáneos de STV se calculan en ventanas de  $N = 30$  latidos y posteriormente se promedian entre las  $K$  ventanas existentes en los últimos 100 ciclos de cada condición.

- Promedio de la variabilidad a largo plazo (LTV, Long-Term Variability):

$$\text{LTV} = \frac{1}{K} \sum_{i=1}^K \sum_{n=1}^{N-1} \frac{|\text{APD}_{90}(n+1) + \text{APD}_{90}(n+1+i) - 2\overline{\text{APD}}_i|}{(N-1)\sqrt{2}} \quad (4)$$

donde  $\overline{\text{APD}}_i$  representa el promedio del  $\text{APD}_{90}$  para los 30 latidos existentes dentro de la ventana  $i$ .

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de correlación parcial lineal para evaluar las correlaciones entre las conductancias de las corrientes iónicas y los valores de los marcadores de AP descritos anteriormente [11]. Los

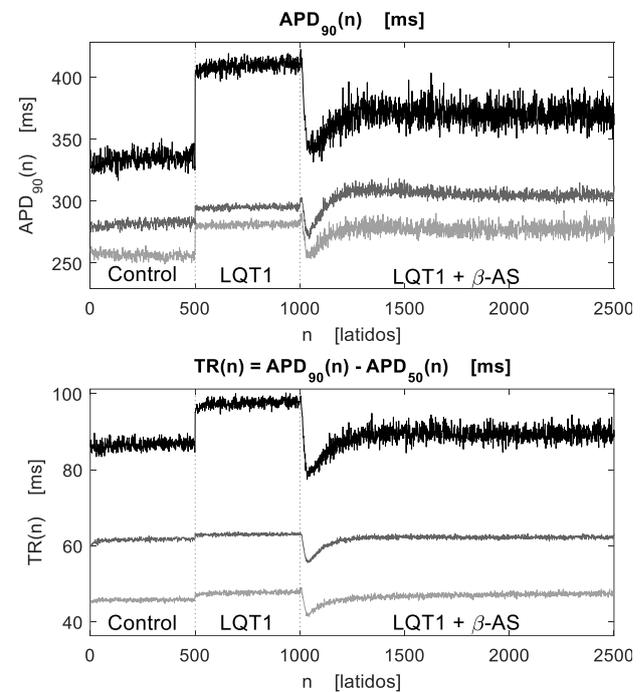
coeficientes obtenidos a partir de esta correlación parcial se denotaron por  $\rho_x$ , donde  $x$  representa  $\Delta\text{APD}$ ,  $\Delta\text{TR}$ ,  $\Delta\text{STV}$  y  $\Delta\text{LTV}$ , los cuales simbolizan los cambios en APD, TR, STV o LTV respectivamente, inducidos por la estimulación  $\beta$ -AS bajo el síndrome LQT1.

## 3. Resultados y Discusión

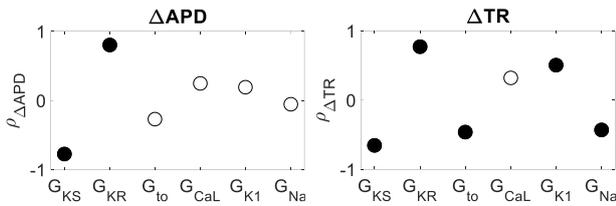
### 3.1. Morfología y Duración del AP

La Fig. 1 presenta la respuesta de tres células virtuales diferentes al efecto de la inhibición al 90% de  $I_{Ks}$  y a  $\beta$ -AS. Los valores de  $\text{APD}_{90}(n)$  (panel superior) y  $\text{TR}(n)$  (panel inferior) se muestran para cada una de las tres fases de la simulación: control, LQT1 y LQT1 junto con  $\beta$ -AS. Como puede observarse en la figura, los valores de APD y TR son mayores en LQT1 que en el periodo de control para las tres células ilustradas. Sin embargo, el grado de aumento de APD y TR depende notablemente de la célula evaluada. Para la célula mostrada en negro, puede observarse una prolongación elevada del valor de APD y TR, mientras que el cambio inducido por la inhibición de  $I_{Ks}$  en las otras dos células es menor.

La aplicación de ISO provoca una repentina caída transitoria en los valores de  $\text{APD}_{90}(n)$  y  $\text{TR}(n)$  en las tres células ilustradas, seguida de un lento incremento en el valor de ambos marcadores del AP. Nuevamente, los valores obtenidos para el grado de cambio en APD y TR debido al efecto de  $\beta$ -AS bajo condiciones de LQT1 son significativamente diferentes para cada una de las tres células ilustradas, variando desde cambios insignificantes hasta incrementos/decrementos de gran valor, como ocurre particularmente en el caso de APD.



**Figura 1.** Valores de  $\text{APD}_{90}(n)$  y  $\text{TR}(n)$  para las tres células virtuales simuladas con distintas características iónicas. Las líneas de puntos verticales delimitan los periodos de tiempo correspondientes a cada una de las zonas simuladas: control, LQT1 y LQT1 +  $\beta$ -AS.



**Figura 2.** Panel izquierdo: Coeficientes obtenidos para la correlación parcial entre  $\Delta APD$  y las conductancias de las corrientes iónicas, mostrándose con círculos negros las correlaciones parciales significativas. Panel derecho: De manera similar para  $\Delta TR$ .

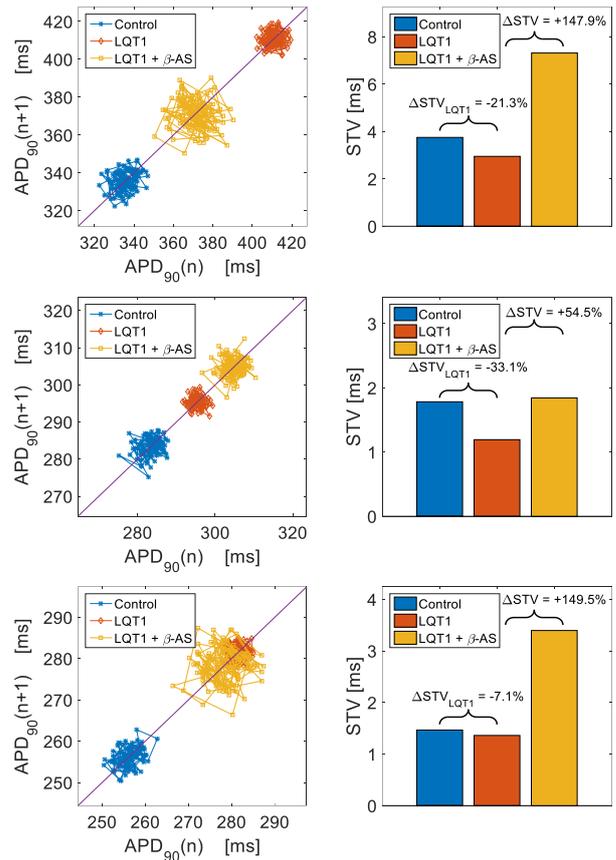
La Fig. 2 muestra los resultados del análisis de correlación parcial obtenidos al evaluar las diferencias en los valores de APD y TR entre las fases LQT1 +  $\beta$ -AS y LQT1. Para el valor de  $\Delta APD$  se ha obtenido una correlación significativamente positiva con respecto a la conductancia  $G_{KR}$ . En cambio, se obtiene una correlación negativa significativa con respecto a la conductancia  $G_{KS}$ . Debido a esto se espera que las células con LQT1 y una fuerte sobreexpresión de  $I_{Kr}$  o infraregulación de  $I_{Ks}$  experimenten grandes incrementos de APD en respuesta a  $\beta$ -AS. En cuanto a  $\Delta TR$ , se han encontrado correlaciones negativas o positivas significativas con todas las conductancias excepto  $G_{CaL}$ , tal y como puede observarse en el panel derecho de la Fig. 2. Esto nos indica que la sobreexpresión de  $I_{Kr}$  o  $I_{K1}$  y la infraregulación de  $I_{Ks}$ ,  $I_{to}$  o  $I_{Na}$  tendrá un gran impacto en el aumento de la triangulación del AP por efecto de  $\beta$ -AS.

### 3.2. Variabilidad latido-a-latido

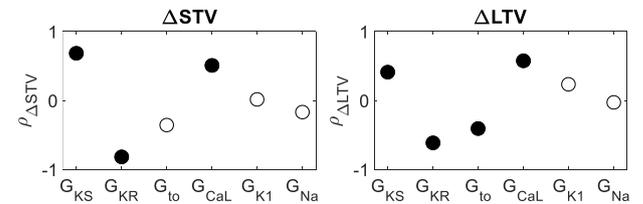
Los resultados de la variabilidad temporal de  $APD_{90}$  se presentan en la Fig. 3 para las mismas tres células virtuales citadas en el anterior apartado 3.1. En la columna izquierda pueden verse los gráficos de Poincaré para las fases de control, LQT1 y LQT1 +  $\beta$ -AS en los últimos 100 ciclos de las cada una de estas condiciones. Las medidas correspondientes de STV se muestran en la columna derecha para las tres células virtuales. Como puede observarse en la Fig. 3, STV experimenta cambios de leves a moderados en respuesta a la inhibición de  $I_{Ks}$  ( $\Delta STV_{LQT1}$ ), con porcentajes de cambio que varían entre -45% y 20% para el conjunto de células simuladas.

El cambio en STV debido a los efectos de  $\beta$ -AS es aún más diverso en la población de células simuladas. Mientras que muchas células, como las que se muestran en la Fig. 3, presentan un aumento importante en STV (alcanzándose un valor máximo del 214%), también hay células donde STV apenas cambia o incluso llega a disminuir ligeramente. Además, es importante resaltar que los cambios obtenidos en STV debidos a la inhibición del 90% de la corriente  $I_{Ks}$  o a la estimulación  $\beta$ -AS han resultado ser independientes del valor de APD.

Un ejemplo que puede resaltarse de los resultados de STV obtenidos es el de la segunda y tercera células virtuales simuladas. Aunque ambas células presentan unos valores de APD similares en la primera fase de la simulación (control), reflejan cambios muy distintos en STV debido al efecto de la inhibición de  $I_{Ks}$ , en concreto un descenso del 33% y del 7%, respectivamente. Igualmente ocurre para el



**Figura 3.** Columna izquierda: Gráficos de Poincaré para las tres células virtuales bajo condiciones de control (azul), LQT1 (rojo) y LQT1 +  $\beta$ -AS (amarillo). Columna derecha: Valores correspondientes de STV y porcentajes de cambio debidos a la inhibición de  $I_{Ks}$  y a  $\beta$ -AS.



**Figura 4.** Panel izquierdo: Coeficientes obtenidos para la correlación parcial entre  $\Delta STV$  y las conductancias de las corrientes iónicas, mostrándose con círculos negros las correlaciones parciales significativas. Panel derecho: De manera similar para  $\Delta LTV$ .

cambio de STV asociado a  $\beta$ -AS, ya que, aun partiendo de unos niveles similares de APD en ambas células para las condiciones de LQT1, el efecto de  $\beta$ -AS ha provocado un incremento de STV del 55% en la segunda célula y del 150% en la tercera. Esta respuesta altamente inter-individual de STV al LQT1 y a la acción adrenérgica posterior ( $\beta$ -AS) se ha observado de forma similar para la variabilidad temporal a larga escala (LTV).

En la Fig. 4 se muestran los resultados obtenidos a partir de la correlación parcial para las diferencias en STV y LTV entre las fases LQT1 +  $\beta$ -AS y LQT1. De acuerdo con los resultados obtenidos, el valor de STV se correlaciona de

manera significativamente positiva con  $G_{Ks}$  y  $G_{CaL}$ , sin embargo para  $G_{Kr}$  existe una correlación significativa negativa. Del mismo modo, en el caso de LTV se ha observado además una correlación significativamente negativa con  $G_{to}$ . El papel clave de las corrientes  $I_{Ks}$  e  $I_{CaL}$  en la modulación de la respuesta de STV y LTV a  $\beta$ -AS puede atribuirse al gran aumento de estas dos corrientes inducidas por la fosforilación mediada por PKA.

#### 4. Conclusiones

Mediante la construcción de un conjunto de modelos estocásticos de células ventriculares humanas que representan las propiedades de AP experimentales se ha procedido a caracterizar la respuesta de las diferentes células individuales al efecto del síndrome LQT1 y de la estimulación adrenérgica. Se han observado cambios muy heterogéneos en los valores de APD, triangulación y variabilidad temporal dependiendo de las características iónicas de las células. Para algunas células, la estimulación adrenérgica bajo condiciones de LQT1 no ha tenido prácticamente ningún efecto sobre el AP, mientras que para otras células han llegado a cuantificarse incrementos mayores al 200%, particularmente con respecto al valor de la variabilidad latido-a-latido del AP. Se han determinado los factores iónicos que subyacen a la naturaleza de la respuesta a la estimulación adrenérgica bajo condiciones de síndrome LQT1.

En futuros trabajos está previsto estudiar distintos grados de inhibición de la corriente  $I_{Ks}$  y analizar otros protocolos de estimulación diferentes al considerado en este estudio. Asimismo, se prevé llevar a cabo simulaciones en tejidos a partir de las cuales se deriven señales electrocardiográficas sobre las que podrían cuantificarse marcadores descriptivos de las distintas respuestas caracterizadas en este estudio, los cuales serían de utilidad en la práctica clínica para la estratificación de riesgo de pacientes con el síndrome LQT1.

#### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos TIN2013-41998-R y DPI2016-75458-R del MINECO, España, MULTITOOLS2HEART del CIBER-BBN a través del Instituto de Salud Carlos III, España, por el Fondo Social Europeo (EU) y el Gobierno de Aragón a través del contrato predoctoral de D. A. Sampedro Puente y del grupo consolidado BSICoS (T96), y por el European Research Council (ERC) a través del proyecto ERC-2014-StG 638284. Los cálculos numéricos se llevaron a cabo en la unidad de cómputo de altas prestaciones ICTS NANBIOSIS, CIBER-BBN, Universidad de Zaragoza.

#### Referencias

- [1] P. J. Schwartz *et al.*, “Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias,” *Circulation*, vol. 103, no. 1, pp. 89–95, Jan. 2001.
- [2] G.-X. Liu *et al.*, “Differential conditions for early afterdepolarizations and triggered activity in cardiomyocytes derived from transgenic LQT1 and LQT2 rabbits,” *J. Physiol.*, vol. 590, no. 5, pp. 1171–1180, Mar. 2012.
- [3] C. Jons *et al.*, “Use of Mutant-Specific Ion Channel Characteristics for Risk Stratification of Long QT Syndrome Patients,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, no. 76, p. 76ra28-76ra28, Mar. 2011.
- [4] K. Satomi *et al.*, “Response of beat-by-beat QT variability to sympathetic stimulation in the LQT1 form of congenital long QT syndrome,” *Hear. Rhythm*, vol. 2, no. 2, pp. 149–154, Feb. 2005.
- [5] D. Gallacher *et al.*, “In vivo mechanisms precipitating torsades de pointes in a canine model of drug-induced long-QT1 syndrome,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 76, no. 2, pp. 247–256, Nov. 2007.
- [6] T. O’Hara, L. Virág, A. Varró, and Y. Rudy, “Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 7, no. 5, p. e1002061, May 2011.
- [7] N. Jost *et al.*, “Abstract 1520: Molecular Basis of Repolarization Reserve Differences between Dogs and Man,” *Circulation*, vol. 118, no. Suppl 18, 2016.
- [8] T. O’Hara and Y. Rudy, “Quantitative comparison of cardiac ventricular myocyte electrophysiology and response to drugs in human and nonhuman species,” *AJP Hear. Circ. Physiol.*, vol. 302, no. 5, pp. H1023–H1030, Mar. 2012.
- [9] E. Grandí, F. S. Pasqualini, and D. M. Bers, “A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca transient,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 112–121, Jan. 2010.
- [10] N. G. van. Kampen, *Stochastic processes in physics and chemistry*. Elsevier, 2007.
- [11] E. Pueyo *et al.*, “Experimentally-Based Computational Investigation into Beat-To-Beat Variability in Ventricular Repolarization and Its Response to Ionic Current Inhibition,” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0151461, Jan. 2016.
- [12] E. Pueyo *et al.*, “A multiscale investigation of repolarization variability and its role in cardiac arrhythmogenesis,” *Biophys. J.*, vol. 101, no. 12, pp. 2892–2902, Dec. 2011.
- [13] E. Pueyo, M. Orini, J. F. Rodríguez, and P. Taggart, “Interactive effect of beta-adrenergic stimulation and mechanical stretch on low-frequency oscillations of ventricular action potential duration in humans,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 97, pp. 93–105, Aug. 2016.
- [14] A. R. Soltis and J. J. Saucerman, “Synergy between CaMKII Substrates and  $\beta$ -Adrenergic Signaling in Regulation of Cardiac Myocyte  $Ca^{2+}$  Handling,” *Biophys. J.*, vol. 99, no. 7, pp. 2038–2047, Oct. 2010.
- [15] Y. Xie, E. Grandí, J. L. Puglisi, D. Sato, and D. M. Bers, “ $\beta$ -adrenergic stimulation activates early afterdepolarizations transiently via kinetic mismatch of PKA targets,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 58, pp. 153–161, May 2013.