CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD MONTERREY

Análisis de la dinámica del ion calcio durante su liberación del retículo sarcoplásmico por medio de los receptores de rianodina: un enfoque de modelación matemática

Tesis que presenta:

M. en C. Norma Citlalcue Pérez Rosas

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

En la especialidad de:

Ingeniería y Fisica Biomédicas

Directores de tesis:

Dr. Agustin Guerrero Hernández

Dr. Moisés Santillán Zerón

Apodaca, Nuevo León, mayo del 2016.

Dedicatoria

A las mujeres que amo, mi madre, mi abuela y mis hermanas.

Agradecimientos

Como es costumbre y buena, no he querido escatimar esfuerzos en expresar mi agradecimiento a las personas que me ayudaron a concluir mis estudios de Doctorado y cuyo apoyo tengo por invaluable. Las líneas que a continuación escriba serán siempre breves en comparación con el sentimiento de gratitud que guardo. Quiero mencionar primero al Cinvestav Unidad Monterrey que me brindó apoyo económico durante el primer año de mi Doctorado. Además, quiero agradecer al CONACyT que me brindó la oportunidad de continuar mis estudios mediante el número de becaria 219371. Me es menester reconocer el trabajo del Cinvestav en la formación de científicos en México. De manera especial agradezco a mis asesores el Dr. Agustín Guerrero Hernández y el Dr. Moisés Santillán Zerón, por el apoyo que me brindaron durante esta etapa, así como su ejemplo de profesionalismo como científicos. También reconozco el excelente trabajo y la calidad de los profesores que me impartieron clases en el Cinvestav Unidad Monterrey, de quienes me llevo una valiosa preparación. Estoy en deuda con los sinodales, Dra. Blanca E. Galindo Barraza, Dr. Daniel P. Sánchez Herrera y Dr. Arturo Hernández Cruz, quienes se tomaron el tiempo de leer y enriquecer este trabajo.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a los Doctores, Dr. Bruno A. Escalante Acosta y Dr. Daniel P. Sánchez Herrera por el apoyo moral y económico proporcionado a mi persona. Con especial enfásis en los dos últimos años de mi Doctorado. Dr. Escalante gracias por confiar en mi y gracias por darme la oportunidad de llegar a conocer a los aficionados al calcio en Francia. La repercusión que tuvo ese encuentro en mi, en la manera de percibir e interpretar la dinámica del ion fue inconmensurable, estoy en deuda con usted. De manera especial también agradezco a las Doctoras Blanca E. Galindo Barraza e Hilda J. Mercado Uribe por su amistad y el apoyo moral proporcionado a mi persona.

Menciono mi gratitud y sincero aprecio hacia los compañeros que me brindaron su amistad y compartieron esta experiencia conmigo. Tanto en el Cinvestav Unidad Monterrey como en la Unidad Zacatenco. Soy afortunada al no poder enlistarlos, pues son suficientes para llenar más de esta hoja. Pero no he podido omitir los nombres de Crisei-

da, Cristina, Lucía, Dulce, Edaena, Liliana, Margarita, Leonardo, Daniel, Jesús, Ezequiel, Abraham y José.

A todos aquellos que no enlisto aquí pero que se acercaron a mi para darme una palabra de motivación y/o apoyo para continuar en el Doctorado, sobre todo cuando mi salud se vio mermada, quiero expresarles que les guardo profundo aprecio y agradecimiento.

Por último y no por ello menos importante agradezco al Doctor Victor Leiserson por enseñarme que en la toma de decisiones hay un espectro de posibilidades.

Índice

1. Introducción **1**

1.1. Generalidades 1

1.2. La bomba de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) 4

1.3. El canal liberador de Ca^{2+} del RS/E (RyR) 7

1.4. Colocalización del RyR y la bomba SERCA 11

1.5. Los flujos de Ca^{2+} 12

1.6. La capacidad amortiguadora de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares 14

1.7. Los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} 18

2. Antecedentes directos **20**

2.1. Las proteínas luminales modulan la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} en el RS/E 20

2.2. Interacción o comunicación funcional entre los componentes del RS/E . 33

3. Marco teórico **35**

3.1. Uso de modelos matemáticos para el estudio de la dinámica de Ca^{2+} intracelular 36

3.2. Los sistemas de EDOs 39

3.2.1. Soluciones numéricas para los sistemas de EDOs 40

4. Justificación **44**

5. Hipótesis **45**

6. Objetivos **46**

6.1. Objetivo general 46

6.2. Objetivos particulares 46

7. Materiales y métodos **47**

7.1. Obtención de los datos experimentales 47

7.1.1. Normas éticas y de seguridad para el cuidado y uso de animales de laboratorio . . . 47
7.1.2. Aislamiento de las CML y el registro del Ca^{2+} intracelular . . . 48
7.2. Desarrollo del modelo matemático . . . 48
7.3. Estimación de parámetros . . . 55

8. Resultados y Discusión **60**
8.1. Resultados del modelo matemático utilizando cinética estándar (CE) para simular la unión de Ca^{2+} a las proteínas amortiguadoras luminales . . . 62
8.2. Resultados del modelo matemático utilizando cinética bajo demanda (CbD) para modelar la unión de Ca^{2+} a las proteínas amortiguadoras luminales . . . 64
8.2.1. Un modelo de la cinética de unión a Ca^{2+} basado en cómo CSQ une Ca^{2+} . . . 69
8.3. Resultados del modelo matemático utilizando la cinética estándar para modelar la unión de Ca^{2+} a las proteínas amortiguadoras luminales cuando se ha inhibido la bomba SERCA . . . 71
8.3.1. La liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína en CML involucra cuatro fases que son reproducidas por el modelo CbD . . . 78
8.3.2. El papel de la bomba SERCA en la facilitación del proceso de liberación de Ca^{2+} . . . 81
8.4. El modelo CbD reproduce la respuesta refractaria de $[Ca^{2+}]_i$ ante la aplicación de cafeína . . . 82
8.4.1. El modelo CbD explica el periodo refractario a pesar del nivel de Ca^{2+} luminal normal . . . 86
8.5. Los flujos de Ca^{2+} J_1, J_2 y J_3 tanto del modelo CE como del modelo CbD 87
8.6. Condiciones alternativas a las del modelo CbD . . . 89
8.6.1. Un modelo que considera los diferentes compartimentos en el RS de CML . . . 89

8.6.2. Modelos matemáticos que consideran la difusión de Ca^{2+} en el lumen del RS 91

9. Conclusiones **92**

10. Perspectivas **94**

10.1. El uso de indicadores proteínicos para seguir la dinámica de la polimerización de CSQ dependiente de Ca^{2+} 94

10.2. Modulación del flujo de Ca^{2+} del RS hacia el citoplasma 94

Referencias **96**

Apéndices **106**

A. Deducción de la expresión de la probabilidad de apertura del RyR **106**

B. Análisis de estabilidad de los dos modelos **111**

C. Valores de los parámetros **114**

D. Artículo publicado **115**

Índice de tablas

1. Valores de los parámetros 114

Índice de figuras

1. Esquema en listón de las estructuras cristalinas de dos de los diferentes estados conformacionales de la bomba SERCA 6
2. Registros simultáneos de la concentración intracelular de Ca^{2+} y la respuesta de Ca^{2+} del RS inducidos por la activación de los RyR con cafeína y el efecto de la inhibición de la bomba SERCA con tapsigargina (TG) en estas respuestas. 7
3. Estructura del receptor de rianodina. 8
4. Respuesta de adaptación del RyR cardíaco en bicapas planas ante la liberación de Ca^{2+} enjaulado. 9
5. Probabilidad de apertura (Po) del RyR dependiente de la concentración de Ca^{2+} 10
6. Transitorio de Ca^{2+} generado al aplicar 20 mM de cafeína (Caf) por 5 s a una CML 11
7. Colocalización de la bomba SERCA y del RyR en CML 12
8. Flujos de Ca^{2+} entre compartimentos 13
9. La capacidad amortiguadora de Ca^{2+} 17
10. Superficie molecular de la CSQ esquelética 21
11. Analogía del RS/E con un modelo de vasos comunicantes 21
12. Registro de fluorescencia durante la generación de una chispa de Ca^{2+} . 22
13. Planos fase de la liberación de Ca^{2+} de diferentes modelos celulares . . 24
14. La capacidad amortiguadora presenta un periodo refractario 26
15. La liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína involucra 4 fases que dependen de la actividad de la bomba SERCA. 27
16. Polimerización de la CSQ 28
17. Gráfica tipo Scatchard de la unión de Ca^{2+} a CSQ 29
18. De monómeros a polímeros de CSQ 29

19. Probabilidad de apertura del receptor de rianodina al incrementar las concentraciones de Ca^{2+} luminal (trans) 31
20. Modelo hipotético de cómo los canales de liberación de Ca^{2+} tienen acceso a las fuentes ocultas de Ca^{2+} 32
21. Ejemplo de un diagrama que muestra algunos de los flujos involucrados en el control de Ca^{2+} intracelular. 38
22. Método de Euler. 40
23. Esquema de los compartimentos de las CML 48
24. La capacidad amortiguadora como función de la concentración de Ca^{2+} 53
25. Ajuste de los diferentes niveles de saturación de Ca^{2+} por parte de CSQ. 55
26. Simulación del transitorio de Ca^{2+} *in silico* generado al aplicar un estímulo de cafeína utilizando el modelo CE, el cual no reproduce la fase 1observada experimentalmente bajo estas condiciones. 63
27. Respuestas de la concentración intracelular de Ca^{2+} inducidas al aplicar una dosis de 20 mM de cafeína y las respuestas del modelo CbD 65
28. Respuestas de la concentración intracelular de Ca^{2+} inducidas al aplicar una dosis de 2 mM de cafeína y las respuestas del modelo CbD 68
29. Efecto de la inhibición de la bomba SERCA por tapsigargina en las respuestas del Ca^{2+} intracelular inducidas al aplicar 20 mM de cafeína. . . 72
30. La inhibición de la bomba SERCA cambia la forma en la que unen Ca^{2+} las proteínas luminales 75
31. El modelo CbD reproduce el diagrama de fases observado en el proceso de liberación de calcio 76
32. El modelo CbD presenta una gráfica de la capacidad amortiguadora de calcio luminal con concavidad positiva 77
33. Las proteínas luminales y los canales de liberación compiten por el calcio libre en el modelo CE 80
34. Unidades funcionales 82

35. Respuesta refractaria de los transitorios de calcio citoplásmico estimulados por cafeína 84
36. El modelo de cinética estándar no sigue la recuperación del calcio libre luminal 85
37. Los flujos de Ca^{2+} de la cinética estándar comparado con la cinética bajo demanda. 88
38. Modelo alternativo para generar la fase 1 observada en el proceso de liberación de calcio 90
39. La probabilidad de apertura del RyR como función de la concentración de Ca^{2+} 110
40. Plano fase del modelo CE 112
41. Plano fase del modelo CbD 113

Nomenclatura

ATP - Adenosin trifosfato (por sus siglas en inglés: *Adenosine triphosphate*)

[B]$_x$ - Concentración de sitios de unión a calcio en el compartimento celular (x)

[BCa] - Concentración de calcio pegado a proteínas

β - Capacidad amortiguadora

Ca^{2+} - Calcio

[Ca^{2+}**]** - Concentración de calcio

[Ca^{2+}**]**$_i$ - Concentración de calcio libre intracelular

[Ca^{2+}**(t)]**$_i$ - Concentración de calcio libre intracelular dependiente del tiempo

[Ca^{2+}**]**$_{Ti}$ - Concentración total de calcio intracelular

[Ca^{2+}**]**$_{RS}$ - Concentración de calcio libre en el retículo sarcoplásmico

[Ca^{2+}**]**$_{TRS}$ - Concentración total de calcio en el retículo sarcoplásmico

[Ca^{2+}**]**$_{Tx}$ - Concentración total de calcio en un compartimento celular (x)

[Ca^{2+}**]**$_x$ - Concentración de calcio libre en un compartimento celular (x)

CICR - Liberación de calcio inducida por calcio (por sus siglas en inglés: *Calcium Induced Calcium Release*)

Caf o Caff - Cafeína

CSQ - Calsequestrina (por sus siglas en inglés: *calsequestrin*)

CML - Células de músculo liso

CE - Cinética estándar

CbD - Cinética bajo demanda

D - Dímeros

EDOs - Ecuaciones Diferenciales Ordinarias

[F]$_x$ - Concentración del fluoróforo en un compartimento x

[FCa] - Concentración del fluoróforo unido a calcio

H$^+$ - Hidrógeno

IP$_3$Rs - Receptores de IP$_3$ (por sus siglas en inglés: *inositol 1,4,5-triphosphate receptor*)

J_{CaV} - Flujo de calcio por medio de los canales de calcio dependientes de voltaje

$\tilde{J}_{neto}$ - Flujo neto de calcio de un compartimento celular

J_{neto} - Flujo neto de calcio multiplicado por el volumen en ese compartimento

J_{MP} - Flujo de calcio del espacio extracelular al intracelular a través de la membrana plasmática

$J_{RS/E}$ - Flujo de calcio del retículo sarco/endoplásmico

J_{RyR} - Flujo de calcio por medio de los RyRs

J_{SERCA} - Flujo de calcio por medio de la bomba SERCA

J_1 - Flujo de calcio del citoplasma al espacio extracelular por medio de los mecanismos de remoción de calcio

J_2 - Flujo de calcio del retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma por medio de los receptores de rianodina

J_3 - Flujo de calcio del citoplasma hacia el retículo por medio de la bomba SERCA

Mg^{2+} - Magnesio

M - Monómeros

N - Número total de canales liberadores de calcio

P - Polímeros

Po - Probabilidad de apertura (por sus siglas en inglés: *open probability*)

PMCA - Bomba de calcio de la membrana plasmática (por sus siglas en inglés: *Plasma Membrane Calcium ATPase*)

RyR o RyRs - Receptor o receptores de rianodina (por sus siglas en inglés: *Ryanodine Receptor*)

RE - Retículo endoplásmico

RS - Retículo sarcoplásmico

RS/E - Retículo sarcoplásmico/Retículo endoplásmico

SERCA - Bomba de calcio del retículo sarco/endoplásmico (por sus siglas en inglés: *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*)

T - Tetrámeros

TG o Tgn - Tapsigargina

Resumen

La química de coordinación del ion calcio (Ca^{2+}) provoca la estabilización de estados conformacionales específicos en las proteínas. De aquí que incrementos en la concentración de Ca^{2+} citosólico modifiquen el comportamiento celular. Sin embargo, un exceso de Ca^{2+} es citotóxico. Por lo que la célula invierte una cantidad importante de energía metabólica para mantener baja la actividad del ion en el citoplasma (alrededor de 100 nM). Por otro lado, el gradiente de Ca^{2+} entre el lumen del retículo sarco/endoplásmico y el citoplasma es muy grande de forma tal que al abrir los canales liberadores de Ca^{2+} del retículo se esperaría que se produjera una reducción inmediata en la concentración de Ca^{2+} luminal. Sin embargo, registros simultáneos de la concentración de Ca^{2+} luminal e intracelular muestran que el proceso de liberación de Ca^{2+} es mucho más complejo de lo que previamente se había visualizado. Estos experimentos muestran que el Ca^{2+} intracelular incrementa sin una reducción significativa en la concentración de Ca^{2+} luminal. Debido a que el Ca^{2+} no es un metabolito, no se sintetiza ni se degrada, sólo cambia de compartimento, estos experimentos no son fáciles de interpretar basados en la ley de conservación de la materia. En este trabajo se desarrolló un modelo matemático determinista para explicar el aumento de Ca^{2+} sin una reducción significativa en la concentración de Ca^{2+} luminal. La principal contribución de este trabajo es que los esquemas cinéticos tradicionales que se usan para modelar la cinética de unión de Ca^{2+} a las proteínas luminales no explican este comportamiento del retículo. En este trabajo se propuso un nuevo mecanismo denominado cinética bajo demanda (CbD), dónde el número de sitios de unión a Ca^{2+} en el lumen del retículo incrementan en respuesta al Ca^{2+} que se ha unido previamente. La propuesta se basó en el comportamiento de calsecuestrina, una proteína amortiguadora de Ca^{2+} localizada en el lumen del retículo, la cual, incrementa sus sitios de unión a Ca^{2+} dependiendo de su estado de polimerización. Los parámetros del modelo fueron extraídos de la literatura o estimados de datos experimentales. Nuestros resultados sugieren que la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} dentro del retículo depende de que la bomba SERCA esté activa y que varía con la concen-

tración de Ca^{2+} libre en dicho compartimento. Además, nuestros resultados sugieren que la reducción rápida de la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} optimiza la liberación de Ca^{2+} al disminuir la competencia entre las proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} en el lumen del retículo y los canales de liberación de Ca^{2+}. No es claro cómo la actividad de la bomba SERCA facilita la reducción en la capacidad amortiguadora de Ca^{2+}. Sin embargo, cuando la bomba SERCA está inhibida, la competencia por el Ca^{2+} entre las proteínas luminales y los canales de liberación se hace evidente.

Abstract

Calcium ions (Ca^{2+}) modify cell behavior by stabilizing conformational states of effector proteins. The increase of the cytosolic Ca^{2+} concentration is the triggering signal for many physiological responses. An excess of Ca^{2+} is, however, toxic, for this reason cells invest a substantial amount of energy to keep low the activity of this ion in the cytoplasm (near 100 nM). The calcium gradient between the lumen of Sarco/Endoplasmic Reticulum (S/ER) and cytoplasm is so large that the opening of release channels should lead to an immediate reduction of the luminal [Ca^{2+}]. However, simultaneous recording of both luminal and intracellular [Ca^{2+}] showed that the Ca^{2+} release process is more complex than expected. These experiments have revealed that intracellular Ca^{2+} increases without any significant reduction of the luminal SR [Ca^{2+}]. This certainly is not easy to explain based on the principle of mass conservation. We have developed a simple deterministic mathematical model to explain this situation. The main contribution of this model is the recognition that experimental data cannot fitted using standard kinetics of Ca^{2+} binding to proteins. The solution was to assume a new type of kinetics that we called Kinetics on Demand (KonD), where the number of Ca^{2+} binding sites increases in response to the binding of Ca^{2+} and viceversa. This situation is not totally unheard-of since calsequestrin increases the number of Ca^{2+} binding sites depending on the polymerization state of the protein. Model parameters were estimated from available experimental data. Our *ad hoc* mechanism suggests that the variable Ca^{2+} buffering capacity depends on intact SERCA pumps and interestingly increases with the free Ca^{2+} in the SR. The results suggests that rapid reduction of the calcium buffering capacity optimizes Ca^{2+} release by decreasing the competition between luminal Ca^{2+} binding proteins and the release channels. It is unclear how the activity of SERCA pumps facilitate this reduction in the calcium buffering capacity. However, when SERCA pumps are inhibited, the competition for Ca^{2+} between luminal proteins and release channels becomes evident.

1. Introducción

"All things in life are so multifaceted, contradictory and obscure that we can never be sure about the truth."

—Desiderius Erasmus.
Moriae encomium (The Praise of Folly).
Paris: Gilles de Gourmont; 1509.

Esta tesis sugiere un posible escenario para explicar la aparente violación a la ley de conservación de la materia encontrada en el proceso de liberación del ion calcio (Ca^{2+}) proveniente del retículo sarcoplásmico (RS) por medio de los receptores de rianodina (RyRs) en células de músculo liso (CML) [1, 2] a través de modelado matemático. Además el modelo incluye la participación que tienen las bombas SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) [3] en este proceso de liberación. En la sección 1.1 se presenta el material necesario para entender este capítulo introductorio, seguido por la descripción de la Bomba SERCA en la sección 1.2 y de los RyRs en la sección 1.3. La interacción funcional entre la bomba SERCA y los RyRs se presenta en la sección 1.4. Los flujos de Ca^{2+} se presentan en la sección 1.5. La teoría de los amortiguadores de Ca^{2+} endógenos se presenta en la sección 1.6 y de los amortiguadores éxogenos en la sección 1.7.

1.1. Generalidades

Los incrementos transitorios de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) regulan diversos procesos celulares [4]. La versatilidad de la utilización del Ca^{2+} surge de su función como un mensajero intracelular —segundo mensajero—. El Ca^{2+} transmite información que llega a la superficie de la célula a blancos intracelulares —las proteínas— [5]. Esto es posible debido a su particular química de coordinación, que le permite unirse a las cavidades irregulares encontradas en las estructuras terciarias de las proteínas [6]. Sin embargo, altas concentraciones de Ca^{2+} causan agregación de proteínas y ácidos nucleicos, afectando la integridad de la membrana celular e iniciando la precipitación de

fosfatos [7]. Por lo tanto, altas concentraciones de Ca^{2+} son incompatibles con la vida, ya que un incremento en $[Ca^{2+}]_i$ es citotóxico [8].

El Ca^{2+} no es un metabolito, por lo que no se sintetiza, ni se degrada, sólo cambia de compartimento [7]. Como resultado, las células desarrollaron sistemas efectivos para mantener baja la actividad (concentración efectiva) intracelular de Ca^{2+}, alrededor de 100 nM. Esto representa una diferencia de aproximadamente 10^4 veces con respecto a la concentración de Ca^{2+} extracelular ($\approx$ 1-2mM) [8]. Mantener este gradiente electroquímico de Ca^{2+} requiere un aporte importante de energía metabólica por parte de la célula [8].

Las señales de Ca^{2+} son relativamente estereotipadas, lo cual implica la existencia de mecanismos de señalización por Ca^{2+} que descodifican las características de estas señales en diversos contextos de espacio, tiempo y amplitud [5, 9]. De esta manera, se pueden encontrar elevaciones de $[Ca^{2+}]_i$ localizadas con duración de milisegundos —las chispas de Ca^{2+}— [5], incrementos en $[Ca^{2+}]_i$ que abarcan todo el citoplasma con duración de segundos —los transitorios de Ca^{2+}— [4] e incrementos globales de $[Ca^{2+}]_i$ con duración de segundos a varios minutos, mediados por frentes de onda, en algunos casos de periocidad compleja y caótica —las oscilaciones de Ca^{2+}— [5]. De aquí que el Ca^{2+} puede estar participando en procesos contradictorios como relajación y contracción muscular, proliferación celular y apoptosis [9].

La señalización por Ca^{2+} es caracterizada por un incremento rápido de $[Ca^{2+}]_i$, resultado de la entrada de Ca^{2+} a través de canales especializados en la membrana celular o de la liberación a partir de las pozas intracelulares de Ca^{2+} —como el retículo sarco/endoplásmico (RS/E)— [10], [8]. El RS/E es una red de túbulos interconectados que adopta diferentes configuraciones [11], distribuida en toda la célula [7]. La liberación de Ca^{2+} del RS/E ocurre por medio de canales iónicos localizados en su membrana [9] —como los receptores del inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3Rs por sus siglas en Inglés) y los receptores de rianodina (RyRs por sus siglas en inglés)— [8]. La $[Ca^{2+}]_i$ retorna a sus valores de reposo, vía la acción de las bombas de Ca^{2+}, las bombas PMCA (*Plasma Membrane Ca^{2+}-ATPase*) y SERCA (*Sarco/Endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase*), in-

tercambiadores de Ca^{2+}, proteínas de unión a Ca^{2+} y otros amortiguadores endógenos [10]. Por otro lado, existe un aporte constante de Ca^{2+} de baja magnitud al citoplasma por parte del RS/E y del espacio extracelular conocido como fuga de Ca^{2+} [12]. Las concentraciones basales de Ca^{2+} se mantienen constantes en el citosol por los mecanismos de remoción de Ca^{2+} dependientes de energía, que envían el exceso de Ca^{2+} de vuelta al RS/E o al espacio extracelular. De aquí que $[Ca^{2+}]_i$ este determinada por la entrada de Ca^{2+}, liberación de Ca^{2+}, fuga de Ca^{2+}, secuestramiento de Ca^{2+} (en los compartimentos celulares como el RS/E) y amortiguamiento de Ca^{2+} [12, 13].

La importancia del amortiguamiento se enfatiza por el hallazgo de que sólo una fracción muy pequeña del Ca^{2+} que entra a la célula queda como Ca^{2+} libre, la mayoría se une rápidamente a los sitios de unión celular, y después es secuestrado dentro de los organelos de almacenamiento de Ca^{2+}, como el RS/E, o extruído por los mecanismos de transporte de Ca^{2+} [13]. Por consiguiente, el Ca^{2+} intracelular se encuentra preponderantemente unido a proteínas amortiguadoras con una relación típica de Ca^{2+} unido con respecto al libre de $\approx 10^3$ [14].

Por otro lado, el RS/E participa en la disminución de $[Ca^{2+}]_i$ al remover Ca^{2+} desde el citoplasma y rellenar las pozas internas de Ca^{2+} por medio de las bombas SERCA [3], que hidrolizan ATP (*Adenosine triphosphate*) [15] para transportar iones de Ca^{2+} hacia el lumen del organelo [7]. Estas ATPasas son reguladas por la concentración de Ca^{2+} libre en el lumen del RS/E ($[Ca^{2+}]_{RS}$) y por diferentes tipos de proteínas [16].

Adicionalmente, el RS/E contiene proteínas de alta capacidad y baja afinidad por Ca^{2+}, como serían la calsecuestrina (CSQ) o la calreticulina que no sólo unen, sino que también secuestran Ca^{2+} dentro del lumen del organelo [7]. Es decir, la dinámica del ion Ca^{2+} dentro del RS/E también depende de los amortiguadores de Ca^{2+} presentes [12]. De esta manera, $[Ca^{2+}]_{RS}$ varía entre 200 y 800 μM y puede llegar a acumular hasta 40 mM de Ca^{2+} total ($[Ca^{2+}]_{TRS}$) y se piensa que este mecanismo de alta capacidad está desarrollado para evitar la citotoxicidad [8]. De aquí que entender la dinámica de Ca^{2+} dentro de los compartimentos celulares requiere conocer cómo los diversos sistemas que controlan el Ca^{2+} dentro de ese compartimento regulan los niveles internos de Ca^{2+}

[12]. A continuación se describirá con mayor amplitud las características de algunos de los componentes de la señalización por Ca^{2+}.

1.2. La bomba de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA)

La *bomba SERCA* es una proteína que pertenece a la familia de las ATPasas del tipo P altamente conservada en mamíferos [16]. Esta proteína es codificada por tres diferentes genes [16, 17], tiene un peso molecular aproximado de 110 KDa, y está localizada en la membrana del RS/E [18]. Ante incrementos de $[Ca^{2+}]_i$, la bomba transporta Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el lumen del RS/E en contra del gradiente de concentración, en una proporción de 2 iones Ca^{2+} transportados por una molécula de ATP hidrolizada y el co-transporte de 2 ó 3 iones H^+ [19].

Esta proteína no solo controla la remoción de Ca^{2+} en el citoplasma, también controla la carga de Ca^{2+} en el RS/E, y por consecuencia la cantidad de Ca^{2+} disponible para liberarse [16]. Debido a que el volumen del RS/E ocupa del 1 al 10 por ciento del volumen celular [3, 20], la cantidad de Ca^{2+} que puede aportar este compartimento está limitada por la cantidad de amortiguadores presentes [21].

La bomba SERCA pertenece a la familia de las ATPasas del tipo P, porque fosforila un residuo de aspártico (Asp) durante su ciclo catalítico [18]. El ciclo catalítico involucra dos estados conformacionales: E_1 y E_2 [19]. En el estado E_1, la bomba se encuentra con sus sitios de unión a Ca^{2+} abiertos hacia el citosol, es más estable en la forma no fosforilada, y presenta alta afinidad por Ca^{2+}. En el estado E_2, la bomba es más estable en la forma fosforilada, se encuentra abierta hacia el RS/E, y presenta baja afinidad por Ca^{2+} [19].

El transporte de Ca^{2+} hacia el lumen del RS/E ocurre de la siguiente manera: en la forma E_1, la proteína tiene una mayor afinidad por Ca^{2+} que por protones. La unión de Ca^{2+} favorece la fosforilación del residuo de aspáritico (Asp), y el ADP abandona la enzima. La fosforilación facilita el cambio conformacional a la forma E_2. La forma E_2 tiene una menor afinidad por Ca^{2+} que por protones, por lo que puede liberar al ión Ca^{2+} del lado luminal del retículo. La disociación de Ca^{2+} induce la defosforilación del residuo de aspártico. La forma defosforilada es la E_1, por lo que se produce un cambio

conformacional [19], vea la Figura 1.

El llenado del RS/E por medio de la bomba SERCA se ha podido comprobar en diferentes estudios, uno de los cuales se discute a continuación. Al medir simultáneamente $[Ca^{2+}]_i$ y los niveles de Ca^{2+} en el RS de las células de músculo liso (CML) de vejiga urinaria de cobayo, y al adicionar altas concentraciones de cafeína (para abrir un gran número de RyRs), se observó un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ y la correspondiente disminución del Ca^{2+} luminal (ver Figura 2). Una vez que se recuperaron las concentraciones basales de Ca^{2+} libre tanto en el citoplasma cómo en el RS, se aplicó tapsigargina (TG) para inhibir la bomba SERCA y se volvieron a abrir los RyRs con cafeína. Esta situación generó un incremento menor de $[Ca^{2+}]_i$, a pesar de que el nivel de Ca^{2+} libre luminal no disminuyó cuando se aplicó TG. Estos resultados sugieren que hubo una completa recuperación de $[Ca^{2+}]_i$ basal, pero no hubo recuperación de los niveles de Ca^{2+} en el RS. Se comprobó el vaciamiento completo del retículo porque al aplicar un tercer pulso de cafeína ya no se produjo ningún cambio de $[Ca^{2+}]_i$ ni en el nivel de Ca^{2+} luminal. Estos datos corroboran que la bomba SERCA es el principal mecanismo de rellenado con Ca^{2+} del RS [22].

Aunque hay diversas isoformas de la bomba SERCA encontradas en los diferentes tejidos —SERCA1, SERCA2a, SERCA2b y SERCA3— [17], la velocidad a la que la bomba transporta Ca^{2+} hacia el lumen del RS/E tiene una dependencia simple con respecto a $[Ca^{2+}]_i$. Usando vesículas formadas por membranas de RS/E, y observando la velocidad a la que la vesícula acumula ^{45}Ca, un isótopo radiactivo de Ca^{2+}, se ha observado que la velocidad a la que SERCA bombea Ca^{2+} depende de manera sigmoidea del Ca^{2+}, con un coeficiente de Hill cercano a 2 [23]. Por otra parte, expresando las 3 isoformas de la bomba SERCA en células COS-1, se encontró que todas las isoformas muestran propiedades enzimáticas similares. Es decir, las enzimas son activadas de manera cooperativa por Ca^{2+} con un coeficiente de Hill de aproximadamente 2 [17].

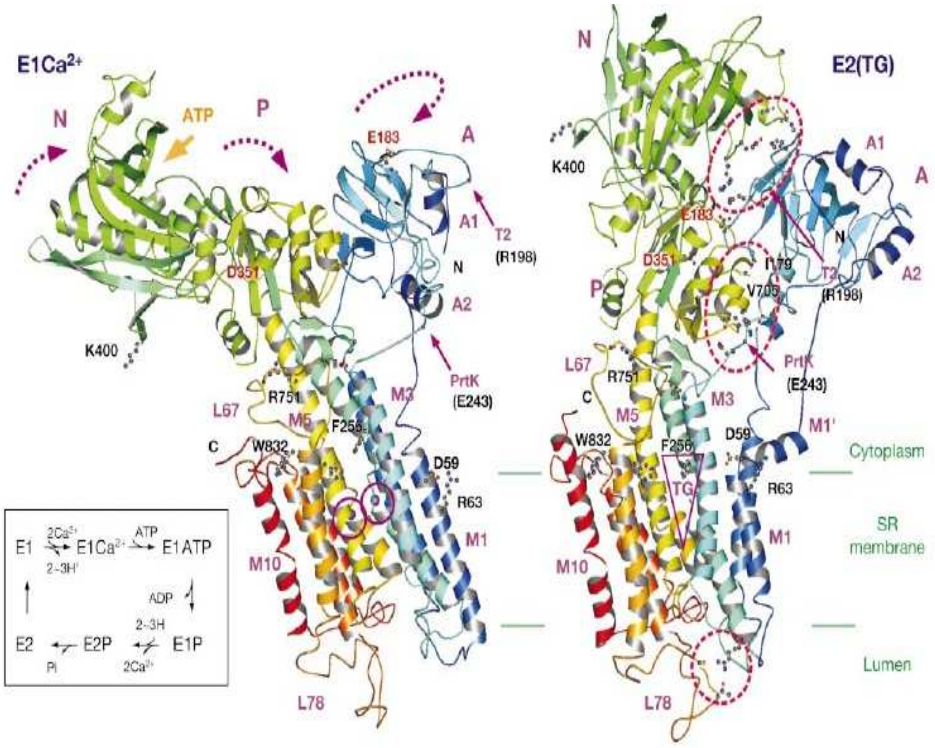

Figura 1: Esquema en listón de las diferentes estructuras cristalinas de dos de los diferentes estados conformacionales de la bomba SERCA. El inserto de la parte inferior muestra el ciclo catalítico de la bomba SERCA para transportar Ca^{2+} hacia el lumen del RS/E. El esquema representa a la bomba SERCA en colores que cambian gradualmente desde la amino terminal (azul) hacia la carboxilo terminal (rojo). El modelo de lado izquierdo representa al estado conformacional E_1Ca con 2 Ca^{2+} unidos a la proteína (esferas en color morado), las flechas discontínuas moradas representan los cambios estructurales que experimentará la proteína del lado citoplásmico para pasar al estado E_2. A la derecha se muestra el estado conformacional E_2 sin Ca^{2+} obtenido en presencia de tapsigargina (TG) (Triángulo color morado invertido). Los círculos en rojo representan puentes de hidrógeno. Imagen tomada de la referencia [19].

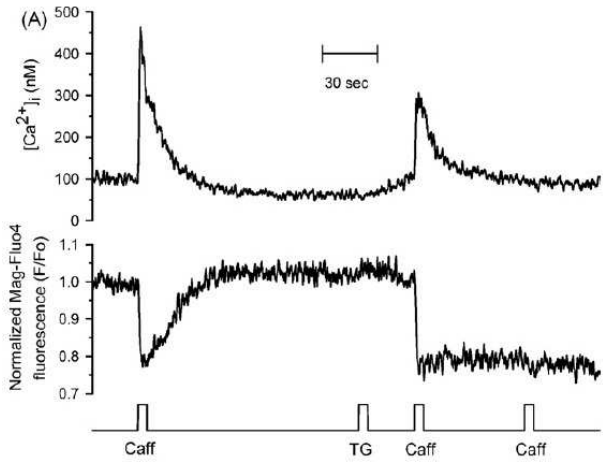

Figura 2: Registros simultáneos de la concentración intracelular de Ca^{2+} y la respuesta de Ca^{2+} del RS inducidos por la activación de los RyR con cafeína y el efecto de la inhibición de la bomba SERCA con tapsigargina (TG) en estas respuestas. Cambios en $[Ca^{2+}]_i$ (panel superior) y los niveles de Ca^{2+} en el RS, normalizados a su valor de resposo (panel medio), registrados en respuesta a la aplicación de 20 mM de cafeína (Caff) por 5 s (panel inferior). Después de 2 minutos en reposo, 10 μM de tapsigargina (TG) fue aplicado por 5 s. Una segunda aplicación de cafeína produce un transitorio de Ca^{2+} significativamente menor, asociado con una reducción normal del nivel de Ca^{2+} luminal. Note que una tercera aplicación de cafeína no produce cambios en $[Ca^{2+}]_i$ ni en la respuesta del Ca^{2+} luminal, sugiriendo el completo vaciamiento de la poza intracelular de Ca^{2+} por la aplicación de tapsigargina. Imagen tomada de la referencia [22].

1.3. El canal liberador de Ca^{2+} del RS/E (RyR)

El receptor de rianodina (RyR) es una proteína homotetramérica con un poro conductor de Ca^{2+}, localizada en la membrana del RS/E (vea la Figura 3), y de peso molecular aproximado de 2 MDa (cada subunidad del RyR pesa más de 550 KDa [24]) [20] . Este es uno de los canales por los que ocurre la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares de Ca^{2+} hacia el citoplasma [20]. Su nombre se debe a que el alcaloide rianodina (el cual se

une a este receptor con alta afinidad y especificidad [20]) interacciona preferentemente con el estado abierto del canal [24].

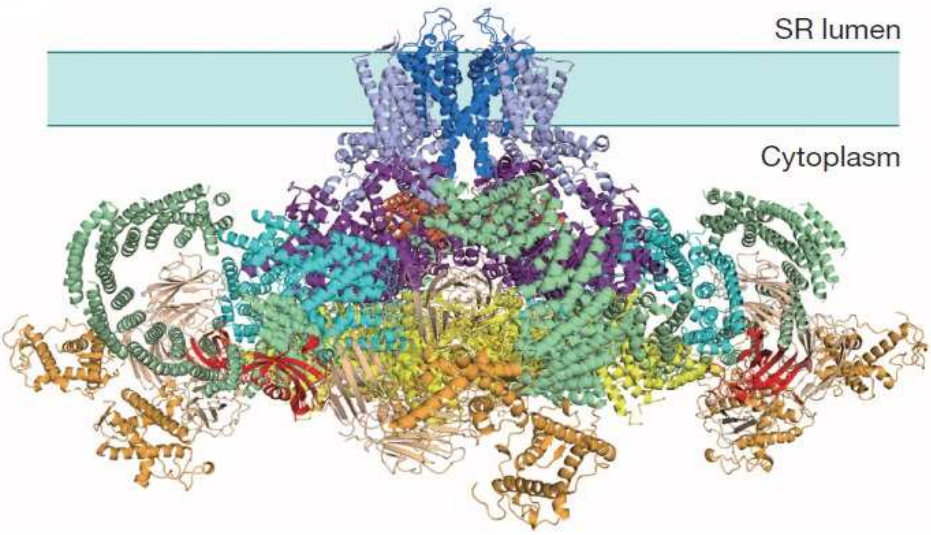

Figura 3: Estructura del receptor de rianodina. Estructura general del RyR1 de conejo en complejo con FKBP12 (estructura en color rojo localizada en la parte izquierda del lado citoplásmico). La estructura se presenta con el lado luminal del RS en la parte superior. Figura tomada de la referencia [25].

El RyR existe en tres isoformas (RyR1-3) [20] y es modulado directa o indirectamente por los receptores de dihidropiridinas, así como por varios iones, moléculas pequeñas y proteínas, i. e. Ca^{2+}, Mg^{2+}, cinasa A, calmodulina, la cinasa II dependiente del complejo Ca^{2+}/calmodulina, CSQ, triadina y junctina [24]. De los anteriores, el Ca^{2+} es el principal agonista fisiológico del RyR. Un incremento en $[Ca^{2+}]_i$ activa al receptor por medio de un proceso denominado CICR (*Calcium Induced Calcium Release*). Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} [26, 27].

A su vez, el RyR puede responder a una serie de estímulos de Ca^{2+} por medio de un mecanismo de adaptación [26]. Gyorke S *et al* [26] han medido la probabilidad de apertura (Po) del RyR a partir de sus corrientes de Ca^{2+} inducidas al elevar $[Ca^{2+}]$ por medio de la técnica de flash fotólisis. En el panel superior de la Figura 4 se muestra el curso temporal de la Po del RyR y los tiempos en los que los autores midieron la Po, al

inicio (peak) y al final (plateau) del estímulo. En el panel inferior se muestra el curso temporal de $[Ca^{2+}]$ y los tiempos en los que se aplicó el estímulo (flechas). Es necesario mencionar que los autores también midieron la Po en estado estacionario (midiendo la Po a $[Ca^{2+}]$ constantes por un largo periodo de tiempo, datos no mostrados en la Figura 4).

A partir de los resultados mostrados en la Figura 4, los autores sugieren que el mecanismo de adaptación del RyR ocurre de la siguiente manera. Un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ induce actividad en el canal como consecuencia de la unión del Ca^{2+} al sitio de activación del RyR (1.2 ms). La unión de Ca^{2+} al sitio de activación del RyR provoca un cambio conformacional en este último, lo que induce un lento decremento en la afinidad del sitio de activación por Ca^{2+} (1.3 s). Esto resulta en una menor ocupación del sitio de activación y en un decaimiento en la actividad del canal (fase de relajación). La fase de relajación permite que el sitio de activación esté disponible para un segundo estímulo [26].

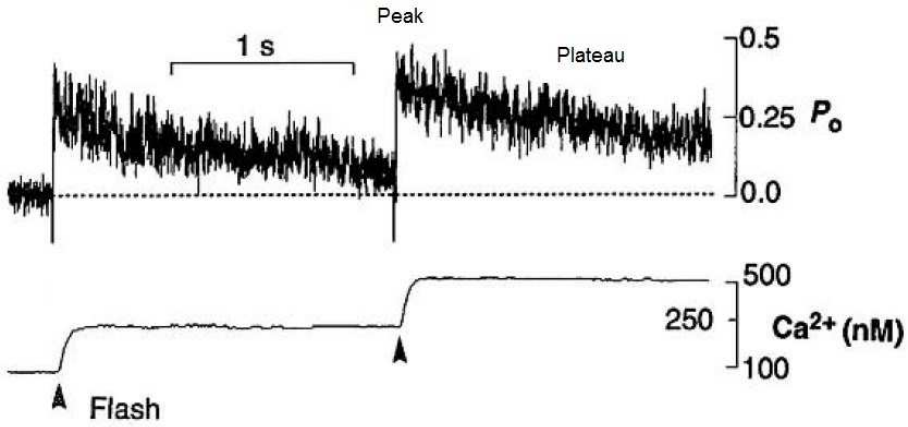

Figura 4: Respuesta de adaptación del RyR cardíaco en bicapas planas ante la liberación de Ca^{2+} enjaulado. El RyR cardíaco en bicapas lipídicas fue expuesto a elevaciones controladas de Ca^{2+} por medio de la técnica de foto-liberación de Ca^{2+} (flash). El RyR exhibe una rápida activación y una lenta caída de la actividad en respuesta a la elevación de $[Ca^{2+}]$. Note que una segunda elevación de Ca^{2+} estimula una actividad del canal de similar magnitud a pesar de que el nivel de Ca^{2+} es mayor. Imagen tomada de la referencia [26].

Más aún, Gyorke S *et al* [26] reportan que la sensibilidad del canal por Ca^{2+} es 10 veces mayor cuando el Ca^{2+} es aplicado por fotólisis (círculos blancos de la Figura 5) que cuando el Ca^{2+} se mantiene constante por un largo periodo de tiempo (triángulos invertidos de la Figura 5). Así mismo, los autores reportan que las mediciones de estado estacionario a $[Ca^{2+}]$ constante correlacionan directamente con la Po medida al final de la corriente de Ca^{2+} del RyR inducida por fotólisis (círculos negros de la Figura 5).

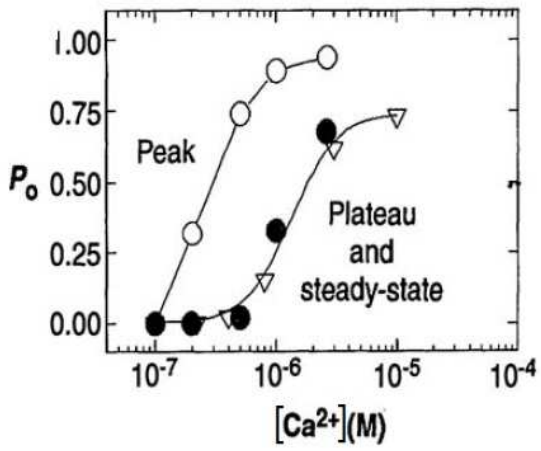

Figura 5: Probabilidad de apertura (Po) del RyR dependiente de la concentración de Ca^{2+}. La Po fue medida al pico de la corriente (peak) (círculos blancos), al final de la corriente (plateau) (círculos negros) de la Figura 4 y en estado estacionario (steady-state) (triángulos invertidos). Imagen tomada de la referencia [26].

Por otra parte, el RyR también ha sido caracterizado farmacológicamente utilizando cafeína, la cual incrementa la sensibilidad del RyR por Ca^{2+} (aumentando frecuencia y duración de los eventos de apertura del RyR), de forma tal que el canal se abre a concentraciones basales de Ca^{2+} citoplásmico [28]. La aplicación de cafeína por varios segundos dispara cambios bifásicos transitorios en $[Ca^{2+}]_i$, vea la Figura 6. Estos transitorios de Ca^{2+} se caracterizan por presentar dos componentes cinéticos: un incremento inicial rápido en $[Ca^{2+}]_i$ debido a la rápida liberación de Ca^{2+} en el retículo (nM/s) (vea el recuadro de la Figura 6), y su subsecuente disminución debido a diversos mecanismos de remoción y secuestro de Ca^{2+} [29]. La máxima velocidad de liberación de Ca^{2+} es un

indicador de la máxima actividad de los canales de RyR (N*Po), dónde N es el número total de canales, toda vez que el gradiente electroquímico no se ha reducido significativamente durante este periodo de tiempo [30]. Por otra parte, el contenido de Ca^{2+} en el retículo determina la amplitud del transitorio de Ca^{2+} estimulado por cafeína (si se considera que los sistemas de remoción de Ca^{2+} son más lentos que los canales) [31]. Esta amplitud se verá afectada también si se modifica la capacidad amortiguadora del citoplasma.

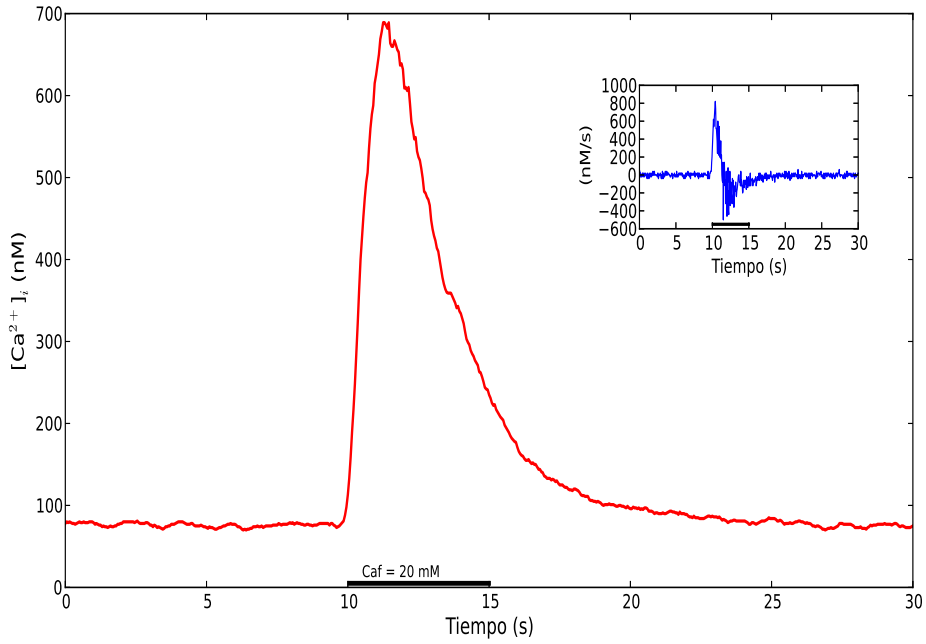

Figura 6: Transitorio de Ca^{2+} generado al aplicar 20 mM de cafeína (Caf) por 5 s a una CML. El recuadro muestra la velocidad de la liberación de Ca^{2+} ($d[Ca^{2+}]_i/dt$) ante esta misma dosis de cafeína. Resultados experimentales proporcionados amablemente por el Dr. Agustín Guerrero a mi persona.

1.4. Colocalización del RyR y la bomba SERCA

Viquez *et al* [32] mostraron que la mayoría de los RyRs y las bombas SERCA colocalizan en las CML, como se observa en la Fig. 8. En el panel (A), se presenta la tinción en

rojo de los RyRs donde se observa una distribución irregular y discontinua que abarca las tres diferentes regiones del RS (periférica, citoplásmica y perinuclear). En el panel (B), se observa que la bomba SERCA también está distribuida en parches pero a diferencia del RyR, se localiza sólo en dos zonas del RS, la periférica y la perinuclear. En el panel (C), se observa la colocalización (color amarillo) de estas dos proteínas tanto en la región perinuclear como en la periférica del RS, lo cual posibilita la comunicación entre ellas para regular los flujos de Ca^{2+}.

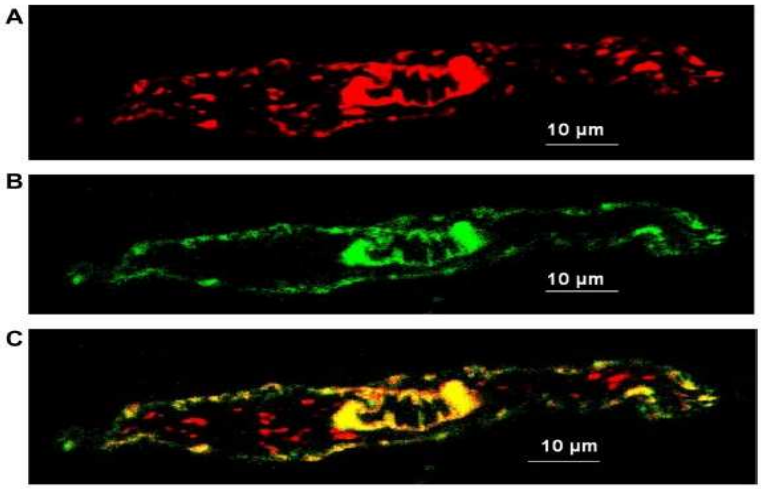

Figura 7: Colocalización de la bomba SERCA y del RyR en CML. Los paneles (A) y (B) muestran las imágenes de la distribución de los RyR (tinción de color rojo) y de las bombas SERCA (tinción color verde) respectivamente, de una CML. Las imágenes fueron obtenidas simultáneamente por microscopio confocal. En el panel (C) se muestra que las dos proteínas colocalizan en algunas regiones del RS, especialmente en la zona perinuclear y superficial (tinción de color amarillo). Imagen tomada de la referencia [32].

1.5. Los flujos de Ca^{2+}

Los flujos iónicos que producen los cambios en $[Ca^{2+}]$ dentro del citosol ($[Ca^{2+}]_i$) dependen del transporte de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (J_{MP}) y entre el citoplasma y los diferentes organelos como sería el RS/E ($J_{RS/E}$) [12]. El flujo de Ca^{2+} entre compartimentos es la suma de múltiples flujos de Ca^{2+} microscópicos que repre-

sentan la actividad de poblaciones específicas de transportadores de Ca^{2+} [12]. De esta manera, cada flujo macroscópico es la suma algebraica de flujos unitarios o microscópicos. Está implicito que los transportadores funcionan de forma independiente entre ellos, proporcionando el enlace entre las descripciones moleculares y celulares en la señalización por Ca^{2+} (vea la Figura 8) [12].

La existencia de múltiples compartimentos que regulan al Ca^{2+} crea otro nivel de acoplamiento funcional entre las vías de transporte de Ca^{2+}. Esto se debe a que las vías de transporte de Ca^{2+} que regula la concentración de Ca^{2+} en cada compartimento depende de la dinámica de Ca^{2+} en otros compartimentos. Entonces, para entender la dinámica de $[Ca^{2+}]$ en un compartimento u organelo, es necesario considerar simultáneamente la dinámica de Ca^{2+} en todos los compartimentos que interaccionan funcionalmente [12].

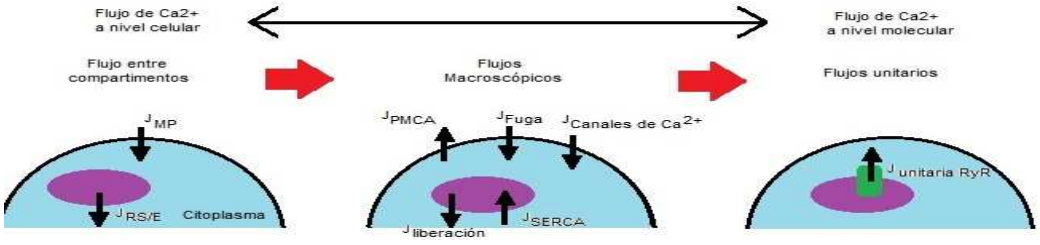

Figura 8: Flujos de Ca^{2+} entre compartimentos. Los flujos de Ca^{2+} entre compartimentos producen cambios en $[Ca^{2+}]$ citoplásmica así como en los diferentes organelos de la célula, como el RE (imagen de la izquierda). Los flujos de Ca^{2+} macroscópicos son producidos por las poblaciones de los diferentes trasportadores de Ca^{2+} (imagen central). Los flujos unitarios de forma independiente y con el mismo peso contribuyen a cada uno de los flujos macroscópicos (imagen de la derecha). Imagen modificada de la referencia [12].

1.6. La capacidad amortiguadora de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares

La concentración total de Ca^{2+} en un compartimento celular (x), está determinada por:

$$[Ca^{2+}]_{Tx} = [BCa] + [Ca^{2+}]_x, \tag{1}$$

dónde $[Ca^{2+}]_{Tx}$ es el Ca^{2+} total, $[BCa]$ sería el Ca^{2+} pegado a proteínas y $[Ca^{2+}]_x$ sería la concentración de Ca^{2+} libre (que se puede detectar). Con la finalidad de conocer la cantidad de Ca^{2+} pegado a proteínas, se determina la capacidad amortiguadora de ese compartimento (x). Que no es otra cosa más que la relación que hay entre un incremento de $[Ca^{2+}]_x$ que resulta del incremento de $[Ca^{2+}]_{Tx}$ [12, 33], vea la expresión (2),

$$\frac{\Delta[Ca^{2+}]_x}{\Delta[Ca^{2+}]_{Tx}}. \tag{2}$$

Conviene subrayar que este cociente tiene una relación inversa con la definición inicial de capacidad amortiguadora de Ca^{2+} propuesta por E. Neher $d[Ca^{2+}]_{Tx}/d[Ca^{2+}]_x$ [34]. Hay que mencionar, además, que el cociente de la expresión (2) está basado en la premisa de que los cambios en $[Ca^{2+}]_x$ son estrictamente proporcionales a los cambios en $[Ca^{2+}]_{Tx}$ [35]. Dicha constante de proporcionalidad tendría que ser calculada para cada célula y el resultado sería preciso únicamente si la constante fuera invariante tanto en el tiempo como en el espacio; una situación que es poco probable [35]. Se debe agregar que las señales de Ca^{2+} son detectadas por medio de amortiguadores exógenos y en consecuencia influyen en las señales de Ca^{2+} [35]. De aquí que E. Neher [35] propusiera que la capacidad amortiguadora se determinara considerando explicitamente al Ca^{2+} unido a los amortiguadores $[BCa]$ (tanto endógenos como exógeneos) y se representará por el símbolo β, vea la ecuación (3),

$$\beta = \frac{d[BCa]}{d[Ca^{2+}]_x}. \tag{3}$$

Por otra parte, la interacción de Ca^{2+} con sus sitios de unión puede ser descrita por la siguiente reacción:

$$[B]_x + [Ca^{2+}]_x \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} [BCa],$$

dónde $[B]_x$ representa la concentración de sitios de unión a Ca^{2+} en el compartimento x, que están libres para unir Ca^{2+}. $[Ca^{2+}]_x$ denota la concentración de Ca^{2+} libre en el compartimento y [BCa] es la concentración de Ca^{2+} interaccionando con sus sitios de unión. La flecha de arriba en la reacción indica la asociación de Ca^{2+} a los sitios de unión, la cual es gobernada por la constante cinética de unión (k_{on}) con unidades de $[M^{-1}s^{-1}]$. La flecha de abajo indica la disociación del complejo [BCa], la cual es gobernada por la constante de velocidad de disociación (k_{off}) con unidades de s^{-1}. En el equilibrio no hay cambio neto en las concentraciones de $[B]_x$, $[Ca^{2+}]_x$ y [BCa].

Por otra parte, siempre y cuando la concentración total de los sitios de unión a Ca^{2+} sea constante, $[B]_{Tx}=[B]_x+[BCa]$, la concentración del complejo [BCa] quedará determinada por la ecuación (4),

$$[BCa] = [B]_{Tx}\frac{[Ca^{2+}]_x}{K_D + [Ca^{2+}]_x}, \tag{4}$$

dónde $K_D=[B]_x[Ca^{2+}]_x/[BCa]$ es la constante de disociación al equilibrio entre Ca^{2+} y los sitios de unión.

En razón de lo expuesto, la habilidad del citosol o del lumen de los compartimentos para amortiguar Ca^{2+} puede ser numéricamente caracterizada por β [36, 37]. Por consiguiente, partiendo de la ecuación (4), β puede ser descrita por la ecuación (5),

$$\beta = [B]_{Tx}\frac{K_D}{(K_D + [Ca^{2+}]_x)^2}. \tag{5}$$

De acuerdo con la ecuación (5), en ausencia de Ca^{2+} en el compartimento, hay una cantidad fija de sitios de unión que depende de $[B]_{Tx}$ y de K_D, $\beta = [B]_{Tx}/K_D$. Es decir, β inicialmente depende de cuántos sitios de unión a Ca^{2+} haya en el compartimento y de la afinidad del Ca^{2+} por sus sitios de unión (ver señalamiento de las flechas anaranjandas en la Figura 9). Observe de la Figura 9 que entre más afinidad tenga el Ca^{2+}

por los sitios de unión (K_D muy pequeña) mayor capacidad amortiguadora presenta el compartimento. En general, β es una función inversa de $[Ca^{2+}]_x$. Entre más Ca^{2+} libre haya en el compartimento, los sitios disponibles para unir Ca^{2+} irán disminuyendo, vea la Figura 9. Note que cuando $K_D \gg [Ca^{2+}]_x$, β es para todo fin práctico constante [23] (observe el recuadro de la Figura 9). De hecho, para un amortiguador no saturado y de baja afinidad, β es simplemente el cociente de su concentración total $[B]_{Tx}$ sobre su constante de disociación K_D [38].

Experimentalmente hablando, es difícil medir cuanto Ca^{2+} está interaccionando con los sitios de unión a Ca^{2+}, por lo que resulta más fácil modificar $[Ca^{2+}]_{Tx}$ dentro del compartimento [39, 40]. Además, de acuerdo con la ecuación (1),

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{Tx}}{d[Ca^{2+}]x} = 1 + [B]_{Tx}\frac{K_D}{(K_D + [Ca^{2+}])^2}, \tag{6}$$

Es decir,

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{Tx}}{d[Ca^{2+}]x} \approx \frac{d[BCa]}{d[Ca^{2+}]x}. \tag{7}$$

Debido a que mucho del Ca^{2+} que entra al citoplasma se encuentra en su forma unida [41], se ha propuesto que $\beta \gg 1$. Entonces, para pequeños cambios en $[Ca^{2+}]_{Tx}$ y $[Ca^{2+}]_x$, la ecuación (6) puede ser sustituida por la aproximación dada en la ecuación (8) [36],

$$\beta = \frac{\Delta[Ca]_{Tx}}{\Delta[Ca^{2+}]x} = \frac{\Delta([BCa] + [Ca^{2+}]_x)}{\Delta[Ca^{2+}]_x}. \tag{8}$$

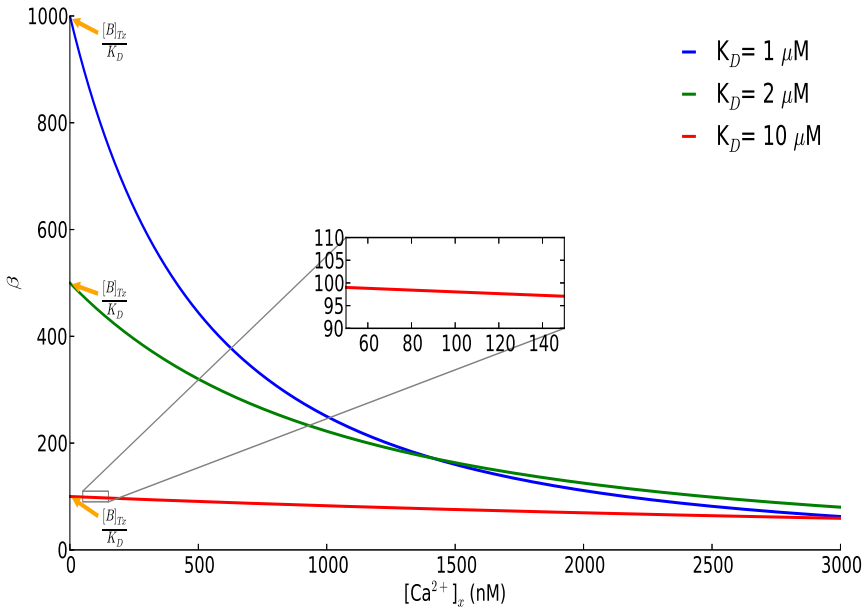

Figura 9: La capacidad amortiguadora de Ca^{2+}. La imagen muestra la dependencia de la capacidad amortiguadora β con respecto a Ca^{2+} en un rango de 0 a 3 μM, utilizando la ecuación (5), [B_{Tx}]= 1 mM y tres diferentes valores para K_D.

De aqui que la capacidad amortiguadora describa el destino del Ca^{2+} agregado al compartimento. En el caso del citosol es el resultado de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática o debido a los canales liberadores de Ca^{2+} del RS/E. Una capacidad amortiguadora de 100 significará que de 100 iones Ca^{2+} agregados a la célula, sólo uno permanecerá libre y los otros serán amortiguados [36]. De hecho, en células cromafines bobinas se ha estimado que $\beta \approx 89$, lo cual representa que 1 de cada 90 iones de Ca^{2+} que entran al citoplasma aparecerá como Ca^{2+} libre [37]. En CML de estómago de sapo se ha calculado que la capacidad amortiguadora del citoplasma tiene un valor de $\beta = 82$ [39]. A su vez, utilizando esta misma aproximación, se ha estimado que el valor de β para el RS en células de músculo esquelético de ratón es ≈ 157, implicando que de 157 iones Ca^{2+} liberados, 156 se encontraban unidos dentro del retículo [40].

1.7. Los indicadores fluorescentes de Ca^{2+}

Experimentalmente, el uso de los indicadores fluorescentes [F], en particular los compuestos de tetracarboxilato (Fura-2) o tricarboxilato (Mag-Fluo4) son de los métodos más comunes que se utilizan para la detección del Ca^{2+} libre. Estos indicadores son amortiguadores éxogenos que fluorescen diferencialmente dependiendo de $[Ca^{2+}]_x$ en el compartimento [23]. En el caso de que los indicadores de Ca^{2+} sean colocados en el interior de la célula, los sistemas de amortiguamiento rápidos endógenos compiten con el indicador para unir Ca^{2+} (Fura-2 une Ca^{2+} en el orden de ms [42]) y los procesos lentos (como el secuestramiento de Ca^{2+} en el RS/E) compiten con la difusión de Ca^{2+} y con los amortiguadores de Ca^{2+} (incluyendo los indicadores fluorescentes) [37]. Un modelo de reacciones del Ca^{2+} interaccionando con los amortiguadores endógenos $[B]_x$ ó exógenos $[F]_x$ se muestra a continuación:

$$[B]_x + [Ca^{2+}]_x \underset{k_{off_B}}{\overset{k_{on_B}}{\rightleftharpoons}} [BCa],$$

$$[F]_x + [Ca^{2+}]_x \underset{k_{off_F}}{\overset{k_{on_F}}{\rightleftharpoons}} [FCa],$$

dónde [BCa] y [FCa] respectivamente representan las concentraciones de los complejos moleculares que se forman cuando el Ca^{2+} está interaccionando con los sitios de unión a Ca^{2+} endógenos y con el fluoróforo (asumiendo una estequiometría 1:1 (F:Ca)). Las flechas de arriba en las reacciones indica la asociación de Ca^{2+} a los sitios de unión de los amortiguadores $[B]_x$ y $[F]_x$, las cuales son respectivamente gobernadas por las constantes cinéticas de asociación (k_{on_B}) y (k_{on_F}), con unidades de $[M^{-1}s^{-1}]$. Las flechas de abajo en las reacciones indican la disociación de los complejos [BCa] y [FCa], los cuales son respectivamente gobernados por las constantes de velocidad de disociación (k_{off_B}) y (k_{off_F}) con unidades de s^{-1}. En el equilibrio, las concentraciones de las especies químicas involucradas ($[Ca^{2+}]_i$, $[B]_x$, $[F]_x$, [BCa] y [FCa]) alcanzan un valor constante [43]. Es decir, no se observa un cambio neto en el valor de las concentraciones. Sin embargo, si hay un aumento o disminución en $[Ca^{2+}]$ dentro del compartimento, se pierde el equilibrio y aumentará o disminuirá la probabilidad de formación de los complejos [BCa] y

[FCa]. Las variaciones en [FCa] se ven reflejadas en un aumento o disminución de la fluorescencia, la cual sirve para registrar la dinámica de los flujos de Ca^{2+} dentro del compartimento.

2. Antecedentes directos

"There is nothing permanent except change."

—Heraclitus

En este capítulo se presenta la evidencia experimental que demuestra que el RS/E es más que una poza de Ca^{2+} intracelular, sino que existe modulación y comunicación funcional entre sus componentes. La modulación de la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} en el RS/E se presenta en la sección 2.1. En la sección 2.2 se presentan las evidencias que sugieren la comunicación funcional entre la bomba SERCA, las proteínas amortiguadoras luminales y los canales de liberación de Ca^{2+}.

2.1. Las proteínas luminales modulan la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} en el RS/E

Tomando en consideración que el volumen del RS/E representa del 1.5 al 7.5 por ciento del volumen de la célula, el RS/E requiere una gran capacidad para almacenar Ca^{2+} y proporcionar suficiente Ca^{2+} al citoplasma para producir un cambio considerable en $[Ca^{2+}]_i$. Esta capacidad de almacenar Ca^{2+} es proporcionada por las proteínas que unen Ca^{2+} con baja afinidad y alta capacidad en el RS/E, como es la calsecuestrina CSQ (ver la Figura 10) y la calreticulina [32].

Una forma sencilla de representar la capacidad amortiguadora del RS es mediante un sistema de vasos comunicantes, donde el vaso 1 es de menor volumen que el vaso 2. El vaso 1 representa el Ca^{2+} libre y el vaso dos la cantidad de Ca^{2+} pegado a proteínas o, en pocas palabras, su capacidad amortiguadora de Ca^{2+}. Los canales liberadores de Ca^{2+} como el RyR están representados por las llaves que cuando se abren dejan salir el agua. Por otro lado, la bomba SERCA sería el mecanismo de rellenado de los vasos comunicantes de forma independiente del estado en el que se encuentren las llaves (abiertas o cerradas), ver Figura 11.

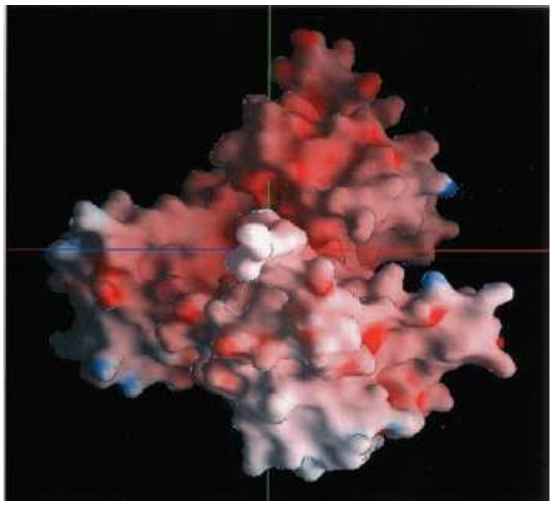

Figura 10: Superficie molecular de la CSQ esquelética de conejo. La imagen muestra el potencial electrostático de la proteína, en rojo se observa el positivo y en azul el negativo. Imagen tomada de la referencia [44].

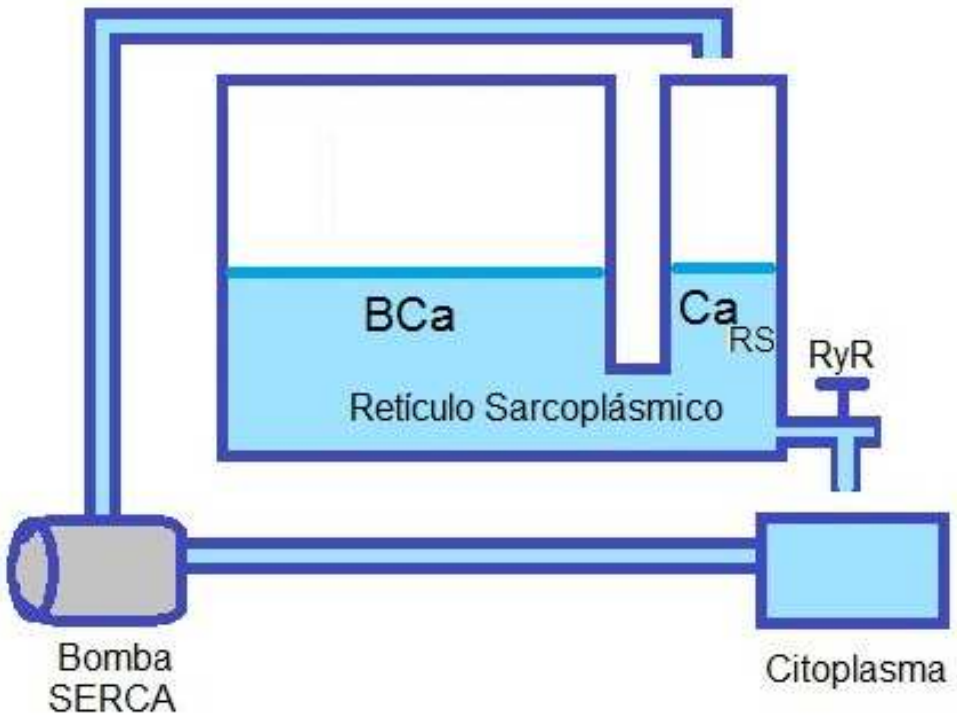

Figura 11: Analogía del RS/E con un modelo de vasos comunicantes. El modelo explica el concepto de equilibrio en la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} por parte del RS

La Figura 12 muestra el registro simultáneo del incremento de $[Ca^{2+}]_i$ y la concomitante reducción del nivel de Ca^{2+} del lumen del RS durante la aparición de una chispa de Ca^{2+}. El curso temporal casi en espejo de ambos eventos podría sugerir la idea de que efectivamente el RS se comporta como un sistema de amortiguamiento de Ca^{2+} al equilibrio. Una vez que se abren los canales liberadores, la caída del Ca^{2+} luminal libre reflejaría el grado de vaciamiento de las reservas de Ca^{2+}.

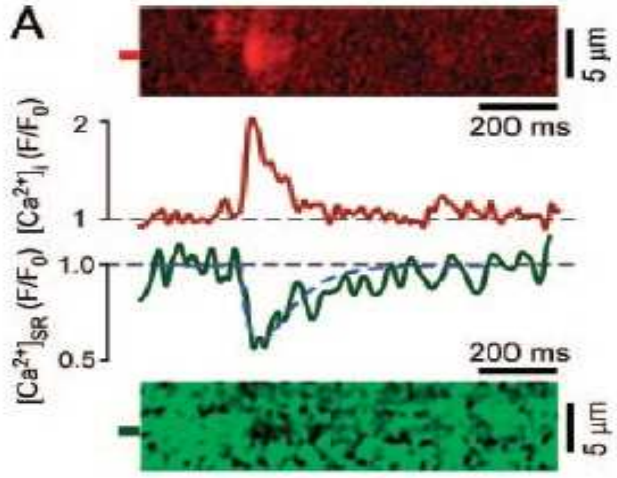

Figura 12: Registro de fluorescencia durante la generación de una chispa de Ca^{2+}. Registro simultáneo del Ca^{2+} citoplásmico (gráfica en rojo) y del luminal (gráfica en verde) consecuencia de la aparición de una chispa de Ca^{2+}. Imagen tomada de la referencia [45].

Sin embargo, diversos estudios han sugerido que el RS no es un simple reservorio de Ca^{2+}. Guerrero-Hernández, *et al* [1] analizaron los planos fase de los cambios en el Ca^{2+} luminal e intracelular en diferentes tipos de células, al inducir liberación de Ca^{2+} con diferentes agonistas, ver la Figura 13. El punto de inicio en cada panel se localiza en la esquina superior izquierda y las flechas indican la secuencia de eventos en el proceso de liberación. Los números indican diferentes fases y los insertos en cada panel los datos usados para generar el plano fase.

En el panel (A) se muestra la liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína en CML en donde se pueden distinguir 4 diferentes fases. En el panel (B) se muestra la liberación lo-

calizada de Ca^{2+} (chispa de Ca^{2+}) correspondiente a una célula de músculo esquelético. En este tipo de células, los mecanismos de amortiguamiento de Ca^{2+} citoplásmico son muy rápidos. Por esta razón los autores arguyen que las fases 2 y 3 no se pueden distinguir. El panel (C) muestra la liberación de Ca^{2+} inducida por cafeina en una neurona. En estas células también los mecanismos de remoción son suficientemente rápidos para que las fases 2 y 3 ocurran al mismo tiempo. En el panel (D) la liberación de Ca^{2+} se induce por histamina. En este caso las fases 1 y 2 son evidentes porque los mecanismos de remoción de Ca^{2+} citoplásmico son lentos, por lo que el Ca^{2+} luminal regresa a su nivel de reposo antes de que el Ca^{2+} intracelular lo haga.

En todos los casos, independientemente del tipo celular, así como de la naturaleza (chispa o respuesta global) o cinética del evento de Ca^{2+} (ms o s), se puede observar la presencia de la fase 1. Es decir, el incremento máximo de $[Ca^{2+}]_i$ sin una reducción significativa de los niveles de Ca^{2+} luminal. De aquí que la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ no refleja los cambios en $[Ca^{2+}]_{RS}$, lo que implica una aparente violación a la ley de conservación de la materia [1, 2].

Además, en aquellos casos que el amortiguamiento de Ca^{2+} citoplásmico es lento (CML y HeLa), se puede ver la fase 2. Esto es, el RS/E cambia drásticamente su capacidad amortiguadora, dando lugar a reducciones muy importantes del nivel de Ca^{2+} luminal sin mayor efecto en $[Ca^{2+}]_i$. Para este cambio tan dramático en el RS/E de una capacidad amortiguadora de Ca^{2+} casi infinita a una capacidad amortiguadora prácticamente igual a cero los autores sugieren lo siguiente. Que los canales de rianodina e IP_3 tienen acceso a una fuente oculta (y por lo tanto se esperaría que el Ca^{2+} libre no esté relacionado con el Ca^{2+} pegado a proteínas) de Ca^{2+} de gran capacidad. Los autores arguyen que la naturaleza de esta fuente no la conocen, pero pudieran ser las proteínas que unen Ca^{2+} en el RS como la CSQ o la calreticulina [1].

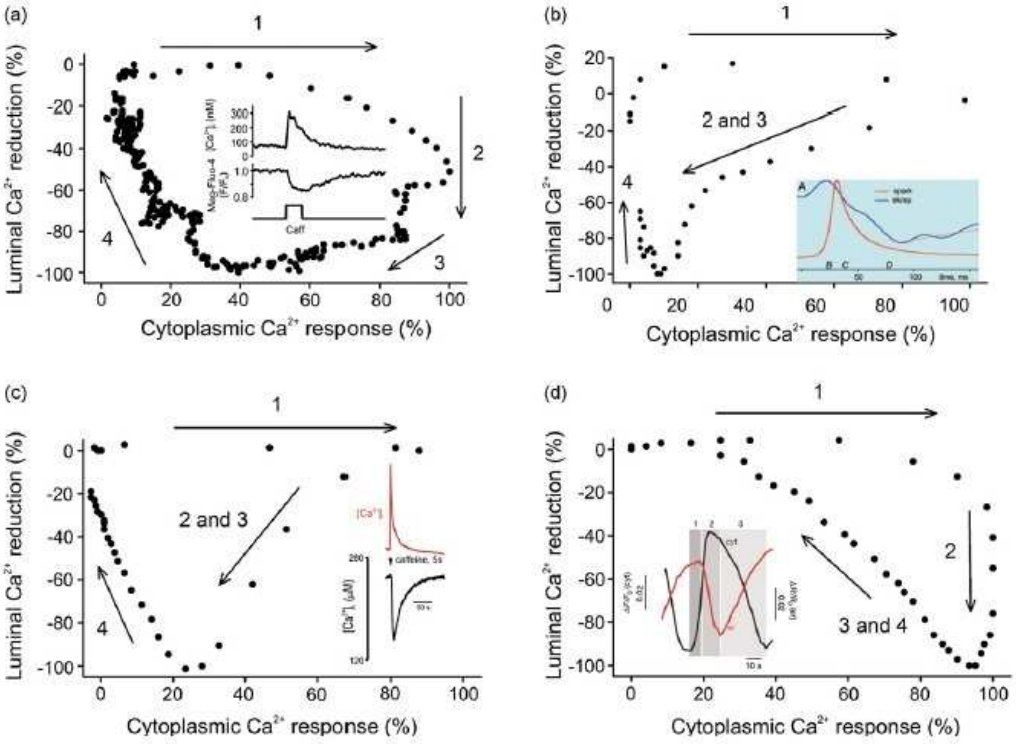

Figura 13: Planos fase de la liberación de Ca^{2+} de diferentes modelos celulares. En la imagen se muestran los planos fase de la liberación de Ca^{2+}, en los cuales se comparan los cambios en el Ca^{2+} luminal e intracelular de diferentes tipos de células. Imagen tomada de la referencia [1].

Un dato muy relevante que apoya esta hipótesis es la demostración de que la recuperación de la capacidad amortiguadora del RS en CML ocurre mucho después de la recuperación de los niveles normales de Ca^{2+} libre luminal (puesto que ambos parámetros deben recuperarse con la misma cinética en un sistema que está en equilibrio, vea la Figura 11), como lo mostró Guerrero-Hernández *et al* [1]. Este experimento consistió en activar los RyRs con cafeína y registrar simultáneamente el Ca^{2+} intracelular y luminal en CML. Un primer pulso de 20 mM de cafeína produce un incremento de Ca^{2+} intracelular asociado con un decremento de Ca^{2+} luminal, vea el panel (A) de la Figura 14. A los 30 segundos que tanto el Ca^{2+} intracelular como el luminal habían ya regresado a sus valores basales, se aplicó un segundo pulso de 20 mM de cafeína que indujo

la misma reducción del Ca^{2+} luminal, pero en este caso el incremento de Ca^{2+} citoplásmico fue mucho menor, comparado con la primera respuesta. El plano fase de este pulso se muestra en el panel (C). En este caso la fase 1 no está presente y la relación entre el Ca^{2+} luminal e intracelular es virtualmente líneal. Se requirieron varios minutos para restablecer el acceso a estas fuentes ocultas de Ca^{2+}, como se observó al aplicar un tercer pulso de cafeína, dónde ahora el plano fase obtenido fue similar al del primer pulso de cafeína, véase el panel (B). Estos datos sugieren que el periodo refractario en el proceso de liberación de Ca^{2+} pudiese deberse más al tiempo requerido de estructuración de la fuente oculta de Ca^{2+} que a la inactivación de los canales de liberación del RS.

En CML de vejiga urinaria de cobayo, la aplicación de un estímulo de cafeína (Caff) por 5 s indujo un decremento de la señal de Mag-Fluo4. Asociado con éste se observó un incremento de $[Ca^{2+}]_i$, vea el panel (A) de la Figura 15. Una vez terminado el estímulo de cafeína, la señal de Mag-Fluo4 se recuperó hasta llegar a los niveles basales. Dicha recuperación refleja la actividad de la bomba SERCA en su función de reestablecer el Ca^{2+} del RS. Posteriormente se aplicó tapsigargina (Tgn) para inhibir a la bomba SERCA. Observe que no se alteran los niveles de Ca^{2+} del RS después de la aplicación de tapsigargina. Un segundo estímulo con cafeína, produjo un transitorio de Ca^{2+} de menor amplitud y la misma respuesta de vaciamiento del Ca^{2+} luminal, pero en esta ocasión, la señal de Mag-Fluo4 no se recuperó al terminar el estímulo de cafeína. Estos datos sugieren que no existe una relación directa entre la reducción en la amplitud de las respuestas de Ca^{2+} del depósito y la señal correspondiente de Ca^{2+} citoplásmico, puesto que las respuestas de Ca^{2+} del retículo son similares, mientras que la amplitud de la señal de Ca^{2+} citoplásmico disminuye significativamente después de inhibir la bomba SERCA. Además, al analizar los planos fase de los cambios en el Ca^{2+} luminal e intracelular, vea el panel (B) la Figura 15, se observa que la fase 1 desaparece cuando se encuentra inhibida la bomba SERCA. Lo anterior sugiere que la actividad de la bomba SERCA es importante para obtener una liberación eficiente de Ca^{2+} aún cuando el nivel de Ca^{2+} libre dentro del RS se mantenga inalterado [46].

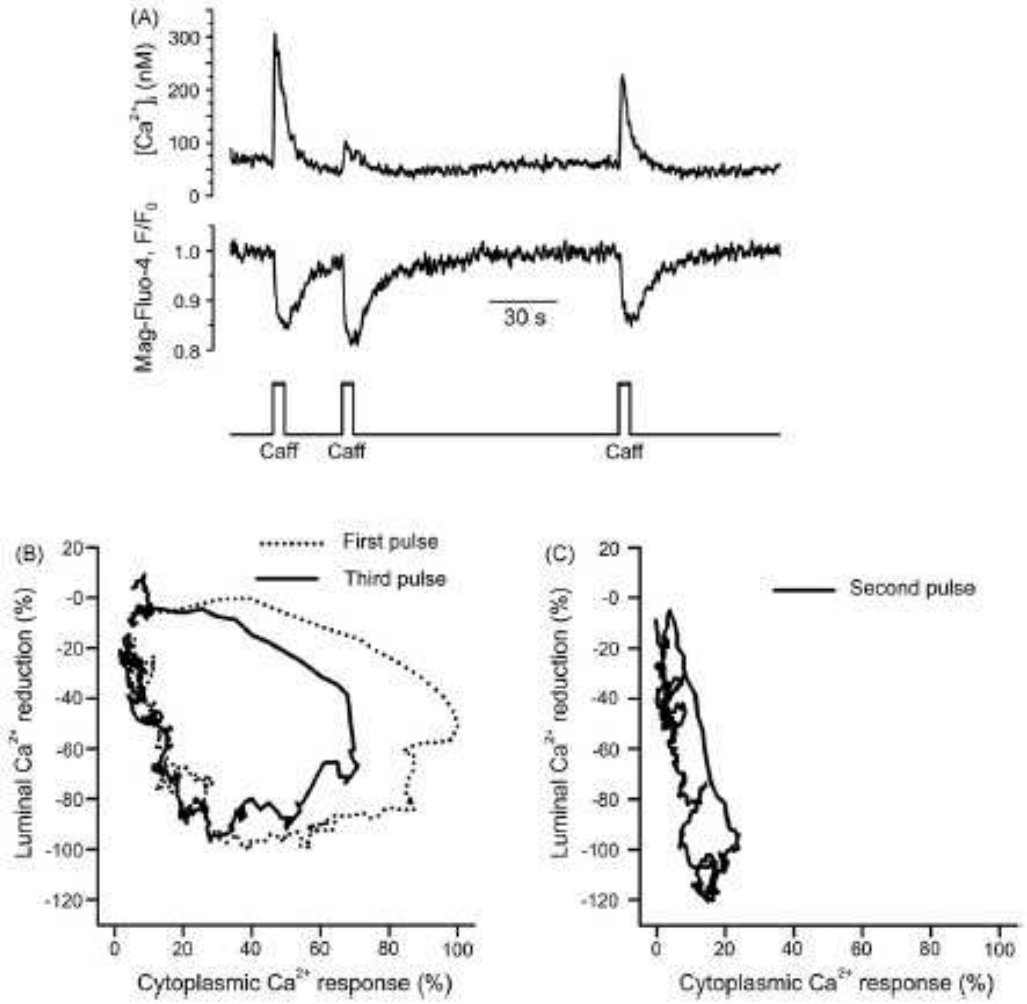

Figura 14: La capacidad amortiguadora presenta un periodo refractario. La recuperación de la capacidad de Ca^{2+} del RS no es instantánea con la recuperación del nivel basal de Ca^{2+}. Imagen tomada de la referencia [1].

La pregunta que se gesta a partir de los resultados anteriormente discutidos sería: ¿dónde se localiza esta supuesta fuente oculta de Ca^{2+}? Un posible canditado son las proteínas del RS que unen Ca^{2+}, como es el caso de la CSQ que también tiene la capacidad de formar polímeros. Para estudiar la relación entre la unión de Ca^{2+} y la polimerización de CSQ inducida por Ca^{2+}, Park *et al* [44] determinaron la cantidad de Ca^{2+} unido a CSQ cardíaca (cCSQ), CSQ de músculo esquelético (sCSQ) y a una mutante de CSQ cardiaca (Δ-C27 cCSQ), utilizando la técnica de espectroscopía de absorción atómica.

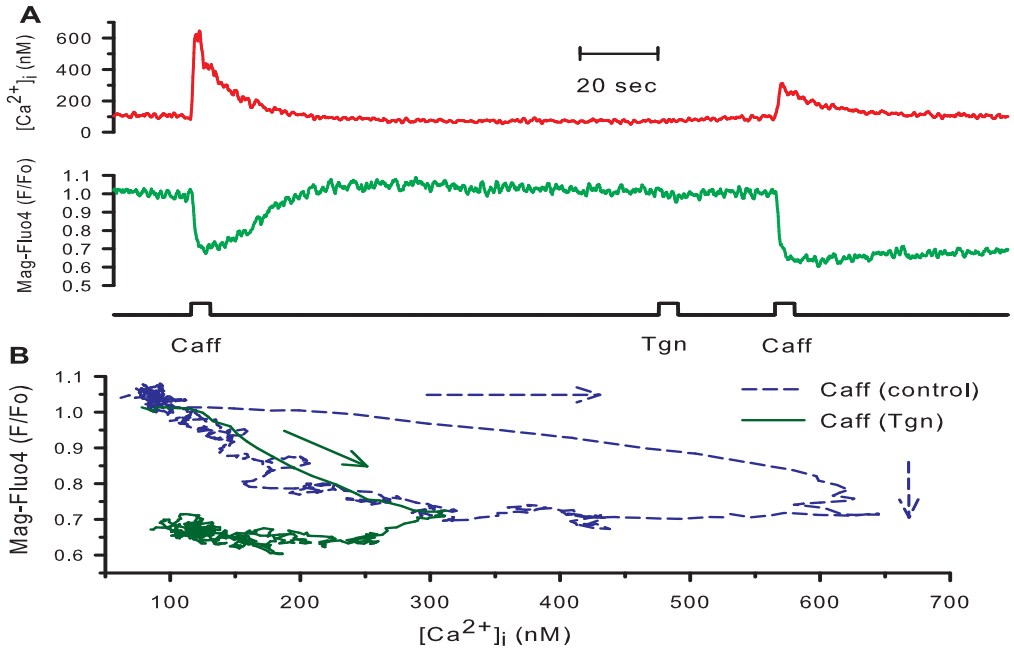

Figura 15: La liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína involucra 4 fases que dependen de la actividad de la bomba SERCA. Panel A, registro simultáneo de Ca^{2+} citoplásmico (superior) y del RS (inferior). Panel B, una inspección detallada de las respuestas mostradas en el panel A muestran que la cafeína induce un incremento en $[Ca^{2+}]_i$ antes de cualquier reducción de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (fase 1) seguido de una reducción abrupta en $[Ca^{2+}]_{RS}$ sin un efecto notable en $[Ca^{2+}]_i$ (fase 2). Note que la inhibición de la bomba SERCA con tapsigargina fusiona las fases 1 y 2 en una reducción linear de $[Ca^{2+}]_{RS}$ asociada con un pequeño incremento en $[Ca^{2+}]_i$. Imagen tomada de la referencia [46]

En la Figura 16 se puede observar que la sCQS muestra una mayor capacidad para unir Ca^{2+}, comparada con la cCSQ. Por su parte, Δ-C27 cCSQ muestra una reducción de la capacidad mayor al 50 por ciento comparado con las CSQ nativas. En las gráficas de cCSQ y sCSQ hay diversos cambios en la curvatura que sugieren que no hay un comportamiento monotónico de unión a Ca^{2+}, esto se hace todavía más claro cuando se convierten los datos a una gráfica tipo Scatchard, véase la Figura 17. Esta gráfica muestra que la constante de disociación (pendiente) va variando según la cantidad de Ca^{2+} unido a la CSQ. Como resultado de este análisis, podemos decir que las características de unión

de ambas proteínas varían o tienen transiciones que se inducen por los cambios en la concentración de Ca^{2+}.

De los datos anteriores Park sugiere que los cambios en la capacidad de unir Ca^{2+} de la CSQ están intimamente ligados a cambios de su polimerización. En la Figura 18 se muestra que la dimerización de CSQ ocurre en un rango de concentración de Ca^{2+} de 0.5 a 2.5 mM, y por arriba de estas concentraciones se detectan poblaciones de tetrámeros. La importancia de los dímeros, o estructuras superiores, es que el Ca^{2+} pudiese funcionar como pegamento para producir la multimerización de la CSQ y que este Ca^{2+} no se intercambia con el Ca^{2+} libre que sí se adsorbe a la superficie externa de la CSQ. Estas características de la CSQ sugiere una posible explicación de la observación de que el RS/E proporciona una gran cantidad de Ca^{2+} con una reducción mínima en $[Ca^{2+}]_{RS}$ [45, 2, 47].

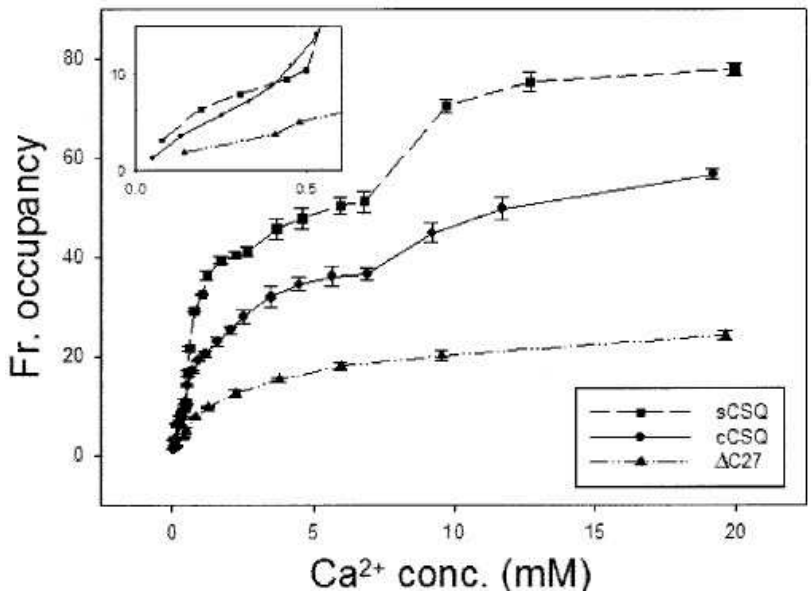

Figura 16: Polimerización de la CSQ. Imagen tomada de la referencia [44].

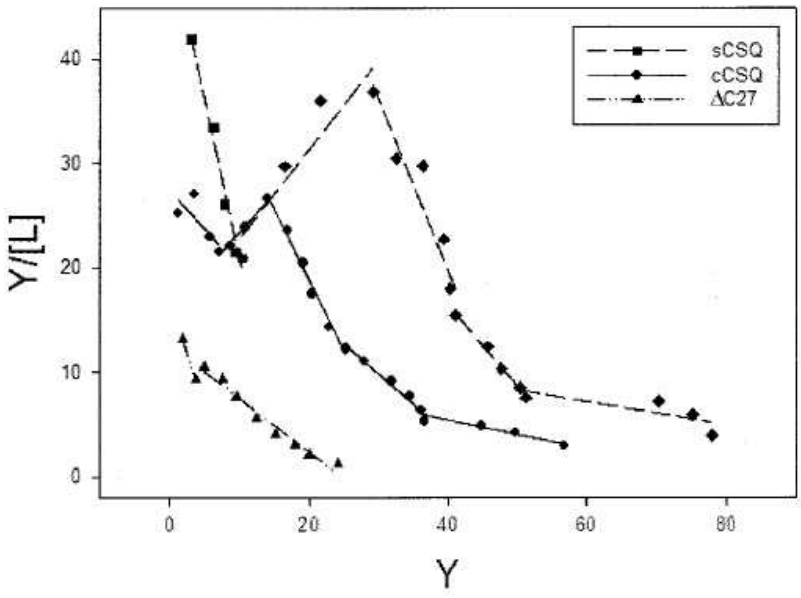

Figura 17: Gráfica tipo Scatchard de la unión de Ca^{2+} a CSQ. Imagen tomada de la referencia [44].

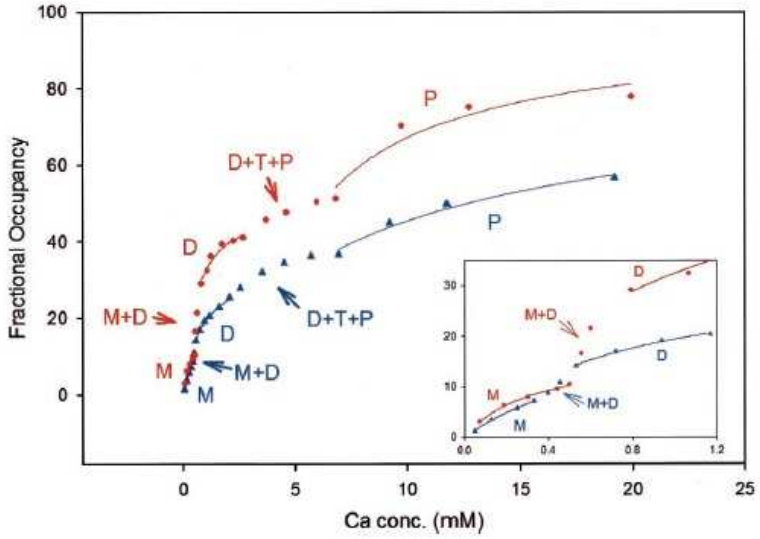

Figura 18: De monómeros a polímeros de CSQ. En la imagen se muestra que la CSQ pasa por diferentes estados conforme aumenta [Ca^{2+}], de monómeros (M), a dímeros (D), tetrámeros (T) y polímeros (P). Imagen tomada de la referencia [44].

Para estudiar los efectos del cambio en la concentración de Ca^{2+} luminal en los

mecanismos de liberación de Ca^{2+}, S. Györke *et al* [48] correlacionaron la actividad de un solo canal de rianodina, monitoreado en bicapas planas, con la probabilidad de apertura del canal al incrementar las concentraciones de Ca^{2+} del lado luminal (lado trans). El incremento de Ca^{2+} de 20 μM a 0.2-20 mM resultó en un incremento de 1.2 a 7 en la probabilidad de apertura, manteniendo una concentración citoplásmica (lado cis) de $\approx$ 100 nM (cispCa7). El efecto del Ca^{2+} luminal fue mayor a bajos niveles de Ca^{2+} citoplásmico (cispCa7) que a altos niveles (cispCa6). Estos resultados sugieren que la liberación de Ca^{2+} por medio de los receptores de rianodina está modulada por el Ca^{2+} luminal, véase la Fig. 19.

Guerrero-Hernández *et al* [1], propusieron un modelo hipotético de cómo los canales de liberación de Ca^{2+} tienen acceso a las fuentes ocultas de Ca^{2+}. En el panel (A) de la Figura 20 la imagen representa cómo los iones de Ca^{2+} están secuestrados por proteínas luminales que enlazan Ca^{2+}. Estos iones de Ca^{2+}, que se encontrarían entre las proteínas secuestradoras, no se intercambian con el Ca^{2+} libre luminal. De hecho el modelo propone la idea de que la cantidad de Ca^{2+} atrapado por las proteínas luminales es mayor que el Ca^{2+} libre luminal. Esto se refleja en una diferente densidad de puntos. En el panel (B) se representa la fase 1 de la liberación de Ca^{2+}, dónde los canales de liberación activos inducen la despolimerización de las proteínas que unen Ca^{2+}. Para producir un incremento localizado de Ca^{2+} luminal cerca de los canales de liberación (circulos rojos), los iones de Ca^{2+} llegan al citoplasma como consecuencia de que el control por el Ca^{2+} luminal abre un mayor número de canales de liberación. Esto significa un incremento del Ca^{2+} citoplásmico sin una reducción en el Ca^{2+} luminal. Si durante la liberación de Ca^{2+} de las proteínas luminales, el poro de los canales de liberación estuviera bloqueado o no se reclutasen un número mayor de canales de liberación, entonces el Ca^{2+} podría difundir hacia el interior del RS haciéndose evidente como un incremento detectado por los indicadores de Ca^{2+} dentro del RS . En el panel (C) se representa la fase 2 que involucra la extenuación del Ca^{2+} liberado por las proteínas del RS, de forma tal que ahora los canales de liberación mueven únicamente Ca^{2+} luminal, lo que se ve reflejado en una fuerte reducción en el Ca^{2+} luminal con un efecto muy pobre en el Ca^{2+}

intracelular. Es importante recordar que la recuperación de esta fuente oculta de Ca^{2+} implica la transición del estado representado en (C) hacia el estado mostrado en (A), en una condición en la que no sólo es necesaria la recuperación del Ca^{2+} luminal por medio de las bomba SERCA, sino también la reorganización de la fuente oculta de Ca^{2+}. En el panel (D) se muestran los canales de fuga, ellos no pueden inducir la despolimerización de las proteínas que enlazan Ca^{2+}, asi que cuando estos canales se abren sólo movilizan el Ca^{2+} libre luminal, y en consecuencia no muestran un efecto importante en el Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, los canales de fuga pueden activar la bomba SERCA al reducir el Ca^{2+} luminal produciendo un nuevo estado que facilite la interacción de las proteínas que unen Ca^{2+} con los canales de liberación.

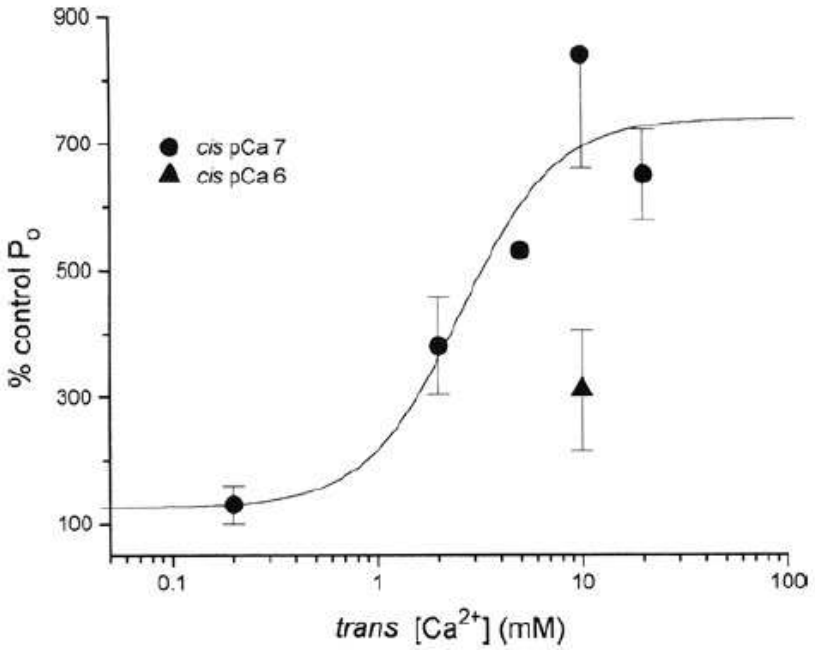

Figura 19: Probabilidad de apertura del receptor de rianodina al incrementar las concentraciones de Ca^{2+} luminal (trans). Imagen tomada de la referencia [48].

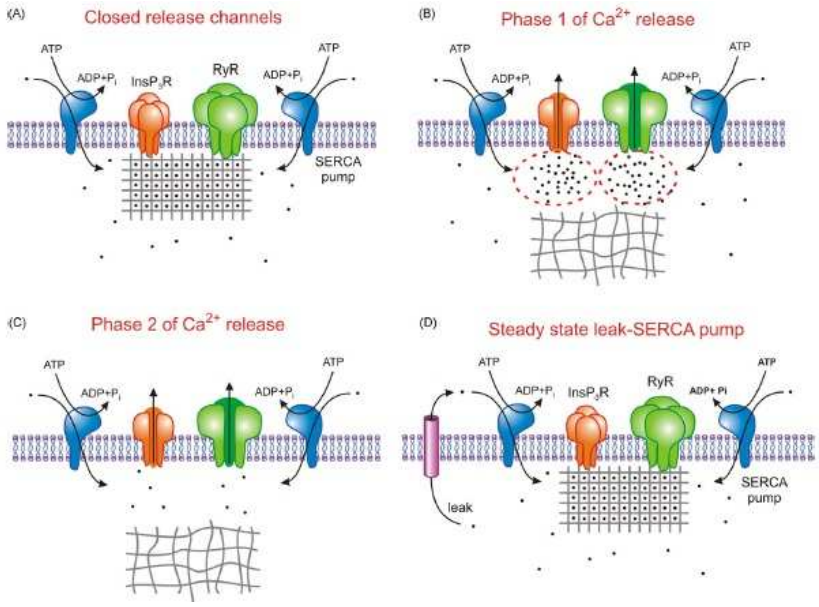

Figura 20: Modelo hipotético de cómo los canales de liberación de Ca^{2+} tienen acceso a las fuentes ocultas de Ca^{2+}. Imagen tomada de la referencia [1].

Igualmente, Dagnino *et al* [22] demostraron que los IP_3Rs también pueden inducir un incremento en la concentración de Ca^{2+} luminal cuando son activados vía los receptores muscarínicos, y al mismo tiempo son parcialmente bloqueados con heparina. Estos datos confirman que tanto los RyRs como los IP_3Rs inducen liberación de Ca^{2+} de las proteínas luminales en respuesta a la activación de estos canales de liberación.

La presencia de estas fuentes ocultas de Ca^{2+} es evidente en células cardiacas, puesto que la sobreexpresión de CSQ conteniendo una mutación puntual ($CASQ2^{R33Q}$) produce chispas de Ca^{2+} de gran amplitud, aunque aqui parece que el retículo está agotado parcialmente por la reducción en la concentración del Ca^{2+} libre luminal [49]. Adicionalmente, la reducción en la concentración de Ca^{2+} libre luminal es similar para la chispas de Ca^{2+} pequeñas que para las ondas de Ca^{2+} grandes [45]. Todos estos datos implican que el cambio en la concentración de Ca^{2+} libre luminal no puede ser correlacionado con la cantidad total de Ca^{2+} liberado por el RS, de forma tal que nosotros hemos hipotetizado que hay una fuente oculta de Ca^{2+} luminal para estos canales liberadores [1].

2.2. Interacción o comunicación funcional entre los componentes del RS/E

Otras evidencias apoyan la idea de que el RS no funciona como un simple reservorio de Ca^{2+}, sino que hay interacción o comunicación entre sus componentes. Típicamente, la bomba SERCA está involucrada en el mantenimiento y reabastecimiento interno de las pozas intracelulares de Ca^{2+} [50]. Sin embargo, el bloqueo de la bomba SERCA produce respuestas de Ca^{2+} inducidas por agonistas para el RyR e IP_3R más lentas y de menor amplitud, además de un mayor vaciamiento del RS [3]. Este tipo de respuesta no puede ser explicado por una reducción en los niveles de Ca^{2+} libre luminal o por la fuga de Ca^{2+} del RS [3]. La necesidad de que la bomba SERCA esté activa para una liberación de Ca^{2+} eficiente parece que involucra otro mecanismo que modula de alguna forma la disponibilidad del Ca^{2+} dentro del RS [3].

Estudios cinéticos de la liberación y reabsorción de Ca^{2+} en vesículas del RS muestran que la velocidad de reabsorción de Ca^{2+} incrementa conforme aumenta la velocidad de liberación de Ca^{2+}. Lo anterior sugiere que la liberación y reabsorción de Ca^{2+} no operan de forma independiente y que de hecho están coordinadas [29]. Se ha propuesto que la activación de los RyRs con bajas concentraciones de polilisina induce cambios conformacionales que son transmitidos a la CSQ, ya que se han observado incrementos de los niveles de Ca^{2+} luminal [51]. Esto es porque se libera Ca^{2+}, de estas proteínas ante un número bajo de RyRs abiertos [51]. Estos cambios conformacionales se han asociado con la activación de la bomba SERCA antes de la reducción de los niveles de Ca^{2+} luminal [52].

En células acinares pancreáticas se ha mostrado que la inhibición de la bomba SERCA con tapsigargina resulta en la eliminación del sitio de iniciación y propagación de la onda de Ca^{2+} lo cual, reduce la velocidad con la que se libera Ca^{2+} y elimina los gradientes de Ca^{2+} intracelular antes de cualquier disminución en la poza de Ca^{2+} [53]. Se ha reportado que la rápida inhibición de la bomba SERCA por DBHQ (2,5-di(*ter*-butyl)-1,4-hydroquinone), un inhibidor reversible de la bomba SERCA [54], afecta la velocidad de

propagación de la onda de Ca^{2+} [55]. En células HeLa se ha mostrado que la rápida inhibición de la bomba SERCA, para evitar cualquier reducción de la concentración de Ca^{2+} libre luminal, disminuye liberación de Ca^{2+} mediada por IP_3 y potenciada por histamina [30]. En CML, TG disminuye la amplitud y la velocidad de subida de la liberación de Ca^{2+} inducidad por cafeína y carbacol [3, 22]. Por otra parte, en CML la inhibición de la bomba SERCA con TG decrece la sincronización de las chispas de Ca^{2+} durante la aplicación de cafeína, incluso cuando el retículo se encuentra sobrecargado de Ca^{2+} [32]. En células cardíacas, la sobre expresión de los receptores adrenérgicos incrementa tanto la actividad de la bomba SERCA como la amplitud y la frecuencia de las chispas de Ca^{2+}, a pesar que la concentración de Ca^{2+} y la carga de Ca^{2+} en el retículo no estaba alterada [31]. Colectivamente, estos datos sugieren que las bombas SERCA juegan un papel importante no sólo en el rellenado de las pozas intracelulares de Ca^{2+}, sino que también facilitan la activación de los canales de liberación.

3. Marco teórico

"Essentially all models are wrong, but some are useful."

—George Box

Los procesos biológicos son procesos complejos que no pueden ser explicados a partir de principios básicos, y sus resultados no siempre pueden preveerse a partir de la intuición. Los experimentos guían a hipótesis biológicas, pero con frecuencia no es claro si estas hipótesis se pueden combinar en un esquema mayor porque es difícil visualizar el comportamiento global de un sistema complejo a partir del conocimiento de sus partes. El modelado matemático y las simulaciones computacionales pueden ayudar a entender la naturaleza y la dinámica de estos procesos [56].

Un modelo es una representación abstracta de estos procesos biológicos que pueden ayudar a explicar algunas de sus características. Un modelo representa aspectos específicos de la realidad, de forma tal, que si se hace apropiadamente, esto es suficiente ya que la intención del modelado es responder preguntas específicas [56].

Para conocer que tan rápido cambia un proceso, por ejemplo la concentración de Ca^{2+} en un compartimento intracelular generalmente involucra razones de cambio o derivadas. De aquí que la descripción matemática o el modelo matemático para este proceso puede ser una ecuación diferencial [57]. Esto es, una ecuación que contiene las derivadas de una o más funciones desconocidas (o variables dependientes), con respecto a una o más variables independientes, es llamada ecuación diferencial (ED) [57]. Una ecuación diferencial que contenga las derivadas de una función de una sola variable se denomina ecuación diferencial ordinaria (EDO) [58]. Las ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs) han sido una de las herramientas más utilizadas para modelar estos procesos biológicos. Por medio de las EDOs se puede simular y predecir su comportamiento dinámico. Si un modelo es usado para simular, se debe garantizar que este predice el comportamiento del sistema, al menos para aquellos aspectos que se supone están considerados en el modelo [56]. Las EDOs que describen estos procesos, en muchas de las ocasiones no pueden ser resueltas por fórmulas analíticas y deben ser aproximadas a

partir de métodos numéricos. En la sección 3.1 se presenta de manera general la técnicas utilizadas para realizar el planteamiento de un modelo matemático para estudiar la dinámica de Ca^{2+} intracelular. En la sección 3.2 se presentan el método de Runge-Kutta como un método para resolver un sistemas de EDOs.

3.1. Uso de modelos matemáticos para el estudio de la dinámica de Ca^{2+} intracelular

Una de las principales razones por las que la dinámica de Ca^{2+} intracelular comenzó a ser del interés de los modeladores matemáticos es que $[Ca^{2+}]_x$ muestra un comportamiento espacio-temporal altamente complejo [5, 59]. Debido a que hay una tremenda variedad de mecanismos que controlan las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares, no es realista esperar que un sólo modelo pueda capturar los comportamientos más importantes de todos los tipos celulares [59]. Sin embargo, muchos de los modelos matemáticos comparten características en común, y se puede tener un enfoque general de la dinámica de Ca^{2+} al estudiar un pequeño número de modelos matemáticos [59].

En el 2003, Berridge *et al* [4] introdujeron el concepto de la caja de herramientas de la señalización por Ca^{2+}. Esta caja contiene un gran número de componentes (receptores, proteínas G, canales iónicos, amortiguadores de Ca^{2+}, bombas, intercambiadores, etc). De aquí que las propiedades espacio-temporales de $[Ca^{2+}]_x$ se ven modificadas por el nivel de expresión de cada uno de los componentes de la caja de herramientas [4]. Los modelos matemáticos para la dinámica de Ca^{2+} siguen una aproximación modular similar. Cada miembro de la caja de herramientas a nivel celular tiene un módulo correspondiente en la caja de herramientas del modelado matemático (y si no existe este puede proponerse). Entonces, para construir un modelo matemático para la dinámica de Ca^{2+} de una célula, uno combina los componentes apropiados a partir de la caja de herramientas del modelado matemático [59].

Por otra parte, si se considera que la concentración de Ca^{2+} es homogénea en toda la célula, la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma se puede representar por $[Ca^{2+}]_i$

[59]. Dónde $[Ca^{2+}]_i$ es una función que depende del tiempo (t), $[Ca^{2+}(t)]_i$, y no tiene dependencia espacial. Así mismo, se puede representar la concentración homogénea de Ca^{2+} en el RS por $[Ca^{2+}]_{RS}$ [59]. Ahora veamos, de la misma manera que en Física se define la velocidad de un móvil como la derivada del espacio respecto al tiempo, el flujo neto de Ca^{2+} en un compartimento celular (x) se puede definir como la derivada de la concentración total de Ca^{2+} respecto al tiempo ó en notación matemática, se tiene:

$$\frac{d(v[Ca^{2+}]_{Tx})}{dt} = \widetilde{J}_{neto}, \tag{9}$$

dónde v es el volumen del compartimento, y $\widetilde{J}_{neto}$ es el flujo neto de Ca^{2+} dentro del compartimento, en unidades de número de moles por segundo. Usualmente se considera que el volumen de la célula y de sus compartimentos internos son constantes, en cuyo caso la ecuación (9) se escribe cómo la ecuación (10):

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{Tx}}{dt} = J_{neto} = \frac{\widetilde{J}_{neto}}{v}. \tag{10}$$

Aquí, J_{neto} es el flujo neto dentro del compartimento por el volumen de dicho compartimento, y tiene unidades de concentración por segundo [59]. Un ejemplo de un diagrama de algunos de los flujos de Ca^{2+} involucrados en el control de Ca^{2+} intracelular se muestra en la Figura 21. En vista de los flujos mostrados en la Figura 21, el flujo neto de Ca^{2+} en el citoplasma, queda representado por la ecuación (11):

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{Ti}}{dt} = J_{RyR} + J_{CaV} - J_{MP} - J_{SERCA} - J_{+} + J_{-}. \tag{11}$$

De la misma manera, el flujo neto de Ca^{2+} en el RS/E queda representado por la ecuación (12):

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{TRS/E}}{dt} = \alpha(J_{SERCA} - J_{RyR}) + J_{-RS/E} - J_{+RS/E}, \tag{12}$$

dónde el parámetro α denota el cociente del volumen del citoplasma con respecto al volumen del RS/E. Este parámetro es necesario porque $[Ca^{2+}]_{Ti}$ y $[Ca^{2+}]_{TRS/E}$ se refieren

a diferentes volúmenes. Debido a que el volumen del RS/E es menor que el del citoplasma, el flujo de Ca^{2+} del citoplasma al RS/E causará un cambio mayor en la concentración de Ca^{2+} dentro del RS/E de lo que hace en el citoplasma [59].

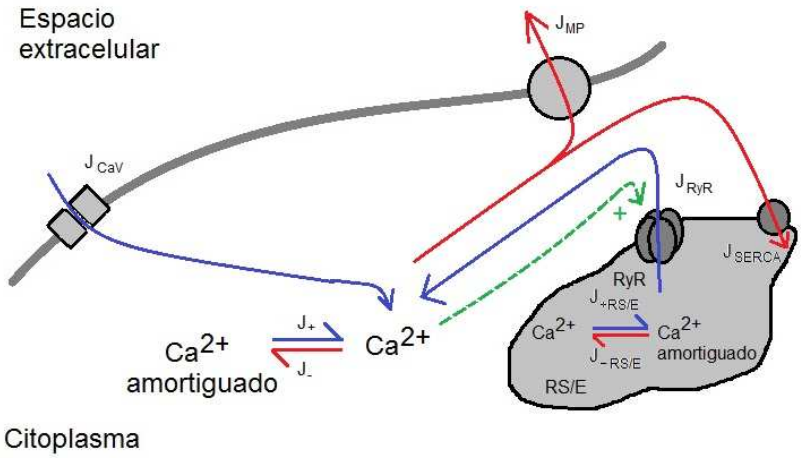

Figura 21: Ejemplo de un diagrama que muestra algunos de los flujos involucrados en el control de Ca^{2+} intracelular. Una depolarización en la membrana plasmática, induce la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y por consecuencia una entrada de Ca^{2+} al citoplasma (J_{CaV}). Los flujos de Ca^{2+} que aportan Ca^{2+} al citoplasma están representados por las flechas azules. Los flujos de Ca^{2+} que remueven Ca^{2+} del citoplasma están representados por las flechas rojas. El Ca^{2+} puede ser liberado del RS/E por los RyR (J_{RyR}) y removido del citoplasma vía la bomba SERCA (J_{SERCA}) o vía los mecanismos de remoción de Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática (J_{MP}). El Ca^{2+} también se puede encontrar asociado (J_{-}) o disociado (J_{+}) de las proteínas amortiguadoras tanto en citoplasma como en el RS/E, ($J_{-RS/E}$) y ($J_{+RS/E}$). Imagen modificada de la referencia [59].

Si en el modelo que se esté analizando se requirieran flujos adicionales como los flujos mitocondriales, intercambiadores, entre otros, estos se pueden agregar a las ecuaciones (11) o (12). Incluso, si se deseara analizar la dinámica de la concentración de Ca^{2+} en otro compartimento, se debe escribir su respectiva ecuación diferencial con sus flujos correspondientes.

Cabe mencionar que para las expresiones matemáticas de cada uno de los flujos J existen numerosas posibilidades [59]. Por ejemplo, basados en los resultados experimentales de Lytton *et al.* el transporte de Ca^{2+} por medio de la bomba SERCA puede ser representado por expresión tipo Hill [17]. Un modelo más detallado del transporte de Ca^{2+} por medio de esta ATPasa puede incluir los dos diferentes estados conformacionales E_1 y E_2 de su ciclo catalítico [60].

En general, las ecuaciones para $[Ca^{2+}]_{Ti}$ y $[Ca^{2+}]_{TRS/E}$ están acopladas a otras ecuaciones que describen por ejemplo, los estados del IP_3R, los estados de las bombas ATPasas, los amotiguadores de Ca^{2+}, la concentración de IP_3, entre otros [61, 62, 63, 64]. Estas técnicas de modelado para la dinámica de Ca^{2+} han servido para proponer un gran número de modelos matemáticos [5].

3.2. Los sistemas de EDOs

El planteamiento de modelos matemáticos para la dinámica de Ca^{2+} intracelular generalmente involucra sistemas de EDOs que no pueden ser resueltos analíticamente. Esta sección tiene como finalidad presentar al método de Runge-Kutta de cuarto orden. Este método es uno de los más utilizados para integrar numéricamente un sistema de EDOs.

Considere el siguiente problema de valor inicial,

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= f(t,x,y) \\ \frac{dy}{dt} &= g(t,x,y) \end{aligned} \qquad \text{con} \quad \begin{cases} x(t_0) &= x_0, \\ y(t_0) &= y_0. \end{cases} \tag{13}$$

Una solución para el sistema de EDOs (13) es un par de funciones diferenciables $x(t)$ y $y(t)$ con la propiedad que cuando t, $x(t)$ y $y(t)$ son sustituidas en $f(t,x,y)$ y $g(t,x,y)$, el resultado es igual a la derivada $x'(t)$ y $y'(t)$ [65], es decir,

$$\begin{aligned} x'(t) &= f(t, x(t), y(t)) \\ y'(t) &= g(t, x(t), y(t)) \end{aligned} \qquad \text{con} \quad \begin{cases} x(t_0) &= x_0, \\ y(t_0) &= y_0. \end{cases} \tag{14}$$

3.2.1. Soluciones numéricas para los sistemas de EDOs

Una solución numérica del sistema de EDOs (13) en el intervalo $a \leq t \leq b$ se encuentra al considerar las diferenciales [65]:

$$dx = f(t, x, y)dt \qquad \text{y} \qquad dy = g(t, x, y)dt. \tag{15}$$

A continuación se expondrá el método de Euler como antesala para presentar el método de Runge-Kutta de cuarto orden. El método de Euler está basado en el significado geométrico de la derivada de una función en determinados puntos [58]. Suponga que se tienen las curvas $x(t)$ y $y(t)$ que solucionan el sistema de EDOs (13) y se trazan las rectas tangentes a las curvas en las condiciones iniciales (t_0, x_0) y (t_0, y_0). Debido a que las rectas tangentes se aproximan a la curva en valores cercanos al punto de tangencia, se puede tomar el valor de la recta en el punto t_1 como una aproximación a los valores deseados $x_1(t_1)$ y $y_1(t_1)$, vea la Figura 22.

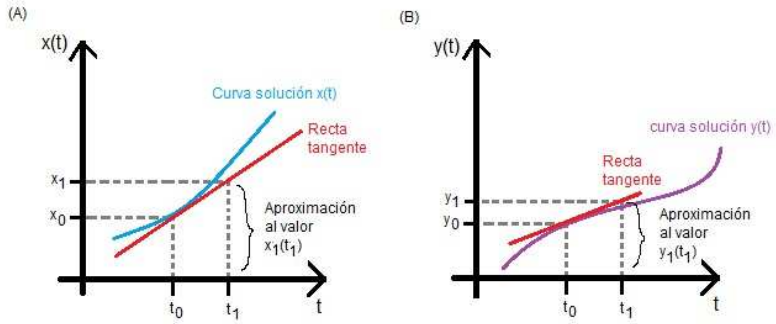

Figura 22: Método de Euler. Dados los puntos (t_0, x_0) y (t_0, y_0), se pueden calcular los puntos (t_1, x_1) y (t_1, y_1) utilizando las rectas tangentes cuando se aproximan a los puntos de tangencia (t_0, x_0) y (t_0, y_0) [58].

Utilizando la ecuación de la recta, se pueden calcular la ecuaciones de las rectas tangentes a las curvas solución $x(t)$ y $y(t)$ del sistema de ODEs (13) en los puntos (t_0, x_0) y (t_0, y_0),

$$\begin{aligned} x &= x_0 + m_x(t - t_0), \\ y &= y_0 + m_y(t - t_0), \end{aligned} \tag{16}$$

dónde m_x y m_y son las pendientes. En este caso, las pendientes de las rectas tangentes se calculan con la derivada:

$$\begin{aligned} m_x &= x'|_{(t_0,x_0,y_0)} = f(t_0, x_0, y_0), \\ m_y &= y'|_{(t_0,x_0,y_0)} = g(t_0, x_0, y_0). \end{aligned} \tag{17}$$

Por lo tanto, las ecuaciones de las rectas tangentes son:

$$\begin{aligned} x &= x_0 + f(t_0, x_0, y_0)(t - t_0), \\ y &= y_0 + g(t_0, x_0, y_0)(t - t_0). \end{aligned} \tag{18}$$

De manera general el método de Euler para resolver el sistema de ODEs (13) se formula de la siguiente manera. Las diferencias $dt = t_{k+1} - t_k$, $d_x = x_{k+1} - x_k$ y $d_y = y_{k+1} - y_k$ son sustituidos en las ecuaciones diferenciales (15) [65] para obtener:

$$\begin{aligned} x_{k+1} - x_k &= f(t_k, x_k, y_k)(t_{k+1} - t_k), \\ y_{k+1} - y_k &= g(t_k, x_k, y_k)(t_{k+1} - t_k). \end{aligned} \tag{19}$$

Si el intervalo $a \leq t \leq b$ es dividido en M subintervalos de ancho $h = (b - a)/M$, se puede generar un conjunto de puntos $t_{k+1} = t_k + h$. Este conjunto de puntos es usado en el sistema de ecuaciones (19), para obtener el conjunto de fórmulas recursivas (20) del método de Euler [65]:

$$\begin{aligned} t_{k+1} &= t_k + h, \\ x_{k+1} &= x_k + hf(t_k, x_k, y_k), \\ y_{k+1} &= y_k + hg(t_k, x_k, y_k) \qquad\qquad \text{para } \; k = 0, 1, ..., M - 1. \end{aligned} \tag{20}$$

Este método es fácil de implementar en algún lenguaje de programación, pero tiene la desventaja de que su precisión decae conforme aumenta t. Un método más preciso es el método de Runge-Kutta de cuarto orden, en el cual se usa un promedio de pendientes ponderadas de cuatro puntos cercanos a los valores actuales x_k y y_k para obtener los valores x_{k+1} y y_{k+1} [65]. Las fórmulas recursivas del método se presentan a continuación:

$$\begin{aligned} x_{k+1} &= x_k + \frac{h}{6}(f_1 + 2f_2 + 2f_3 + f_4), \\ y_{k+1} &= y_k + \frac{h}{6}(g_1 + 2g_2 + 2g_3 + g_4), \end{aligned} \tag{21}$$

dónde,

$$\begin{aligned} f_1 &= f(t_k, x_k, y_k), & g_1 &= g(t_k, x_k, y_k), \\ f_2 &= f(t_k + \frac{h}{2}, x_k + \frac{h}{2}f_1, y_k + \frac{h}{2}g_1), & g_2 &= g(t_k + \frac{h}{2}, x_k + \frac{h}{2}f_1, y_k + \frac{h}{2}g_1), \\ f_3 &= f(t_k + \frac{h}{2}, x_k + \frac{h}{2}f_2, y_k + \frac{h}{2}g_2), & g_3 &= g(t_k + \frac{h}{2}, x_k + \frac{h}{2}f_2, y_k + \frac{h}{2}g_2), \\ f_4 &= f(t_k + h, x_k + hf_3, y_k + hg_3), & g_4 &= g(t_k + h, x_k + hf_3, y_k + hg_3). \end{aligned}$$

Con el método de Runge-Kutta de cuarto orden, los valores x_{k+1} y y_{k+1} son determinados por los valores actuales x_k y y_k más el producto del intervalo h por una pendiente estimada [65]. La pendiente de un promedio ponderado de pendientes:

- f_1 y g_1 son las pendientes al principio del intervalo.
- f_2 y g_2 son las pendientes en el punto medio del intervalo, usando los valores de f_1 y g_1 para determinar el valor de x y de y en los puntos $x_k + \frac{h}{2}$ y $y_k + \frac{h}{2}$.
- f_3 y g_3 son otra vez las pendientes en el punto medio del intervalo, usando los valores de f_2 y g_2 para determinar el valor de x y de y.
- f_4 y g_4 son las pendientes al final del intervalo, con el valor de x y y determinado por f_3 y g_3.

Promediando las cuatro pendientes, se le asigna mayor peso a las pendientes en el punto medio:

$$m_x = \frac{f_1 + 2f_2 + 2f_3 + f_4}{6} \tag{22}$$

$$m_y = \frac{g_1 + 2g_2 + 2g_3 + g_4}{6} \tag{23}$$

4. Justificación

"It is no good to try to stop knowledge from going forward. Ignorance is never better than knowledge."
—Enrico Fermi

El contar con indicadores que permitan seguir la dinámica de Ca^{2+} dentro de los compartimentos celulares ha derivado en la investigación de la señalización por Ca^{2+} en diversos procesos fisiológicos como: el acoplamiento de excitación-contracción del músculo esquelético, la regulación del tono vascular, la participación del Ca^{2+} en la generación de la frecuencia cardiaca, la excitabilidad neuronal, la exocitosis de hormonas en células endócrinas, etc. Desde el punto de vista de liberación masiva de Ca^{2+} por medio de los RyR, el RS sigue una dinámica contraintuituiva como lo discutimos en el capítulo 2. El RS tiene la capacidad de donar Ca^{2+}, es decir, de producir un incremento significativo en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma sin una aparente disminución de Ca^{2+} libre en el retículo. Además, esta capacidad de donar Ca^{2+} requiere de un tiempo de restitución, en otras palabras, la capacidad del retículo de donar Ca^{2+} significativamente no está disponible todo el tiempo [1]. Sin embargo, a pesar de la amplia información y caracterización de la dinámica de Ca^{2+} intracelular, hay preguntas que permanecen sin respuesta, como resultado de que la naturaleza de la liberación de Ca^{2+} no ha sido entendida del todo. En el centro de estas preguntas está: ¿cuál es la fuente que dona Ca^{2+} dentro del RS/E?, ¿por qué esta fuente no está disponible todo el tiempo?, ¿por qué hay un aumento del nivel de Ca^{2+} en el lumen del RS/E, así como de la actividad de la bomba SERCA cuando se abren los canales liberadores de Ca^{2+}?, ¿por qué disminuye la amplitud y la velocidad del transitorio de Ca^{2+} una vez que se ha inhibido la bomba SERCA? Como no ha sido posible observar simultáneamente la dinámica del Ca^{2+} libre luminal y la cantidad de Ca^{2+} unido a proteínas luminales $[BCa]_{RS}$ experimentalmente, se propone abordar estas preguntas a través de modelado matemático. Los avances en Bioinformática y Biología de Sistemas proporcionan herramientas para poder responder a estas preguntas [66].

5. Hipótesis

"There's two possible outcomes: if the result confirms the hypothesis, then you've made a measurement. If the result is contrary to the hypothesis, then you've made a discovery."

—Enrico Fermi

El gradiente de Ca^{2+} entre el lumen del RS/E y el citoplasma es muy grande [67] de forma tal que al abrir los canales liberadores de Ca^{2+} se produciría una reducción inmediata en la concentración del Ca^{2+} libre luminal ($[Ca^{2+}]_{RS}$) [1]. Sin embargo, registros simultáneos de la concentración de Ca^{2+} libre luminal e intracelular muestran que el proceso de liberación de Ca^{2+} es mucho más complejo de lo que previamente se había visualizado [1]. Estos experimentos muestran que el Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) aumenta sin una reducción significativa en $[Ca^{2+}]_{RS}$ [1]. Debido a que el Ca^{2+} no es un metabolito, no se sintetiza, ni se degrada, sólo cambia de compartimento celular, estos experimentos no son fáciles de interpretar basados en la ley de conservación de la materia [1, 2]. De aquí que la hipotésis de este trabajo es que hay una dinámica entre el Ca^{2+} luminal y las proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} del RS/E diferente a la cinética saturable o estándar, que pudiese explicar el comportamiento contraintuitivo del retículo endoplásmico/sarcoplásmico como fuente de Ca^{2+}.

6. Objetivos

"The aim of science is to seek the simplest explanation of complex facts. We are apt to fall into the error of thinking that the facts are simple because simplicity is the goal of our quest. The guiding motto in the life of every natural philosopher should be, 'Seek simplicity and distrust it."

—Alfred North Whitehead
The Concept of Nature:
The Tarner Lectures Delivered in
Trinity College, 11/1919.

6.1. Objetivo general

Explicar el comportamiento contraintuitivo del retículo sarcoplásmico como fuente de calcio.

6.2. Objetivos particulares

1. Desarrollar un modelo matemático para analizar los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ y $[Ca^{2+}]_{RS}$ que permita explicar el comportamiento contraintuitivo del retículo como fuente de Ca^{2+}.

2. Validar el modelo matemático con base en resultados experimentales.

3. Determinar las condiciones en las que el modelo matemático permite reproducir los experimentos de la inhibición de la bomba SERCA.

7. Materiales y métodos

"Our programs last longer if we manage to build simple abstractions for ourselves."

—Ron Jeffries

En este capítulo se exponen los materiales y los métodos seguidos para el desarrollo de este proyecto. En la sección 7.1 se describe brevemente cómo se obtuvieron los datos experimentales con los que se validó este trabajo. En la sección 7.2 se presenta el desarrollo del modelado matemático y en la sección 7.3 se describen y se presentan los valores de los parámetros del modelo.

7.1. Obtención de los datos experimentales

Los datos experimentales con los cuales se validaron los resultados de los modelos matemáticos desarrollados en esta tesis fueron obtenidos por la Doctora Norma Leticia Gómez Viquez (Figuras 26, 27, 28 y 29) [68] y el Dr. Adán Dagnino Acosta (Figuras 35 y 36) [22]. Los datos experimentales me fueron proporcionados gracias al Dr. Agustin Guerrero Hernández. A continuación se expone brevemente el tratamiento de los animales para estos experimentos, así cómo el asilamiento de las CML y el registro de Ca^{2+} intracelular.

7.1.1. Normas éticas y de seguridad para el cuidado y uso de animales de laboratorio

Los procedimientos experimentales y cuidados de todos los animales utilizados en esta investigación fueron desarrollados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidados de animales (NOM-062-ZOO-1999). Adicionalmente, el protocolo usado fue aprobado por el comité de ética sobre animales de experimentación (CICUAL-Cinvestav) con el número de referencia 0306-06, y renovado con el número de referencia 0131-15. Los animales fueron alimentados y cuidados en el Cinvestav con aire limpio y control de luz y temperatura. El agua y la comida fueron suministrados *ad libitum*.

7.1.2. Aislamiento de las CML y el registro del Ca^{2+} intracelular

Las CML fueron aisladas a partir de vejiga urinaria de cobayo y cargadas con Fura-2 para registrar el Ca^{2+} intracelular como se detalla en [3]. Los registros simultáneos de la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma y en el lumen del RS se llevaron a cabo en estas células usando Fura-2 y Mag-Fluo-4, respectivamente, como previamente se ha descrito en [1]. La liberación de Ca^{2+} fue inducida al aplicar dosis de cafeína de 20 y 2 mM con pipetas de inyección [3]. La inhibición de la bomba SERCA se hizo con pulsos cortos de tapsigargina como previamente se describió en [3].

7.2. Desarrollo del modelo matemático

Para el desarrollo del modelo matemático se consideró a las CML como dos compartimentos, el citoplasma y el RS (vea la Figura 23). Dónde $[Ca^{2+}]_{Ti}$ y $[Ca^{2+}]_{TRS}$ representan la concentración total de Ca^{2+} en cada compartimento, respectivamente. El flujo de Ca^{2+} del citoplasma hacia el espacio extracelular por medio de todos los mecanismos de remoción de Ca^{2+} (con excepción de la bomba SERCA) se representa por J_1. El flujo de Ca^{2+} de RS hacia el citoplasma por medio de los RyR presentes en la membrana del RS se denota como J_2. El flujo de Ca^{2+} del citoplasma hacia el RS por medio de la bomba SERCA, la cual está anclada en la membrana del RS, estará representado por J_3.

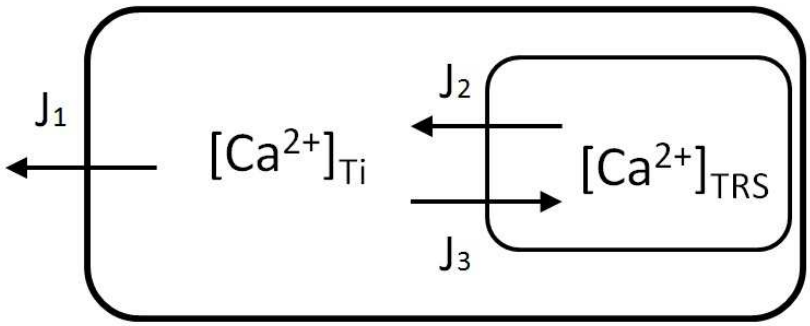

Figura 23: Esquema de compartimentos de las CML. El esquema muestra una caricatura de las CML (no escalada) y los compartimentos de la célula considerados en este trabajo, así como los flujos entre los compartimentos.

Partiendo del hecho de que en nuestro modelo los flujos de Ca^{2+} que aumentan la concentración del ion en el compartimento llevan signo positivo, y los que lo disminuyan llevan signo negativo, el flujo neto que regula tanto $[Ca^{2+}]_{Ti}$ como $[Ca^{2+}]_{TRS}$ está determinado por las expresiones de las ecuaciones (24) y (25):

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{Ti}}{dt} = -J_1 + J_2 - J_3, \tag{24}$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{TRS}}{dt} = \frac{J_3 - J_2}{\gamma}, \tag{25}$$

todos los flujos tienen unidades de concentración/tiempo las cuales son referidas al volumen del citoplasma. Cómo se expresó en la sección 3.1, $[Ca^{2+}]_{Ti}$ y $[Ca^{2+}]_{TRS}$ se refieren a diferentes volúmenes. Debido a que el volumen del RS es menor que el del citoplasma, el flujo de Ca^{2+} del citoplasma al RS causará un mayor cambio en la concentración de Ca^{2+} dentro del RS que lo que causa en el citoplasma [59]. De acuerdo con esto, en nuestro caso γ denota el cociente de volumen entre el RS y el citoplasma.

Como se indica arriba, J_1 representa a todos los mecanismos de remoción de Ca^{2+} y basados en la observación de que este proceso tiene una cinética de primer orden, como se demuestra en [39], se propone que:

$$J_1 = a([Ca^{2+}]_i - \overline{[Ca^{2+}]}_i), \tag{26}$$

dónde $[Ca^{2+}]_i$ es la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma, $\overline{[Ca^{2+}]}_i$ representa la concentración Ca^{2+} citoplásmica basal, y a es la constante cinética de primer orden para este flujo.

Por otro lado, partiendo de la evidencia de que no existe potencial de membrana en la membrana del RS [69, 70], el flujo J_2 a través de los RyRs puede ser descrito por la ecuación (27):

$$J_2 = b\gamma^{n_v} P_o\Big([Ca^{2+}]_i, [\text{Caf}]\Big)\Big[[Ca^{2+}]_{RS} - [Ca^{2+}]_i\Big], \tag{27}$$

dónde b representa la densidad (número) de RyRs en la membrana del RS y su conductancia unitaria. γ como ya se expresó es la relación entre el volumen del RS con respecto al citoplasma y γ^{n_v} representa la superficie de la membrana del RS. Se ha reportado que el RS/E tiene una estructura compleja como fractal, de aquí que su superficie debe ser escalada con respecto al volumen de acuerdo a una ley de potencias, dónde n_v es un parámetro relacionado con la dimensión fractal del retículo [71]. Expresado en otras palabras, a medida que el RS/E aumenta de tamaño, el incremento del área de su membrana sólo equivale a la n_v potencia de su volumen, lo que implica que el aumento del área de su membrana no llega a ser directamente proporcional al incremento de su volumen. De acuerdo con esto, si se propone que la densidad de RyR sobre la superficie del RS es constante, el número de RyR es proporcional a γ^{n_v}. $P_o\Big([Ca^{2+}]_i, [\text{Caf}]\Big)$ es la probablidad de apertura de un sólo RyR como función de $[Ca^{2+}]_i$ y de la concentración de cafeína $[Caf]$ usada para inducir la liberación de Ca^{2+} del RS y $[Ca^{2+}]_{RS}$ es la concentración de Ca^{2+} libre en el lumen del RS.

Referente al flujo J_3, considerando que la bomba SERCA depende de manera sigmoidea del Ca^{2+}, y siguiendo a Lytton J *et al* [17], la actividad de la bomba SERCA se modela por la siguiente expresión:

$$J_3 = c\frac{[Ca^{2+}]_i^{n_s}}{K_s^{n_s} + [Ca^{2+}]_i^{n_s}}, \tag{28}$$

dónde c representa el flujo máximo de Ca^{2+} a través de la bomba SERCA, K_s corresponde a la concentración de Ca^{2+} con la cual la velocidad de transporte de la bomba SERCA alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima de reacción, y n_s es un coeficiente de Hill.

Como se expresó en la sección 1.6 en el citoplasma los iones de Ca^{2+} pueden estar libres o unidos a proteínas amortiguadoras. Por definición, la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} (β) es el cociente entre el incremento de Ca^{2+} unido a proteínas y el incremento en la concentración de Ca^{2+} libre [Ca^{2+}] [35]. En el caso de las CML se ha reportado que β es aproximadamente constante [13, 39] por tanto la relación entre la $[Ca^{2+}]_i$ y $[Ca^{2+}]_{Ti}$ está dado por,

$$\Delta[Ca^{2+}]_i = \frac{\Delta[Ca^{2+}]_{Ti}}{\beta}. \tag{29}$$

Con respecto a la probabilidad de apertura (Po) del RyR se sabe que ésta incrementa cuando los iones de Ca^{2+} se unen del lado citoplásmico del receptor; un proceso que es conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) [26, 27, 70]. Cabe mencionar que este proceso es de menor eficiencia en CML comparado con células cardíacas [72]. En este trabajo, se ha usado cafeína [Caf] para incrementar la afinidad por Ca^{2+} de los RyR en CML, de tal forma que ellos se abren cuando el Ca^{2+} se encuentra a niveles basales [28]. Para tomar en cuenta este fenómeno, se ha propuesto que cada una de las cuatro subunidades del RyR tiene sitios de unión a Ca^{2+} y cafeína, y estas moléculas interactúan cooperativamente cuando están unidas. A partir de esta consideración y bajo la suposición de equilibrio químico, la probabilidad de que haya Ca^{2+} unido a su correspondiente sitio de unión, sin importar el estado de la cafeína es:

$$\frac{\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C} + k_F\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}\frac{[Caf]}{K_F}}{1 + \frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C} + \frac{[Caf]}{K_F} + k_F\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}\frac{[Caf]}{K_F}} = \frac{\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}(1 + k_F\frac{[Caf]}{K_F})}{1 + \frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}(1 + k_F\frac{[Caf]}{K_F}) + \frac{[Caf]}{K_F}},$$

dónde K_C es la constante de disociación del complejo RyR-Ca^{2+}, K_F es la constante de disociación del complejo RyR-cafeína y $k_F > 1$ da cuenta de la cooperatividad entre Ca^{2+} y cafeína. Bajo la suposición de $[Caf]/K_F \ll 1$, la expresión anterior puede ser reescrita como:

$$\frac{[Ca^{2+}]_i(1 + k_f[Caf])}{K_C + [Ca^{2+}]_i(1 + k_f[Caf])}, \tag{30}$$

con $k_f = \frac{k_F}{K_F}$. Para la deducción de la ecuación (30) vea el apéndice A. Finalmente considerando que el Ca^{2+} necesita estar unido a todas las subunidades con el fin de que el canal se abra, y que hay cierta cooperatividad entre las subunidades [73], la probabilidad de apertura puede ser reescrita como:

$$P_o([Ca^{2+}]_i, [Caf]) = \frac{[[Ca^{2+}]_i(1 + k_f[Caf])]^{n_F}}{K_C^{n_F} + [[Ca^{2+}]_i(1 + k_f[Caf])]^{n_F}}, \tag{31}$$

con n_F un coeficiente de Hill. A su vez, el ión Ca^{2+} en el RS puede estar libre o unido a las proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} localizadas en el lumen del organelo. Sea [P] la concentración de los sitios de unión a Ca^{2+} libres dentro del RS, y $[P_C]$ la concentración de los sitios que se encuentran ocupados con Ca^{2+}. Bajo la suposición de equilibrio químico, se tiene:

$$K_R = \frac{[P][Ca^{2+}]_{RS}}{[P_C]}, \tag{32}$$

dónde K_R es la constante de disociación de esta proteína. Por otro lado, la concentración total de los sitios de unión a Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} luminal estará denotado por $[P_E]$. Suponiendo que el número total de sitios de unión a Ca^{2+} permanece constante, la cantidad de sitios libres estará denotada por:

$$[P] = [P_E] - [P_C], \tag{33}$$

a partir de las ecuaciones (32) y (33), y despejando $[P_C]$ se obtiene,

$$[P_C] = [P_E]\frac{[Ca^{2+}]_{RS}}{K_R + [Ca^{2+}]_{RS}}. \tag{34}$$

Por último, tomando en consideración que la concentración total de Ca^{2+} en el RS $[Ca^{2+}]_{TRS}$ está determinada por:

$$[Ca^{2+}]_{TRS} = [Ca^{2+}]_{RS} + [P_C], \tag{35}$$

y despejando $[Ca^{2+}]_{RS}$ a partir de las ecuaciones (34) y (35), se obtiene ecuación (36) para la concentración del Ca^{2+} libre luminal ($[Ca^{2+}]_{RS}$) en términos de la concentración del Ca^{2+} total ($[Ca^{2+}]_{TRS}$) en el RS:

$$[Ca^{2+}]_{RS} = \frac{1}{2}\xi + \frac{1}{2}\sqrt{\xi^2 + 4[Ca^{2+}]_{TRS}K_R}, \tag{36}$$

dónde $\xi = [Ca^{2+}]_{TRS} - [P_E] - K_R$. Esta es la aproximación clásica para la cinética de unión a Ca^{2+} por parte de las proteínas amortiguadoras localizadas en el lumen del RS. Esta cinética es saturable porque, como se puede ver en la ecuación (33), la cantidad

de sitios libres decrece conforme la cantidad de Ca^{2+} luminal incrementa y los sitios disponibles se van ocupando. En este caso, la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} puede ser estimada por la ecuación (5), vea el panel A de la Figura 24. Esta gráfica muestra que β es una función decreciente de $[Ca^{2+}]$ que se aproxima a cero cuando $[Ca^{2+}] \gg K_D$. Sin embargo, como veremos más adelante, este tipo de cinética, que de ahora en adelante será llamada **—Modelo de cinética estándar (CE)—** no puede explicar la fase 1 de la liberación de Ca^{2+} observada en CML [1, 22].

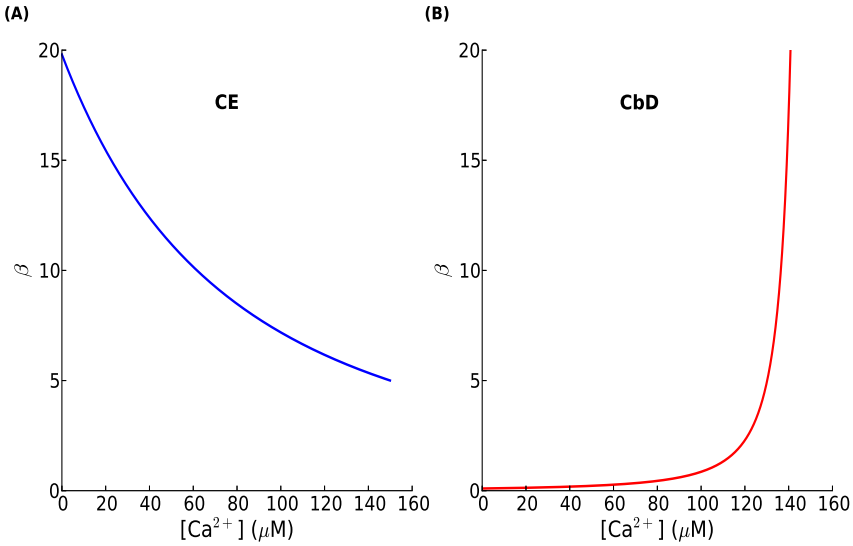

Figura 24: La capacidad amortiguadora como función de la concentración de Ca^{2+}. En el panel (A) se muestra la respuesta del modelo CE de la unión de Ca^{2+} a los sitios de las proteínas amortiguadoras (β), la cual es una función decreciente conforme aumenta la $[Ca^{2+}]$, usando un valor de K_D de 151.1 μM y la ecuación (5). En el panel (B) se muestra a β con respecto a $[Ca^{2+}]$ usando el modelo CbD, la ecuación (39) y K_D = 151.1 μM. Como se puede observar β ahora es una función creciente conforme aumenta $[Ca^{2+}]$.

Como se mencionó en la sección 2.1 , Park *et al* [44] estudiaron la unión de Ca^{2+} a CSQ, una proteína amortiguadora de Ca^{2+} en el RS (vea la Figura 16). Nosotros realizamos un ajuste de los datos de unión de Ca^{2+} a CSQ de Park *et al* [44] y obtuvimos las curvas de unión de Ca^{2+} a CSQ. De este análisis observamos que el número máximo de sitios de unión a Ca^{2+} (B_{max}) aumentaba conforme $[Ca^{2+}]$ se elevaba, vea la Figura 25.

Es decir, las curvas de unión a Ca^{2+} presentan diferentes valores de B_{max}. Contrario a lo esperado, B_{max} no es constante y está incrementando según la ventana de Ca^{2+} y su grado de polimerización (vea la Figura 25).

Este tipo de comportamiento fue usado para sugerir un nuevo modelo cinético denominado —**Modelo de cinética bajo demanda (CbD)—**. Otro enfoque experimental, usando microanálisis de rayos X ha generado datos de la presencia de secciones del RE que se comportan como si su capacidad de amortiguamiento fuera extremadamente grande, a pesar de estar en continuidad con regiones dónde el Ca^{2+} libre luminal no cambia [14]. Una situación que puede reflejar la habilidad de las proteínas amortiguadoras de tener un tipo de cinética de unión a Ca^{2+} bajo demanda. Esta observación es compatible con la suposición de que nuevos sitios de unión a Ca^{2+} comienzan a ser aparentes conforme los disponibles son ocupados. Dado que no hay marco de referencia matemático para probar este nuevo paradigma, decidimos modelar este tipo de comportamiento, sustituyendo la ecuación (33) por la siguiente expresión:

$$[P] = [P_E] + [P_C]. \tag{37}$$

Tomando en cuenta esta nueva expresión y repitiendo el procedimiento que guía a la ecuación (33), se obtiene la siguiente expresión que relaciona $[Ca^{2+}]_{RS}$ en función de $[Ca^{2+}]_{TRS}$ en el RS:

$$[Ca^{2+}]_{RS} = \frac{1}{2}\xi - \frac{1}{2}\sqrt{\xi^2 - 4[Ca^{2+}]_{TRS}K_R}, \tag{38}$$

dónde $\xi = [Ca^{2+}]_{TRS} + [P_E] + K_R$.

Cabe resaltar que este nuevo tipo de cinética muestra un crecimiento de la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} (vea el panel (B) de la Figura 24) siempre y cuando $[Ca^{2+}]$ sea menor que la constante de disociación K_D,

$$\beta = [B]_T \frac{K_D}{(K_D - [Ca^{2+}]_{RS})^2}, \tag{39}$$

cuando $[Ca^{2+}]_{RS} > K_D$, entonces la capacidad amortiguadora (β) también es una función decreciente como en el modelo CE.

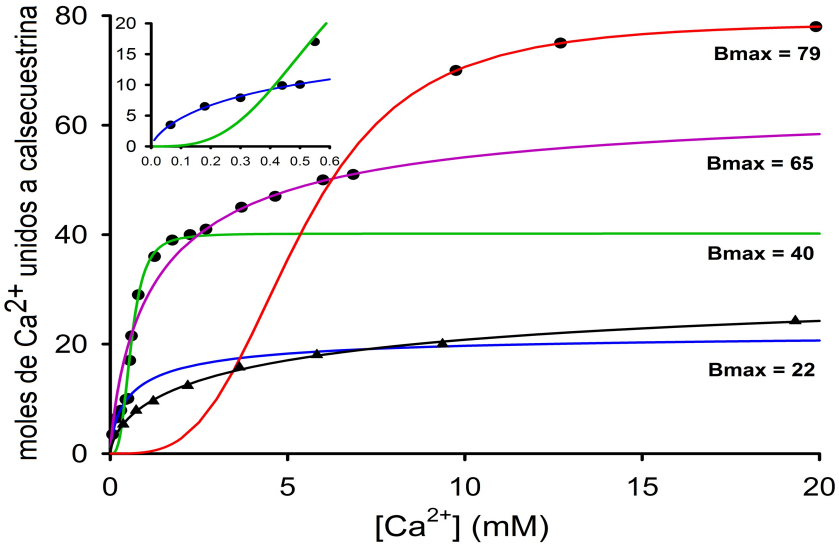

Figura 25: Ajuste de los diferentes niveles de saturación de Ca^{2+} por parte de CSQ. Los moles de Ca^{2+} unidos a CSQ como función de $[Ca^{2+}]$. Los datos fueron obtenidos y graficados de la Figura 5 de la referencia [44]. Los datos fueron ajustados a una ecuación de Hill. El ajuste sugiere que el número máximo de los sitios a unión a Ca^{2+} (B_{max}) es una función creciente de $[Ca^{2+}]$. El recuadro muestra el ajuste para $[Ca^{2+}]$ en el rango de 0-0.6mM. Park *et al.* mostraron que bloqueando la polimerización de la CSQ se inhibe el incremento de B_{max}, de forma tal que ahora B_{max} alcanza un valor alrededor de 22 para todo el rango de $[Ca^{2+}]$ probado (línea negra) [44].

7.3. Estimación de parámetros

La descripción de los parámetros del modelo así como sus valores se presentan a continuación. Cabe mencionar que los parámetros fueron obtenidos de la literatura, o estimados a partir de resultados experimentales propios.

- El **parámetro *a*** está asociado a la velocidad de respuesta de los mecanismos responsables de la remoción de Ca^{2+} intracelular del citoplasma. Por lo tanto, el tiem-

po de caída de los pulsos de Ca^{2+} provocados por cafeína es más sensible a este parámetro que a ningún otro. Empíricamente encontramos que el valor

$$a = 30\,\mathrm{s}^{-1},$$

es el que mejor permite reproducir la fase de caída de los transitorio de Ca^{2+} intracelular.

- El **parámetro *b*** representa la conductancia máxima de los RyR. Por otra parte encontramos que este parámetro es el que más influye en el tiempo al pico de los transitorios de Ca^{2+}. El valor de b que mejor permite reproducir los valores experimentales del tiempo al pico cuando se estimula con 20 mM de cafeína es:

$$b = 1.3\,\mathrm{s}^{-1}.$$

- El **parámetro *c*** corresponde al flujo máximo de Ca^{2+} a través de las bombas SERCA. Por tanto este parámetro es el que determina qué tan rápido se rellena el retículo. De acuerdo con nuestros resultados numéricos, el valor

$$c = 50\ \mathrm{nMs}^{-1},$$

es el que permite un mejor ajuste con los resultados experimentales.

- $\overline{[Ca^{2+}]_i}$ es la concentración basal de Ca^{2+} libre en el citoplasma. De acuerdo con Case R M *et al* [8], la concentración fluctúa en un rango de 75-100 nM ,

$$\overline{[Ca^{2+}]_i} \approx\ 75\ \mathrm{nM}.$$

- El **parámetro** γ es el cociente entre el volúmen del retículo y el volumen del citoplasma. Tomando en consideración que el volumen del retículo en CML representa del 1 al 10 % del volumen de las células [32], este parámetro toma valores en el siguiente rango:

$$\gamma \in [0.01, 0.1]$$

- El **parámetro n_v** es el coeficiente que le permite al modelo reproducir los experimentos de variabilidad celular (en particular la velocidad máxima de liberación con respecto al tiempo al pico, vea el panel (B) de la Figura 27). El valor

$$n_v = 1{,}7,$$

  es el que permite un mejor ajuste con los resultados experimentales.

- Los **parámetros K_s y n_s** pertencen a la ecuación (28) que describe el comportamiento de la bomba SERCA con respecto al Ca^{2+}. De acuerdo con [17] sus valores son:

$$K_s \approx \ 300 \text{ nM} \qquad \text{y} \qquad n_s \approx 2.$$

- El **parámetro β** representa a la capacidad amortiguadora del citoplasma y tiene un valor constante en el rango fisiológico de $[Ca^{2+}]_i$ en CML [39]. Aunque al valor de β muestra gran variabilidad entre los diferetentes tipos celulares, nosotros seleccionamos el valor de:

$$\beta \approx 100.$$

- Los **parámetros k_f** y n_f modulan la P_o del RyR (ecuación (31)). Estos parámetros fueron estimados numéricamente, de forma tal que el modelo reprodujera los experimentos de variablidad celular (especialmente la velocidad máxima de liberación con respecto a $\Delta[Ca^{2+}]_i$, vea el panel (A) de la Figura 27). De acuerdo con nuestros resultados numéricos los valores:

$$k_f \approx\ 4\ \text{mMs}^{-1} \qquad \text{y} \qquad n_f \approx 1{,}8,$$

son los que permiten un mejor ajuste con los resultados experimentales.

- El **parámetro K_C** también está involucrado en la función de la P_o del RyR (ecuación (31)) y se calcula de forma tal que se satisfagan los valores de estado estacionario tanto para $[Ca^{2+}]_i$ como para $[Ca^{2+}]_{RS}$ [8]:

$$\overline{[Ca^{2+}]}_i \approx 75\ \text{nM} \qquad \text{y} \qquad \overline{[Ca^{2+}]}_{RS} \approx 150\ \mu\text{M}.$$

  En estado estacionario J_2=J_3, entonces este parámetro es calculado al despejar K_C en esta ecuación después de sustituir $[Ca^{2+}]_i = \overline{[Ca^{2+}]}_i$, $[Ca^{2+}]_{RS} = \overline{[Ca^{2+}]_{RS}}$ y la concentración de cafeína igualada a cero.

- El **parámetro K_R** representa la afinidad de las proteínas luminales por Ca^{2+}, el valor que seleccionamos que nos permitió reproducir tanto la fase 1 (vea la Figura 31) como la recuperación de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (vea la Figura 35):

$$K_R = 151.5\ \mu\text{M}.$$

- El **parámetro P_E** representa el número de sitios de unión en el lumen del retículo en ausencia de Ca^{2+}. Este parámetro fue calculado proponiendo que la capacidad amortiguadora del RS es de 10 [22]. En otras palabras,

$$\frac{(\overline{[Ca^{2+}]}_{TRS} - [Ca^{2+}]_{RS})}{\overline{[Ca^{2+}]}_{RS}} \approx 10.$$

  Para el modelo CbD tenemos:

$$P_E = 10(K_R - \overline{[Ca^{2+}]}_{RS}) \therefore 15\ \mu\text{M},$$

mientras que para el modelo CE, P_E es calculado a partir de la siguiente expresión:

$$P_E = 10(K_R + \overline{[Ca^{2+}]}_{RS}) \therefore 3 \text{ mM}.$$

8. Resultados y Discusión

"The purpose of models is not to fit the data but to sharpen the questions."

—Samuel Karlin

El gradiente de Ca^{2+} entre el lumen del RS/E y el citoplasma es muy grande [67] de forma tal que al abrir los canales liberadores de Ca^{2+} se produciría una reducción inmediata en la concentración del Ca^{2+} libre luminal ($[Ca^{2+}]_{RS}$) [1]. Sin embargo, registros simultáneos de la concentración de Ca^{2+} libre luminal e intracelular muestran que el proceso de liberación de Ca^{2+} es mucho más complejo de lo que previamente se había visualizado [1]. Estos experimentos muestran que el Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) aumenta sin una reducción significativa en $[Ca^{2+}]_{RS}$ [1]. Estos experimentos no son fáciles de interpretar basados en la ley de conservación de la materia [1, 2]. Este capítulo tiene como fin presentar y discutir los resultados del modelo matemático propuesto para explicar el comportamiento contraintuitivo del RS/E como fuente de Ca^{2+}.

En este trabajo desarrollamos un modelo matemático determinista que nos permitió estudiar la dinámica de Ca^{2+} tanto en el citoplasma como en el RS durante el proceso de liberación de Ca^{2+} por medio de los RyRs. Las principales características del modelo se indican a continuación. Los mecanismos de remoción de Ca^{2+} en el citoplasma quedaron representados por el flujo J_1. El transporte de Ca^{2+} del RS hacia el citoplasma por medio de los RyRs quedó representado por el flujo J_2. El transporte de Ca^{2+} del citoplasma hacia el lumen del RS por medio de la bomba SERCA quedó representado por el flujo J_3. De acuerdo con la evidencia experimental, la capacidad amortiguadora (β) en el citoplasma se consideró constante [23]. Para modelar la dinámica entre el Ca^{2+} luminal y los sitios de unión a Ca^{2+} en el lumen del RS se consideró primeramente que el número total de sitios de unión a Ca^{2+} permaneciera constante. Bajo esta condición clásica o estándar nuestro modelo matemático recibió el nombre de *modelo de cinética estándar (CE)*. Los resultados y discusión del modelo CE se presentan en la sección 8.1. Como se verá en la sección 8.1 el modelo CE no nos permitió explicar el comportamiento experimental de liberación de Ca^{2+} del RS como fuente de Ca^{2+}. Cabe mencionar que los resultados

in silico presentados en este capítulo fueron validados con resultados experimentales obtenidos por nuestro grupo de investigación como se describe en la sección 7.1. De la misma manera, la liberación de Ca^{2+} *in silico* en todos los casos, se realizó simulando la aplicación de una dosis de cafeína de 20 mM por 5 s.

Del análisis de las curvas de unión a Ca^{2+} a CSQ de los experimentos realizados por Park *et al* [44] observamos lo siguiente. El número máximo de sitios de unión a Ca^{2+} (B_{max}) aumenta conforme se eleva el Ca^{2+} en el medio (vea la Figura 25). Esto se puede interpretar como si estuviesen apareciendo nuevos sitios de unión a Ca^{2+} conforme se van ocupando. Esto se tomó en cuenta en nuestro modelo matemático de una manera heurística. Bajo esta condición nuestro modelo recibió el nombre de *modelo de cinética bajo demanda (CbD)*. Los resultados y discusión del modelo CbD se presentan en la sección 8.2.

El modelo CbD nos permitió dar cuenta del proceso de liberación de Ca^{2+} por medio de los RyRs inducido al aplicar una dosis de cafeína observado experimentalmente en las CML. Una vez validado nuestro modelo CbD comenzamos a hacerle preguntas: ¿qué pasa con la dinámica de Ca^{2+} intracelular y luminal una vez que está inhibida la bomba SERCA?, ¿por qué disminuyen tanto la velocidad de liberación como la amplitud del transitorio de Ca^{2+} bajo esta condición? Los resultados y la discusión de nuestra investigación cuando la bomba SERCA está inhibida se muestran en la sección 8.3.

Así mismo, con nuestros modelos CbD y CE abordamos la pregunta de por qué se presenta un periodo refractario en el proceso de liberación de Ca^{2+} inducido por cafeína (vea la Figura 14) [1]. Para ello realizamos los experimentos *in silico* al aplicar tres dosis de cafeína a diferentes tiempos, tanto al modelo CbD como al modelo CE; emulando los experimentos que se describieron en la sección 2.1 (vea la Figura 14) [1]. Los resultados y discusión de estos experimentos *in silico* se presentan en la sección 8.4.

En la sección 8.5 se discuten algunos escenarios alternativos que también nos permitirían explicar los resultados experimentales. Además de lo que otros grupos han reportado acerca de la difusión de Ca^{2+} dentro del RS.

8.1. Resultados del modelo matemático utilizando cinética estándar (CE) para simular la unión de Ca^{2+} a las proteínas amortiguadoras luminales

Con el fin de caracterizar los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ causados por la aplicación de cafeína, la Dra. Gómez-Viquez indujó la liberación de Ca^{2+} del RS mediada por los RyRs en los miocitos aislados de la vejiga urinaria de cobayo al aplicar un pulso de cafeína de 20 mM por 5 s. La liberación de Ca^{2+} inducida por este agonista se registró como cambios en $[Ca^{2+}]_i$. La cafeína produjo un incremento transitorio en $[Ca^{2+}]_i$ en el 100 % de las células estudiadas (n=12). Este incremento en $[Ca^{2+}]_i$ alcanzó un valor promedio de 629.0$\pm$76.0 nM a partir de una $[Ca^{2+}]_i$ basal de 64.2$\pm$4.9 nM. Un registro representativo se muestra en el panel (A) de la Figura 26 (círculos color rojo). Este transitorio de Ca^{2+} representativo sirvió para validar nuestros resultados *in silico*.

Con el propósito de estudiar la dinámica de Ca^{2+} tanto en el citoplasma como en el RS durante el proceso de liberación de Ca^{2+} por medio de los RyRs *in silico*, resolvimos el sistema de EDOs que corresponden al modelo CE (ecuaciones (24) y (25)) por medio del método de Runge-Kutta de cuarto orden. La respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ obtenida de esta simulación se muestra en el panel (A) de la Figura 26 (línea color azul). Cabe recordar que la característica principal del modelo CE es que el número total de sitios de unión a Ca^{2+} en el RS *permanece constante* (ecuación (33)). El transitorio de Ca^{2+} se generó cuando [Caf] tomó el valor de 20 mM en la ecuación (31) durante 5 s. Las condiciones iniciales utilizadas para obtener este transitorio de Ca^{2+} simulado *in silico* fueron $[Ca^{2+}(0)]_{Ti}$=7.5 μM y $[Ca^{2+}(0)]_{TRS}$=1.65 mM con un paso h=0.01. Los valores de los parámetros utilizados en esta simulación se muestran en la Tabla 1. En el panel (B) de la Figura 26 se muestra el plano fase de este transitorio simulado de Ca^{2+} obtenido *in silico*. Como se puede observar del plano fase, la trayectoria que siguen $[Ca^{2+}]_{RS}$ con respecto a $[Ca^{2+}]_i$ carece de la fase 1 observada experimentalmente [1].

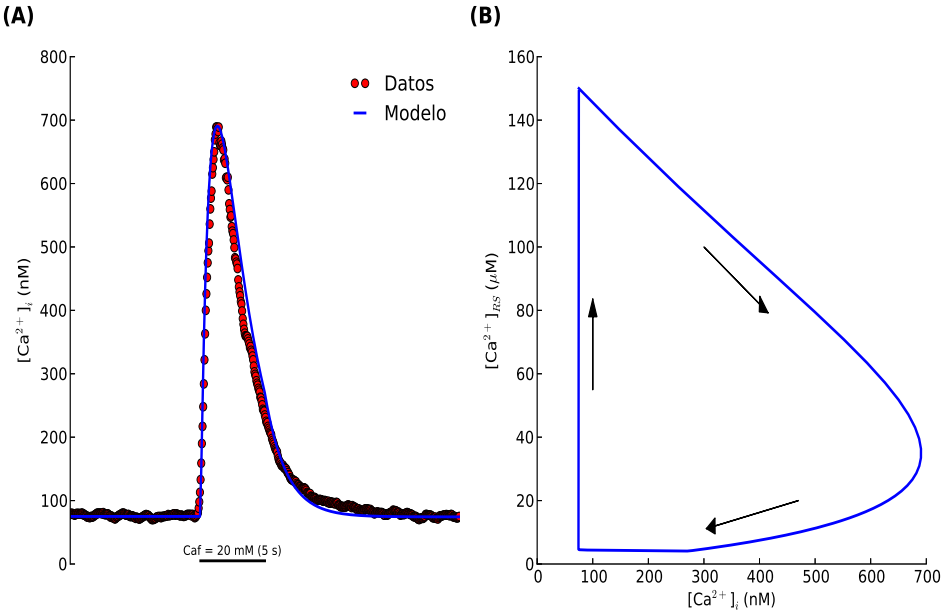

Figura 26: Simulación del transitorio de Ca^{2+} *in silico* generado al aplicar un estímulo de cafeína utilizando el modelo CE, el cual no reproduce la fase 1 observada experimentalmente bajo estas condiciones. En el Panel (A) se muestra el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ estimulado por cafeína (20 mM) experimentalmente en CML de vejiga urinaria de cobayo (círculos color rojo), así como el transitorio de Ca^{2+} obtenido *in silico* simulando el modelo CE (línea color azul). Los valores de los parámetros utilizados en esta simulación se muestran en la Tabla 1, localizada al final del documento. En el panel (B) se presenta el plano fase de este transitorio. Note que la fase 1 de la $[Ca^{2+}]_{RS}$ observada en el proceso de liberación de Ca^{2+} está ausente [1].

Estos resultados nos sugieren que con el modelo CE se puede generar un transitorio de Ca^{2+} que sigue al experimental, con la observación de que con este modelo no se puede obtener la fase 1. La ausencia de la fase 1 se observó aún cuando se realizó un extenso barrido de parámetros. Esto es muy relevante porque la fase 1 generada en el proceso de liberación de Ca^{2+} se ha observado en varios modelos celulares [1]. La ausencia de la fase 1 nos indicó que necesitábamos hacer un refinamiento de nuestro modelo matemático.

8.2. Resultados del modelo matemático utilizando cinética bajo demanda (CbD) para modelar la unión de Ca^{2+} a las proteínas amortiguadoras luminales

Ahora veamos, la Dra. Gómez-Viquez ha observado que la aplicación del pulso de 20 mM de cafeína produce una respuesta transitoria de $[Ca^{2+}]_i$ con una gran variabilidad en la amplitud (nM), la velocidad máxima de liberación (nM/s) y el tiempo al pico (s). Conviene recordar que la amplitud (nM) es el valor máximo de $[Ca^{2+}]_i$ a partir del nivel basal, $\Delta[Ca^{2+}]_i$. A su vez, la velocidad máxima de liberación (nM/s) se obtiene calculando la primera derivada de $[Ca^{2+}]$ con respecto al tiempo. Habría que decir también que el tiempo al pico (s) corresponde al tiempo que tarda en alcanzar el valor máximo el transitorio de Ca^{2+} una vez que ha iniciado el estímulo.

En el panel (A) de la Figura 27 se muestra la relación entre la amplitud de las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas al aplicar 20 mM de cafeína y la correspodiente velocidad máxima de liberación de Ca^{2+} de 66 diferentes células (círculos color rojo). En el panel (B) de la Figura 27 se presentan las mismas respuestas que en el panel (A) pero comparando la velocidad máxima de liberación con respecto al tiempo al pico (círculos color rojo).

Por otra parte, en la sección 7.2 se presentó el análisis de las curvas de unión a Ca^{2+} a CSQ de los experimentos realizados por Park *et al* [44]. De estos experimentos observamos que el número máximo de sitios de unión a Ca^{2+} (B_{max}) aumenta conforme se eleva el Ca^{2+} en el medio (vea la Figura 25). Estos resultados los interpretamos como si estuviesen apareciendo nuevos sitios de unión a Ca^{2+} conforme se van ocupando. Esto lo tomamos en cuenta en nuestro modelo matemático de una manera heurística (ecuación (37)). Bajo esta condición nuestro modelo matemático recibió el nombre de modelo de cinética bajo demanda (CbD).

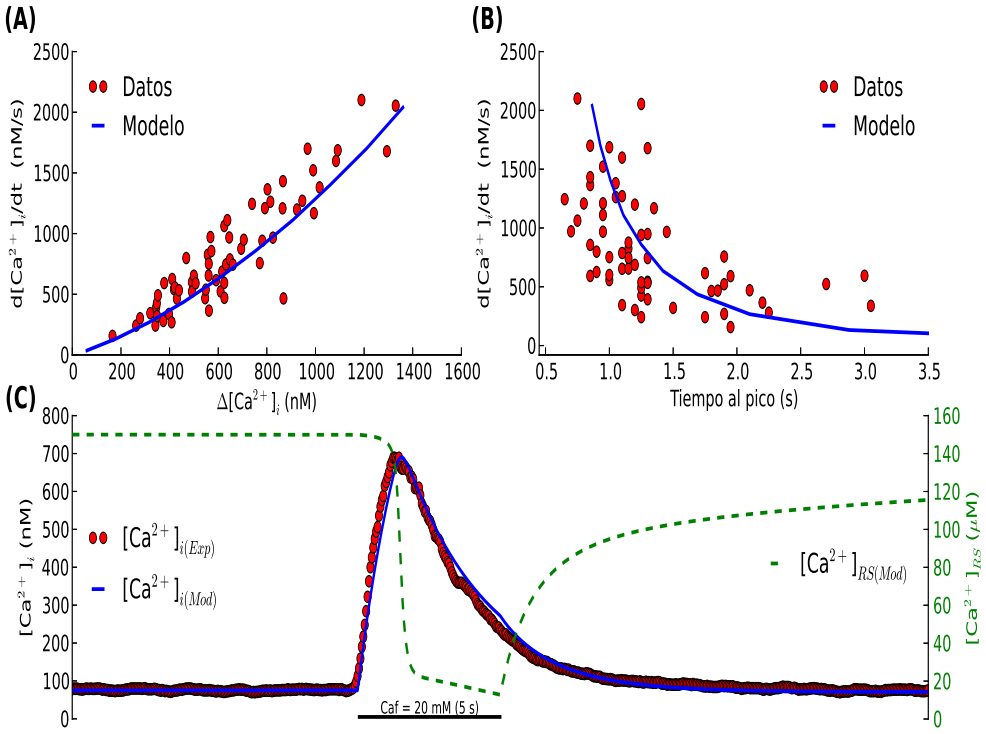

Figura 27: Respuestas de la concentración intracelular de Ca^{2+} inducidas al aplicar una dosis de 20 mM de cafeína y las respuestas del modelo CbD. En el panel (A) se muestran los datos obtenidos para la amplitud y la velocidad máxima de liberación inducida por un pulso de cafeína de 20 mM aplicado a 66 diferentes CML (puntos color rojo) y el ajuste del modelo CbD para estas respuestas (línea color azul). En el panel (B) se presentan las mismas respuestas que en el panel (A) pero comparando la velocidad máxima de liberación con respecto al tiempo al pico. En el panel (C) se muestra el curso temporal de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ (puntos color rojo) y el ajuste del modelo CbD (línea color azul) así cómo la reducción de $[Ca^{2+}]_{RS}$ predicha por el modelo (línea color verde punteada). Es necesario mencionar que para lograr reproducir este transitorio de Ca^{2+} en particular b = 65 s^{-1} y γ = 5.2 %.

Con el fin de probar si el modelo CbD podía reproducir tanto el transitorio de Ca^{2+} como la fase 1 resolvimos el sistema de EDOs (ecuaciones (24) y (25)). En esta ocasión

sustituimos la ecuación (33) por la ecuación (37). El método que se utilizó para resolver el sistema de EDOs fue el método de Runge-Kutta de cuarto orden con las mismas condiciones iniciales y con el mismo paso con que se resolvió el modelo CE (sección 8.1). Los valores de los parámetros utilizados para obtener el conjunto de resultados de simulaciones *in silico* de esta sección se muestran en la Tabla 1.

El curso temporal de la respuesta simulada de $[Ca^{2+}]_i$ inducida al aplicar cafeína por 5 s *in silico* se muestran en el panel (C) de la Figura 27 (línea color azul) junto con los cambios simulados en $[Ca^{2+}]_{RS}$, vea el panel (C) de la Figura 27 (línea discontínua color verde). Como se puede observar del panel (C) con el modelo CbD podemos reproducir el transitorio de Ca^{2+} observado experimentalmente. Más aún, con el modelo CbD al graficar $[Ca^{2+}]_{RS}$ con respecto a $[Ca^{2+}]_i$ se observó la presencia de la fase 1 (vea la línea color azul de la Figura 31). La obtención del transitorio de Ca^{2+} aunado a la reproducción de la fase 1 observada experimentalmente nos sugirió que el modelo CbD podría servir para entender mejor la dinámica de la liberación de Ca^{2+} *in silico*.

A fin de probar si podíamos reproducir la variabilidad observada en el proceso de liberación de Ca^{2+} realizamos lo siguiente. Utilizamos el modelo CbD y proponiendo que el volumen del RS que responde a cafeína *varía del 1 al 10 % del volumen celular* (parámetro γ) logramos reproducir la variabilidad celular. Tanto para la velocidad máxima de liberación con respecto a la amplitud como para la velocidad máxima de liberación con respecto al tiempo al pico (vea respectivamente la línea azul de los paneles (A) y (B) de la Figura 27).

Conviene expresar que cada uno de los valores de estos resultados de variabilidad *in silico* fueron obtenidos de forma independiente. Con esto quiero decir, en una simulación el parámetro γ tomó el valor de 0.1 que corresponde a cuando el volumen del RS ocupa el 10 % del volumen celular, se resolvió el modelo CbD como se describe al inicio de esta sección y se generó el transitorio simulado de Ca^{2+}. A continuación se midió la amplitud del transitorio de Ca^{2+} (nM), la velocidad máxima de liberación de Ca^{2+} (nM/s) y el tiempo al pico (s). Así por ejemplo, para γ =0.1, la amplitud es 1360 nM, la velocidad máxima es 2040 nM/s y el tiempo al pico es 0.8 s. Este procedimiento se repitió para el

parámetro γ en el intervalo de 0.01 a 0.1.

A su vez, la Dra. Gómez-Viquez ha observado que la aplicación de 2 mM de cafeína a las CML produce en promedio respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ más pequeñas y lentas con respecto a los transitorios de Ca^{2+} generados cuando se aplica una dosis de 20 mM de cafeína (círculos rojos de los paneles (A) y (B) de la Figura 28).

Con el fin de determinar si el modelo matemático CbD es robusto utilizamos los paramétros que reproducen la respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas al aplicar 20 mM de cafeína y generamos los transitorios de Ca^{2+} al aplicar una dosis de 2 mM de cafeína. Es necesario mencionar que para obtener estas simulaciones, el modelo se resolvió siguiendo el mismo procedimiento que para el caso de 20 mM de cafeína. Los valores de los parámetros utilizados se muestran en la Tabla 1.

En la Figura 28 se muestran las respuestas de estas simulaciones. Como se puede observar el modelo CbD logra una buena reproducción entre el máximo de la velocidad de subida de $[Ca^{2+}]_i$ y de la amplitud del transitorio de Ca^{2+} (vea la línea color azul del panel (A) de la Figura 28) así cómo del tiempo de subida (vea la línea color azul del panel (B) de la Figura 28). Más aún, con el modelo CbD y una dosis de 2 mM de cafeína se logró reproducir el curso temporal de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ (línea azul del panel (C) de la Figura 28). Así mismo, en el panel (C) de la Figura 28 se muestra el curso temporal de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (vea la línea color verde discontínua).

Estos resultados sugieren que el modelo de cinética bajo demanda es robusto y por lo mismo nos permitirá evaluar cuáles de estos parámetros son los que tienen un papel en las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por cafeína cuando está inhibida la bomba SERCA.

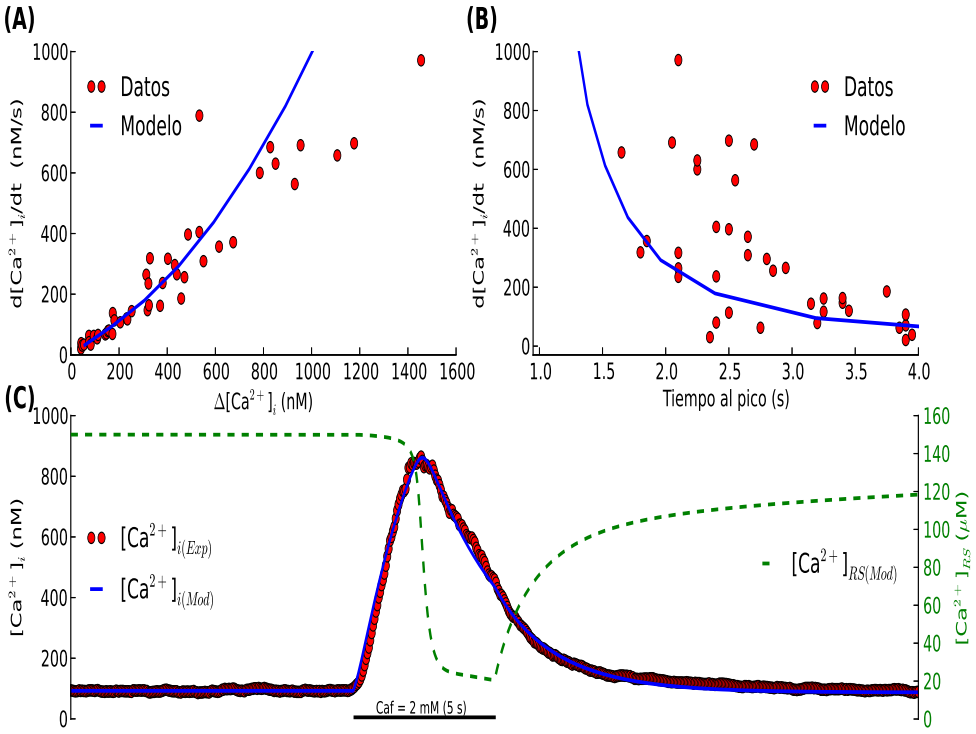

Figura 28: Respuestas de la concentración intracelular de Ca^{2+} inducidas al aplicar una dosis de 2 mM de cafeína y las respuestas del modelo CbD. En el panel (A) se muestran los datos obtenidos para la amplitud y la velocidad máxima de liberación inducida por un pulso de cafeína de 2 mM aplicado a 49 diferentes CML de vejiga urinaria de cobayo (puntos rojos) y el ajuste del modelo CbD para estas respuestas (línea color azul). En el panel (B) se presentan las mismas respuestas que en (A) pero comparando la velocidad máxima de liberación con respecto al tiempo al pico. En el panel (C) se muestra el curso temporal de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ (puntos color rojo) y el ajuste del modelo CbD (línea color azul) así cómo la reducción de $[Ca^{2+}]_{RS}$ derivada del modelo (línea verde punteada). Es necesario mencionar que para lograr reproducir este transitorio de Ca^{2+} en particular b = 35 s^{-1}, $\overline{[Ca^{2+}]_i}$ = 92.5 nM y γ = 7.45 %.

8.2.1. Un modelo de la cinética de unión a Ca^{2+} basado en cómo CSQ une Ca^{2+}

Diversos esfuerzos se han realizado para desarrollar estudios numéricos del amortiguamiento y secuestramiento de Ca^{2+} [37, 74, 75, 76]. En estos estudios, la concentración intracelular de Ca^{2+} es típicamente calculada basada en el balance de los flujos de entrada (corrientes de Ca^{2+}), la salida de Ca^{2+} (bombas de Ca^{2+}, intercambiadores de Ca^{2+} y secuestro de Ca^{2+} dentro de los organelos), la unión de Ca^{2+} a los amortiguadores endógenos y exógenos (indicadores de Ca^{2+}) y la unión de Ca^{2+} a los amortiguadores endógenos lentos como parvalbumina (k_{off} muy pequeña) [38]. Si bien las abstracciones anteriores han servido para explicar parcialmente el comportamiento del ion Ca^{2+} a nivel intracelular, hay preguntas que permanecen abiertas o sin contestar, especialmente porque los propios indicadores que se usan para seguir la dinámica de Ca^{2+} intracelular modifican las características de los transitorios de Ca^{2+} [74]. Recientemente, Neher E y Taschenberger H [38] han propuesto que es necesario replantear las suposiciones sobre las que recae la caracterización de los amortiguadores endógenos de Ca^{2+} (parvalbumina en el caso del citoplasma), toda vez que existe discrepancia entre las estimaciones obtenidas *in silico* y los resultados experimentales.

En este trabajo se desarrolló un modelo matemático determinista para estudiar la dinámica de Ca^{2+} tanto en el citoplasma como en el RS una vez que se ha inducido la liberación de Ca^{2+}. La primera premisa que se planteó fue sugerir que el número total de sitios de unión a Ca^{2+} en el RS permanece constante (modelo CE). Resolvimos numéricamente el modelo CE y si bien generamos transitorios de Ca^{2+} *in silico* que siguen al experimental no fuimos capaces de generar la fase 1 observada experimentalmente [1]. Esto es relevante ya que considerábamos que el RS es finito así como el número total de sitios de unión a Ca^{2+} de las proteínas amortiguadoras del RS. Esto nos llevó a replantear las premisas sobre las que estábamos construyendo el modelo.

Nosotros propusimos otro tipo de cinética, llamada cinética bajo demanda (CbD), dónde el número de sitios de unión incrementa en respuesta a la unión de Ca^{2+}. En otras palabras, si hay una reducción en $[Ca^{2+}]$ los sitios de unión a Ca^{2+} desaparecen

(vea la Figura 25). Esta idea es apoyada por el trabajo hecho por Park *et al* con CSQ [44]. Dónde de nuestro propio análisis de sus datos de unión a Ca^{2+} encontramos que B_{max} (la cantidad total de los sitios de unión a Ca^{2+}) aumenta conforme [Ca^{2+}] incrementa. Es decir, B_{max} = 22 en el rango de 0 a 0.5 mM [Ca^{2+}], y se va hasta 40 entre 0.5 y 3 mM de [Ca^{2+}], B_{max} incrementa hasta 65 para el rango de 3 a 7 mM [Ca^{2+}] e incrementa otra vez a 79 a partir de 7 a 20 mM de [Ca^{2+}]. Así mismo, se ha mostrado que el incremento de B_{max} requiere de la oligomerización de la proteína porque usando CSQ mutante incapaz de agregarse, muestra una B_{max} constante y saturable de 22 en todo el rango de 0 a 20 mM de [Ca^{2+}] (vea la Figura 25) [44].

Se debe agregar que otro trabajo que apoya la idea de que los sitios de unión a Ca^{2+} aumentan en el RS conforme se va ocupando es el de Kumar A *et al* [77]. Con el objetivo de caracterizar la naturaleza de los sitios de unión a Ca^{2+} de CSQ1 *in silico* y a su vez entender sus bases moleculares de reconocimiento del Ca^{2+} realizaron simulaciones de dinámica molecular para esta proteína. De su investigación reportaron que los sitios de unión a Ca^{2+} de la proteína difieren en afinidad y geometría, los sitios de alta afinidad por Ca^{2+} comparten geometrías similares y se encontró que la mayoría de ellos se inducen cuando incrementa [Ca^{2+}] [77]. Además, las simulaciones muestran que el polímero de CSQ1 es progresivamente estabilizado por el incremento de las interacciones hidrofóbicas que emergen con el incremento de [Ca^{2+}] [77].

De aquí que con el modelo CbD se pueden obtener los transitorios de Ca^{2+} intracelular simulados que son simulares a los experimentales. Además de que reproduce la fase 1 observada experimentalmente en el proceso de liberación de Ca^{2+} [1]. Más aún, con este modelo también se pueden reproducir los experimentos de variabilidad celular. De modo que la principal contribución del modelo CbD es el descubrimiento de que los datos experimentales no pueden ser reproducidos usando la cinética estándar (CE) para la unión de Ca^{2+} a proteínas luminales del retículo endoplásmico/sarcoplásmico.

8.3. Resultados del modelo matemático utilizando la cinética estándar para modelar la unión de Ca^{2+} a las proteínas amortiguadoras luminales cuando se ha inhibido la bomba SERCA

Con el objetivo de determinar el papel de la bomba SERCA en la liberación de Ca^{2+} mediada por los RyRs, la Doctora Gómez-Viquez inhibió de manera aguda a estas enzimas con un pulso de tapsigargina (10 μM) por 5 s y 30 s, para después estimular la liberación de Ca^{2+} con cafeína en CML. La aplicación de tapsigargina resultó como se esperaba en respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ más pequeñas (círculos rojos del panel (A) de la Figura 29) y más lentas (círculos rojos del panel (B) de la Figura 29) comparadas con las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas al aplicar únicamente 20 mM de cafeína (paneles (A) y (B) de la Figura 27). A fin de determinar qué parámetros eran necesarios cambiar para reproducir el efecto de tapsigargina, partimos de analizar qué sucedía con $[Ca^{2+}]_i$ y $[Ca^{2+}]_{RS}$ en el modelo CbD una vez que el flujo J_3 era igualado a cero. Este cambio en el modelo CbD no nos permitió reproducir los resultados experimentales. A causa de esto, nos vimos en la necesidad de hacer un análisis más detallado. Aceptemos por el momento de que encontramos los parámetros de nuestro modelo que nos permitieron generar los experimentos de variabilidad celular y el transitorio de Ca^{2+} *in silico* cuando se encuentra inhibida la bomba SERCA; la descripción de cómo llegamos a estos resultados la presentaré en líneas posteriores. Es necesario mencionar que para generar los resultados *in silico* de esta sección se realizó el mismo procedimiento descrito en las secciones 8.1 y 8.2. Los valores de los parámetros utilizados se muestran en la Tabla 1. En los paneles (A) y (B) de la Figura 29 se muestran los resultados de variabilidad obtenidos *in silico* bajo las premisas que reproducen el transitorio de Ca^{2+} intracelular una vez que está inhibida la bomba SERCA (línea azul). En cuanto al panel (C) de la Figura 29 se observa que la reducción en $[Ca^{2+}]_{RS}$ ocurre a una mayor velocidad que cuando la bomba SERCA está activa y apesar de ello la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ fue más pequeña y lenta (línea verde discontínua del panel (C) de la Figura 29) comparadas con los datos obtenidos para 20 y 2 mM de cafeína (Figuras 27 y 28) .

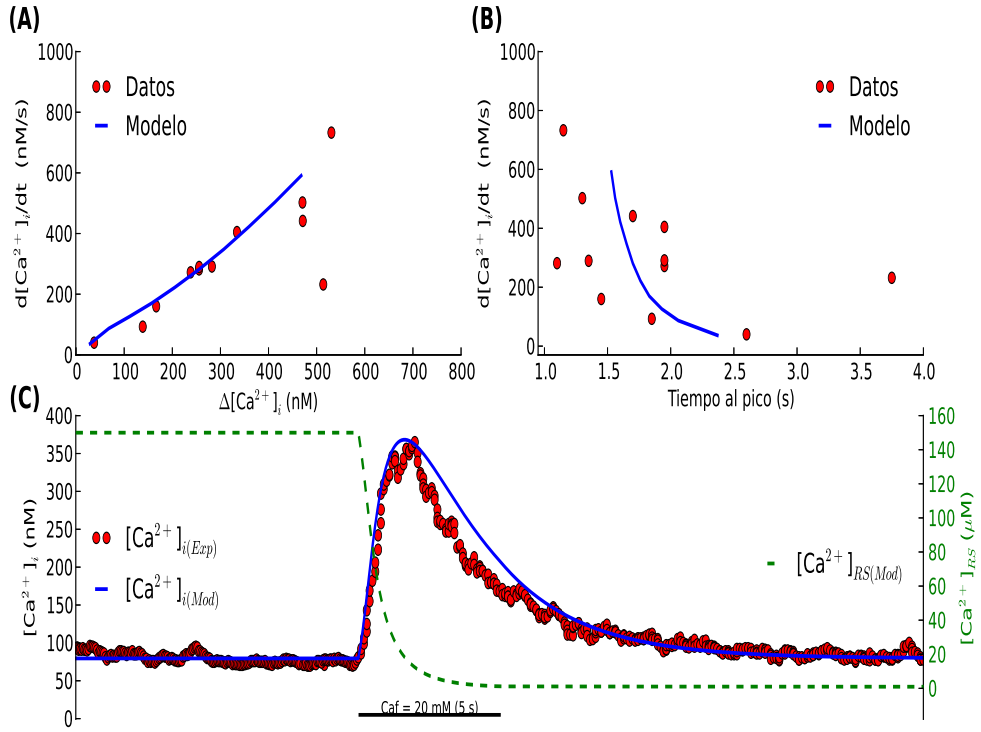

Figura 29: Efecto de la inhibición de la bomba SERCA por tapsigargina en las respuestas del Ca^{2+} intracelular inducidas al aplicar 20 mM de cafeína. En el panel (A) se muestran los datos obtenidos para amplitud y la velocidad máxima de la liberación inducida por un pulso de cafeína aplicado a 12 diferentes CML expuestas a tapsigargina por 5 s, 10 s antes de la aplicación de cafeína (círculos color rojo). Note que la amplitud y la velocidad máxima de liberación fueron menores así como el tiempo al pico (círculos color rojo, panel (B)). Los resultados obtenidos al simular la inhibición de la bomba SERCA se muestran en línea color azul, cabe mencionar que estos resultados se logran al usar el modelo CE en lugar del modelo CbD. En el panel (C) se muestra el curso temporal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida al aplicar 20 mM de cafeína de una CML que previamente ha sido expuesta a tapsigargina (círculos rojos) junto las respuestas obtenidas al simular el modelo CE modificado (línea color azul) y la reducción de $[Ca^{2+}]_{RS}$ de este modelo (línea color verde). Note que no hay recuperación de $[Ca^{2+}]_{RS}$ como se espera una vez que la bomba SERCA ha sido inhibida y se ha detenido la aplicación de cafeína. Es necesario mencionar que para lograr reproducir este transitorio de Ca^{2+} en particular b = 72.2 s^{-1}, $\overline{[Ca^{2+}]_i}$ = 79.5 nM y γ = 6.64 %, k_f=0.3 mM s^{-1}, $[Ca^{2+}]_{TRS}$ = 750 μM y CSQ = 4.

Las siguientes líneas tratan del procedimiento que se siguió para determinar el papel de la bomba SERCA en la liberación de Ca^{2+} por medio de los RyRs *in silico*. Los resultados de este procedimiento se presentan en la Figura 30. En el panel (A) de la Figura 30 se muestra las respuestas de los transitorios simulados de $[Ca^{2+}]_i$ estimulados por la aplicación de 20 mM de cafeína (barra negra) bajo diferentes condiciones. En el panel (B) se muestra las respuestas simuladas de $[Ca^{2+}]_{RS}$ de estas mismas simulaciones. Mientras que en el panel (C) se muestra el curso temporal de $[Ca^{2+}]_{TRS}$, el cual corresponde a la suma de $[BCa]_{RS}$ y $[Ca^{2+}]_{RS}$ de este mismo procedimiento.

En primer lugar observe la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$, $[Ca^{2+}]_{RS}$ y $[Ca^{2+}]_{TRS}$ al aplicar 20 mM de cafeína durante 5 s utilizando el modelo CbD (respectivamente vea la línea azul obscuro de los paneles (A), (B) y (C) de la Figura 30). Cómo se puede observar al aplicarse el pulso de cafeína se genera el transitorio de Ca^{2+} y una correspondiente disminución tanto en $[Ca^{2+}]_{RS}$ como en $[Ca^{2+}]_{TRS}$. Una vez que cesa el estímulo de cafeína las tres variables comienzan a regresar a su valor de estado estacionario. En particular note que $[Ca^{2+}]_{RS}$ se recupera más rápido comparado con $[Ca^{2+}]_{TRS}$.

Ahora veamos, utilizando el modelo CbD cuando el flujo J_3 es igualado a cero, emulando la inhibición de la bomba SERCA, se observó la inhibición completa de la bomba SERCA por si misma no altera la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a la aplicación de 20 mM de cafeína (vea la línea azul claro del panel (A) de la Figura 30), pero como se esperaba, elimina completamente la recuperación de $[Ca^{2+}]_{RS}$ y $[Ca^{2+}]_{TRS}$ después de la aplicación de cafeína (vea la línea azul claro de los paneles (B) y (C) de la Figura 30)

Avanzando en nuestro análisis, deseo subrayar que nosotros observamos una reducción significativa en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ estimulado por cafeína, al cambiar la forma en que las proteínas luminales interactúan con el Ca^{2+} al usar una cinética estándar (CE) en lugar de una cinética bajo demanda (CbD) (vea la línea roja del panel (A) de la Figura 30). Es preciso enfatizar que la principal diferencia que encontramos es que el retardo de la reducción de $[Ca^{2+}]_{RS}$ ha desaparecido (vea la línea roja del panel (B) de la Figura 30) apesar de que la cantidad total de Ca^{2+} liberado por el RS es la misma en ambas

cinéticas (vea las líneas roja y azul obscuro del panel (C) de la Figura 30). De manera puntual observe que con el modelo CE la reducción de $[Ca^{2+}]_{TRS}$ es mucho más lenta que en la condición del modelo CbD (respectivamente vea las líneas roja y azul obscuro del panel (C) de la Figura 30). Esta situación permite que los mecanismos de remoción de Ca^{2+} del citoplasma atenúen la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$.

Es necesario recalcar que el efecto de tapsigargina en la respuesta del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por cafeína afecta tanto la amplitud como la velocidad máxima de liberación [3]. El primero de estos efectos se ha logrado cambiando la forma en que unen Ca^{2+} las proteínas amortiguadoras de una cinética bajo demanda (CbD) a una cinética estándar (CE). Para el último efecto redujimos tanto el número de canales involucrados en la liberación (parámetro k_f) como la cantidad de Ca^{2+} unido a las proteínas amortiguadoras luminales (parámetro CSQ) (vea la línea morada del panel (A) de la Figura 30).

Hay que mencionar, además, que el tiempo tomado por tapsigargina para producir estos dos efectos es corto, por lo que nosotros consideramos que la concentración de proteínas luminales no se modifica y pensamos que lo que estaría pasando sería una reducción en el número de RyRs que están acoplados a los proteínas luminales (CSQ) y respondiendo a cafeína (k_f). Esta situación reduce la amplitud del transitorio de Ca^{2+} estimulado por cafeína sin reducirse $[Ca^{2+}]_{TRS}$. Con el objetivo de alcanzar este efecto en nuestro modelo disminuimos $[Ca^{2+}]_{TRS}$ (vea la línea color morado del panel (C) de l a Figura 30). De esta manera logramos reproducir los resultados experimentales cuando se encuentra inhibida la bomba SERCA.

En la sección 2.1 se describió que experimentalmente se ha observado que el proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína involucra 4 fases que dependen de la actividad de la bomba SERCA. Esto es, el plano fase mostrado en la Figura 15 muestra que la inhibición de la bomba SERCA fusiona las fases 1 y 2 resultando en una relación lineal entre el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ y la reducción de $[Ca^{2+}]_{RS}$.

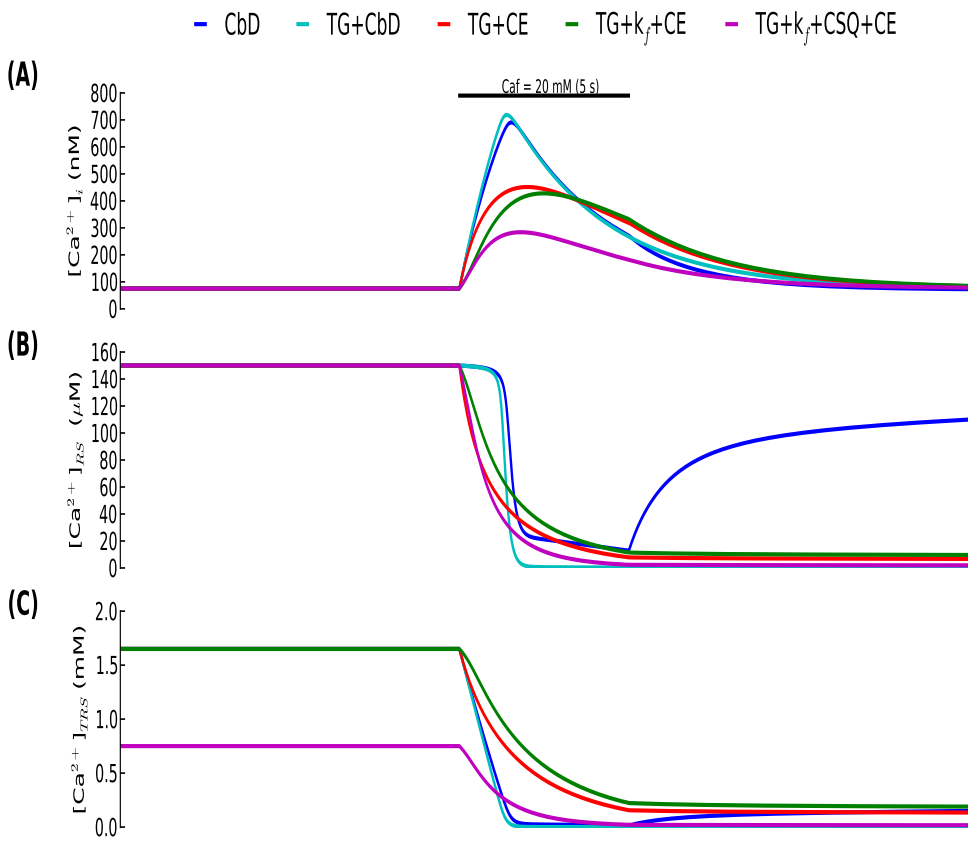

Figura 30: La inhibición de la bomba SERCA cambia la forma en la que las proteínas luminales unen Ca^{2+}. Los resultados de simulaciones $[Ca^{2+}]_i$, $[Ca^{2+}]_{RS}$ y $[Ca^{2+}]_{TRS}$ *in silico* obtenidos al simular el proceso de inhibición de la bomba SERCA se muestran respectivamente en los paneles (A), (B) y (C). La respuesta control ante la aplicación de 20 mM de cafeína usando el modelo CbD se muestra en los trazos azul obscuro. La inhibición de la bomba SERCA con tapsigargina afecta tanto la recuperación de $[Ca^{2+}]_{RS}$ como $[Ca^{2+}]_{TRS}$ (línea azul claro, paneles (B) y (C)), pero no altera la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ (línea azul claro, panel (A)). Cambiando del modelo CbD al modelo CE disminuye significativamente la amplitud del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ (línea roja, panel A) porque $[Ca^{2+}]_{TRS}$ que esta donando el RS es menor (línea roja, panel C) aunque se acelera la reducción de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (línea roja, panel C). Para reducir tanto la amplitud como la velocidad de subida, se redujo el número de RyR que responden a cafeína (k_f) (línea color verde) y por tanto la capacidad amortiguadora del retículo (CSQ) (línea morada). El estímulo de cafeína de 20 mM aplicado en todos los casos tuvo una duración de 5 s (barra negra).

En cuanto a este último punto, nuestro modelo CbD puede reproducir las 4 fases observadas en el proceso de liberación de Ca^{2+}, particularmente la transición de la fase 1 a la fase 2 (vea la línea azul de la Figura 31). En cambio, al cambiar del modelo CbD al modelo CE se observa que la fase 1 desaparece y resulta ahora en una relación lineal entre $[Ca^{2+}]_{RS}$ y $[Ca^{2+}]_i$ (línea roja de la Figura 31).

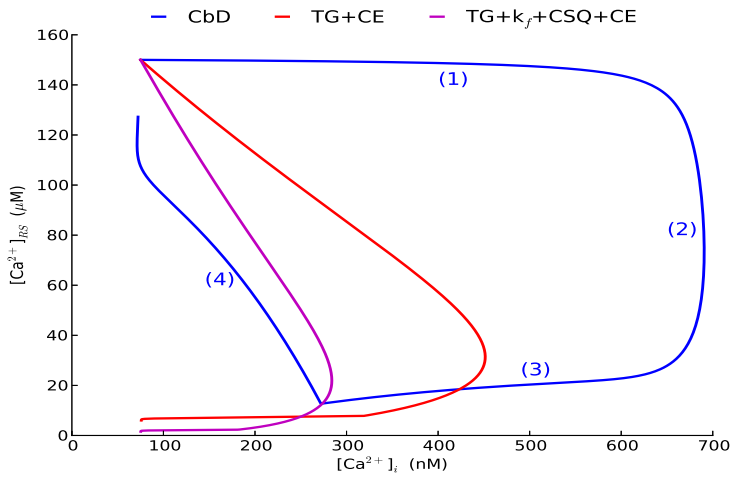

Figura 31: El modelo CbD reproduce el diagrama de fases observado en el proceso de liberación de calcio. El modelo CbD reproduce las 4 fases observadas en la liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína (línea color azul). Estas fases se ven alteradas al inhibir la bomba SERCA y cambiar al modelo CE (línea color rojo). Además, reduciendo el número de RyRs (k_f) y la capacidad amortiguadora del RS (CSQ) que participan en el proceso de liberación reduce aún más la amplitud de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ (línea color morado) pero con un diagrama de fases similar al mostrado experimentalmente cuando se ha inhibido a la bomba SERCA (línea color verde del panel (B) de la Figura 15).

La comparación entre $[Ca^{2+}]_{RS}$ y $[Ca^{2+}]_{TRS}$ muestra por qué el modelo CbD es más eficiente en incrementar $[Ca^{2+}]_i$ que el modelo CE. En el modelo CbD el suministro de Ca^{2+} hacia el citoplasma proviene principalmente del Ca^{2+} unido a las proteínas luminales con una mínima reducción en $[Ca^{2+}]_{RS}$ (vea la línea azul de la Figura 32), mientras que con el modelo CE pasa el efecto contrario (vea la línea roja de la Figura 32). Esto es relevante porque se puede explicar por qué $[Ca^{2+}]_{RS}$ no correlaciona con el

suministro de Ca^{2+} hacia el citoplasma. Además, el modelo CbD sugiere que la bomba SERCA modula el número de RyRs acoplados a las proteínas amortiguadoras de Ca^{2+}. De forma tal que la inhibición de la bomba SERCA produce una reducción de la amplitud de la respuesta de Ca^{2+} al disminuir el número de proteínas amortiguadoras participando en el proceso de liberación de Ca^{2+} (vea la línea morada de la Figura 32).

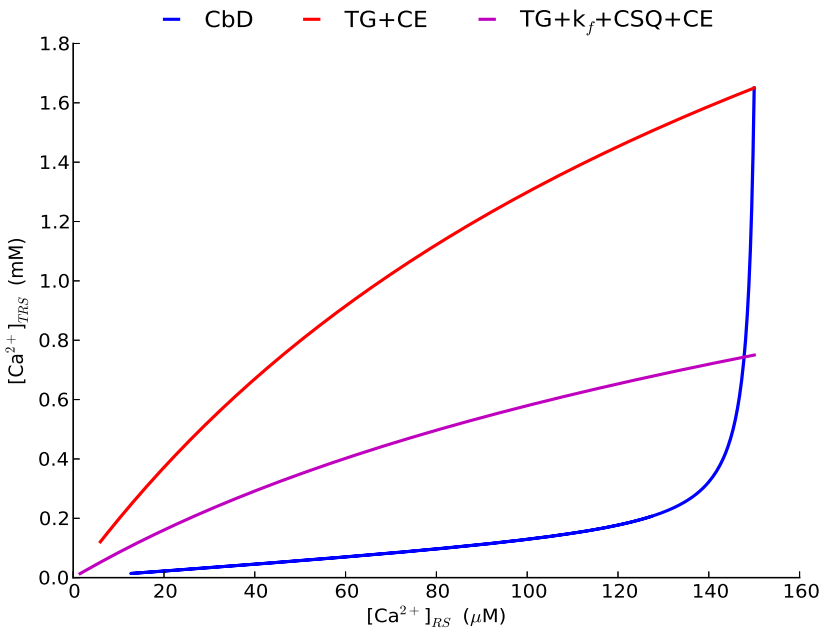

Figura 32: El modelo CbD presenta una gráfica de la capacidad amortiguadora de calcio luminal con concavidad positiva. La condición CbD genera una curva de la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} con concavidad positiva (línea azul), la cual ya ha sido observada previamente en células de músculo esquelético [40]. Esto puede explicar la gran capacidad del RS de donar Ca^{2+} (debido a la gran reducción en $[Ca^{2+}]_{TRS}$) con una reducción mínima en $[Ca^{2+}]_{RS}$. Usando el modelo CE se obtiene una curva con concavidad negativa, lo que significa una gran reducción en $[Ca^{2+}]_{RS}$ pero una reducción mucho menor en $[Ca^{2+}]_{TRS}$ (línea roja) y un transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ de mucho menor amplitud. Reduciendo la capacidad amortiguadora del RS (CSQ) así como la cantidad de RyRs (k_f) participando en el proceso de liberación estimulado por cafeína decrece la cantidad de Ca^{2+} que puede aportar el RS (línea morada).

8.3.1. La liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína en CML involucra cuatro fases que son reproducidas por el modelo CbD

Dagnino-Acosta A *et al* [22] han presentado evidencia experimental de que los canales de liberación, es decir, tanto los RyRs como los de IP_3R tienen acceso, en primera instancia, *al Ca^{2+} unido a proteínas luminales*. Una vez agotado este Ca^{2+}, entonces los canales de liberación acceden al Ca^{2+} libre luminal [22]. La evidencia que sugiere este acceso preferencial de los canales liberadores al Ca^{2+} unido a proteínas consiste en la observación de un incremento sustancial de $[Ca^{2+}]_i$ con una reducción mínima del Ca^{2+} libre luminal [22]. De aquí que un elemento clave que el modelo CbD debía reproducir es la fase 1 observada durante el proceso de liberación de Ca^{2+} y la transición de la fase 1 a la fase 2 (vea la Figura 31). La fase 1 representa una condición *de muy alta capacidad amortiguadora*, dado que se pueden observar grandes cambios en $[Ca^{2+}]_i$ con una mínima reducción en el nivel de Ca^{2+} libre luminal [22]. Por otra parte, la fase 2 se caracteriza por una abrupta reducción en la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} luminal, debido a que hay una gran reducción en $[Ca^{2+}]_{RS}$ con un efecto mínimo en $[Ca^{2+}]_i$. Estas dos fases y la transición entre ellas no puede ser reproducida usando la condición de cinética estándar (modelo CE), dónde hay un número finito de sitios de unión a Ca^{2+} que eventualmente se saturan conforme se incrementa $[Ca^{2+}]$.

Deseo subrayar que Manno C. *et al* [40] han reportando que en células de músculo esquelético al graficar $[Ca^{2+}]_{TRS}$ con respecto a $[Ca^{2+}]_{RS}$ (transición entre las fases 1 y 2) genera una curva con concavidad positiva (Figura 7 de la referencia [40]) en lugar de una curva con concavidad negativa, la cual se espera para la cinética estándar (vea la Figura 31). Los autores argumentan que esto se debe a que CSQ une Ca^{2+} de manera cooperativa, es decir, se incrementa la cooperatividad de las proteínas luminales por Ca^{2+}, la cual produce una curva con concavidad positiva para la relación entre $[Ca^{2+}]_{TRS}$ y $[Ca^{2+}]_{RS}$ [40]. La principal desventaja de esta interpretación es que entre más grande sea el coeficiente de Hill, el rango efectivo en el que las proteínas luminales pueden amortiguar Ca^{2+} es menor. Esto se opone a una de las características principales del RS/E en

el sentido de que el organelo presenta una gran capacidad para amortiguar Ca^{2+} [14]. De acuerdo con esto, nuestro modelo permite explicar ambos eventos, un aumento en la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} y una curva de amortiguamiento de Ca^{2+} en el RS con concavidad positiva. Ambas situaciones se han observado experimentalmente [1, 22, 40].

Una diferencia muy importante entre el modelo CE y el modelo CbD es que, en el primero, tanto los sitios libres de unión a Ca^{2+} de las proteínas luminales como los canales de liberación (RyRs) compiten por el Ca^{2+}. Es decir, la reducción de $[Ca^{2+}]$ incrementa la competencia por el Ca^{2+} libre (vea la línea roja de la Figura 32 y el panel (B) de la Figura 33). Este no es el caso del modelo CbD, porque hay una reducción obligatoria en el número de sitios de unión a Ca^{2+} conforme se reduce $[Ca^{2+}]_{RS}$ (vea el panel (A) de la Figura 33). Así mismo, esta situación puede explicar por qué la fase 1 es caracterizada por una gran incremento en $[Ca^{2+}]_i$ con una reducción mínima en $[Ca^{2+}]_{RS}$ (vea la Figura 31). De hecho, en algunos casos se ha observado que la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ debido a la liberación de Ca^{2+} por medio de las pozas intracelulares de Ca^{2+}, está asociada con un incremento en $[Ca^{2+}]_{RS}$ [22, 51, 67, 78]. Esto es básicamente imposible de alcanzar con el modelo CE. Sin embargo, esta condición puede alcanzarse con el modelo CbD, siempre y cuando el número de canales de liberación que se abren no son muchos, cómo ya se había mostrado experimentalmente. Ikemoto N *et al* [51] describieron cómo la activacion de pocos RyR en microsomas de RS provenientes de músculo esquelético con bajas concentraciones de polilisina produce un incremento transitorio en $[Ca^{2+}]_{RS}$, efecto que no se observa cuando los autores usan concentraciones saturantes de polilisina. Este incremento de Ca^{2+} en el lumen de los microsomas se debe a la presencia de CSQ asociada a las membranas de los microsomas [72].

Nuestro grupo de investigación ha observado que en CML, usando bajas concentraciones de heparina (para inhibir parcialmente a los IP_3R) se induce un incremento transitorio en $[Ca^{2+}]_{RS}$ en respuesta a la activación de los receptores muscarínicos [22]. Esta inhibición parcial de los IP_3R resulta en transitorios de Ca^{2+} inducidos por carbacol de mayor amplitud pero de menor duración, esto es porque aumentó $[Ca^{2+}]_{RS}$ con un menor número de canales de liberación involucrados [22].

A su vez, en células cardíacas se ha observado que las ondas de Ca^{2+} espontáneas y lentas están asociadas con elevaciones simultáneas en $[Ca^{2+}]_{RS}$, mientras que la activación coordinada de los RyR inducida por la depolarización de la membrana plasmática muestra la reducción esperada en $[Ca^{2+}]_{RS}$ mientras incrementa $[Ca^{2+}]_i$ [78].

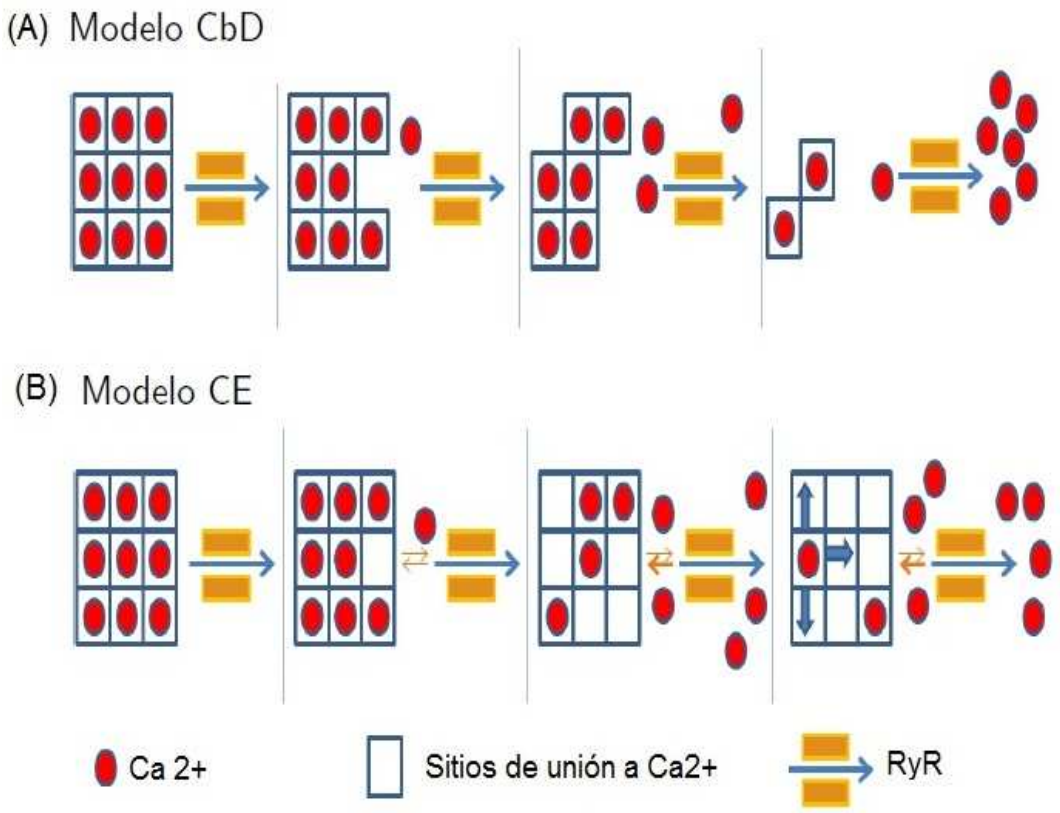

Figura 33: Las proteínas luminales y los canales de liberación compiten por el calcio libre en el modelo CE. Panel (A) En el modelo CbD los sitios de unión a Ca^{2+} de las proteínas luminales disminuyen conforme se va liberando Ca^{2+}, por lo que no representan competencia para el RyR. Panel (B) En el modelo CE, al iniciar la liberación del Ca^{2+} una vez que se ha estimulado la apertura del RyR, se suelta Ca^{2+} de las proteínas luminales guiado por el gradiente de concentración de Ca^{2+} entre el lumen del RS/E y del citoplasma dejando sitios libres dónde se puede unir Ca^{2+}. Estos sitios libres se convierten en competencia para los canales de rianodina por lo que la aportación de Ca^{2+} que hace el RS/E es cada vez más lenta, lo que resulta en un transitorio menor.

En células HeLa incubadas en ausencia de Ca^{2+} se encontró que la amplitud de los transitorios inducidos por histamina eran de similar amplitud sin importar si el nivel de Ca^{2+} luminal era bajo o alto [47]. Estos datos sugieren que los canales de liberación tienen acceso a una fuente de Ca^{2+}; posiblemente el Ca^{2+} que se encuentra unido a las proteínas amortiguadoras. Partiendo del hecho que las células HeLa no expresan CSQ, estas observaciones sugieren que hay otras proteínas luminales amortiguadoras de Ca^{2+} que presentan un comportamiento similar al de CSQ. De hecho el doble knock out para CSQ no inhibe la liberación de Ca^{2+} en músculo esquelético [79].

8.3.2. El papel de la bomba SERCA en la facilitación del proceso de liberación de Ca^{2+}

La importancia de la bomba SERCA en la facilitacitación del proceso de liberación de Ca^{2+} ya ha sido reportada [3, 22, 55]. En la Figura 30 se mostró el proceso para lograr reproducir los resultados experimentales cuando se encuentra bloqueada la bomba SERCA.

Los resultados anteriores se lograron bloqueando la bomba SERCA (J_3), cambiando la forma en que las proteínas están uniendo Ca^{2+} una vez que están inhibidas (modelo CE), reduciendo el número de RyRs que responden al estímulo de cafeína (k_f) y por tanto hay menos acceso a las proteínas luminales amortiguadoras de Ca^{2+} (CSQ). Estos resultados nos sugieren que hay algún tipo de comunicación funcional entre la bomba SERCA, las proteínas luminales y los canales de liberación de Ca^{2+} (vea la Figura 34), que al inhibir la bomba SERCA, los RyRs son menos eficientes para liberar Ca^{2+}.

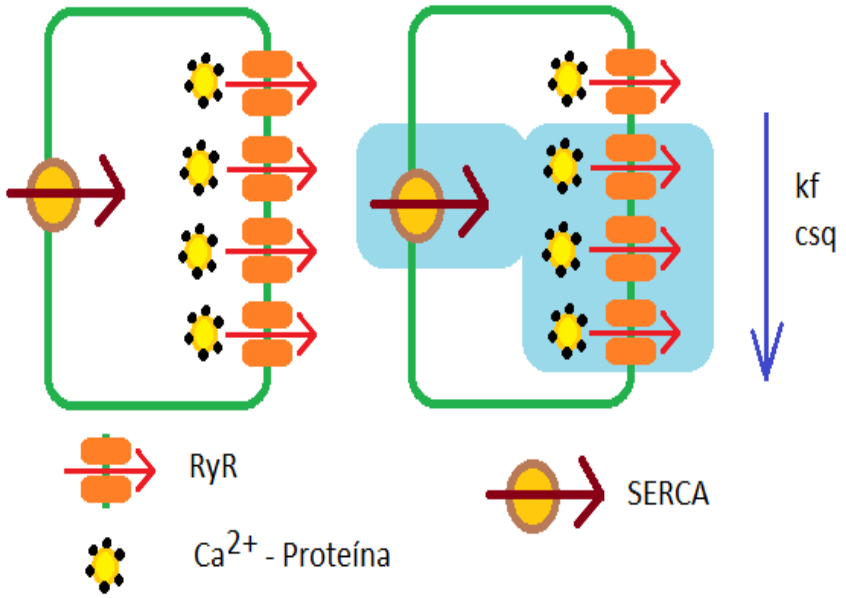

Figura 34: Unidades funcionales. Modelo hipotético de cómo operan funcionalmente la bomba SERCA, las proteínas luminales y los canales liberadores de Ca^{2+}.

8.4. El modelo CbD reproduce la respuesta refractaria de $[Ca^{2+}]_i$ ante la aplicación de cafeína

Dagnino-Acosta A *et al* [22] demostraron experimentalmente que la capacidad amortiguadora del RS requiere de un tiempo de restitución después de la liberación . Aplicando un protocolo de pulsos pareados de cafeína separados por un lapso de 30 s (tiempo suficiente para que $[Ca^{2+}]_i$ y el nivel de Ca^{2+} luminal retornen a sus niveles basales) a CML de vejiga urinaria de cobayo y registrando simultáneamente $[Ca^{2+}]_i$ y el nivel de Ca^{2+} en el RS (líneas color rojo de la Figura 35) observaron lo siguiente. La aplicación del 2do. pulso de cafeína produce un transitorio de Ca^{2+} significativamente menor (20 % de la amplitud comparada con el 1er. transitorio de Ca^{2+} citoplásmico) mientras que la 2da. respuesta a cafeína del Ca^{2+} luminal fue 107$\pm$ 2.5 % mayor que la primera respuesta. Posterior al 2do. estímulo con cafeína y después de un periodo de resposo de 2 min observaron que el nivel del Ca^{2+} en el RS fue de 0.988$\pm$0.003 F/Fo (n=5), en esta situación

el aporte de Ca^{2+} inducido por una 3ra. aplicación de cafeína fue sustancialmente mayor con respecto al 2do. estímulo de cafeína, puesto que la amplitud promedio de las respuestas fue de 75.1 ± 6.5 % con relación a la 1ra. respuesta de Ca^{2+}. Esto es una paradoja porque el modelo CE establece que la recuperación del Ca^{2+} libre luminal implica recuperación de $[Ca_{2+}]_{TRS}$, la cual generaría transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ de amplitud similar a los producidos ante el 1er. estímulo de cafeína.

Con el propósito de conocer cuál es la dinámica de Ca^{2+} tanto en el citoplasma como en el RS *in silico* al aplicar 3 pulsos de cafeína a diferentes tiempos siguiendo el protocolo de Dagnino-Acosta *et al* [22] resolvimos numéricamente tanto el modelo CbD como el modelo CE. Las simulaciones para ambos modelos fueron calculadas al resolver numéricamente el sistema de EDOs (ecuaciones (24) y (25)), siguiendo el mismo procedimiento descrito en las secciones 8.1 y 8.2. Los parámetros utilizados se muestran en la Tabla 1. Cabe mencionar que para generar los transitorios de Ca^{2+} *in silico* de esta sección se usó una concentración de cafeína de 20 mM y el parámetro γ igual 2.54 %.

En el panel (A) de la Figura 35 se muestra el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ obtenido al simular tanto el modelo CbD (línea color azul) como el modelo CE (línea color verde). A su vez, en el panel (B) de la Figura 35 se muestra el nivel de Ca^{2+} en lumen de RS de ambos modelos en respuesta a la aplicación de 3 estímulos de cafeína durante 5 s (barras color negro) a diferentes tiempos cómo lo realizaron experimentalmente Dagnino-Acosta *et al* [22]. Como se puede observar de la Figura 35 la cantidad de Ca^{2+} liberado del RS es la misma en ambos modelos. De aquí que la amplitud reducida en el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ vista en el modelo CE (línea verde del panel (A) de la Figura 35) se debe a la competencia por Ca^{2+} entre las proteínas amortiguadoras luminales y los canales de liberación. Una situación que no se observa en el modelo CbD (fase 1) (vea la línea color azul de la Figura 31). Debido a que el modelo CE no presenta fase 1 (vea la línea color morado de la Figura 31), la reducción del Ca^{2+} libre luminal ocurre un poco antes de la caída del Ca^{2+} luminal obtenida experimentalmente. Por otro lado, observe que el modelo CbD muestra una fase 1 muy exagerada. Deseo subrayar que el modelo CbD muestra una recuperación rápida del Ca^{2+} libre luminal que no involucra la recuperación de $[Ca^{2+}]_{TRS}$ (vea el trazo azul

de la Figura 32), mientras que en el modelo CE desde que $[Ca^{2+}]_{RS}$ como $[Ca^{2+}]_{TRS}$ aumentan simultáneamente hay muy poca recuperación de $[Ca^{2+}]_{RS}$.

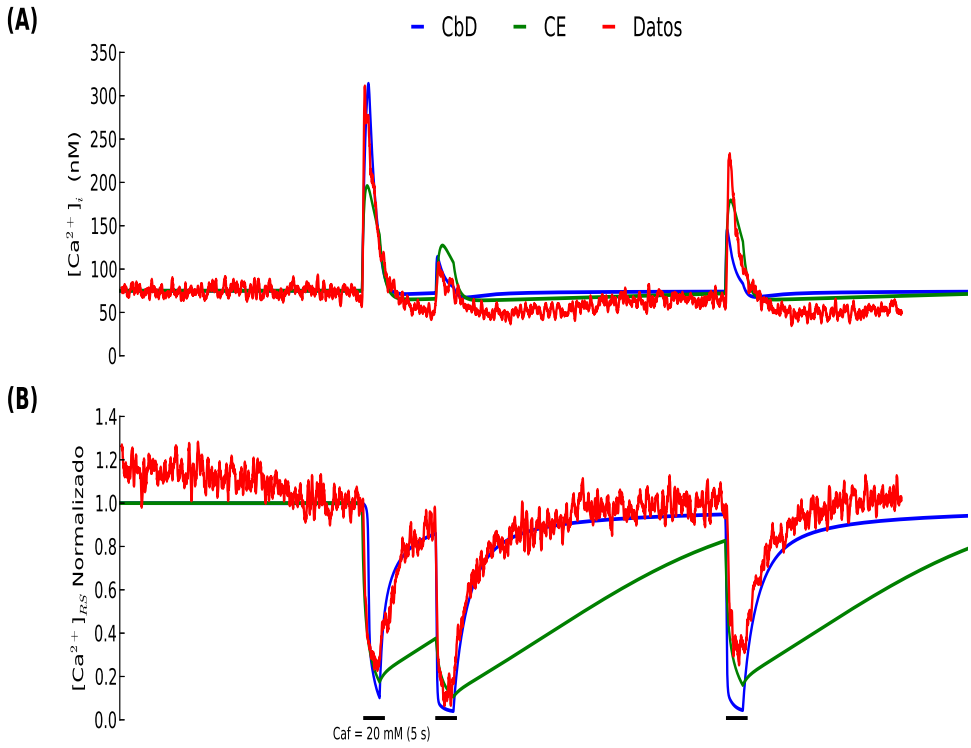

Figura 35: Respuesta refractaria de los transitorios de calcio citoplásmico estimulados por cafeína. Los registros simultáneos (trazos en color rojo) de $[Ca^{2+}]_i$ (panel (A)) y del nivel de Ca^{2+} en el RS (panel (B)) en respuesta a la aplicación de tres pulsos de cafeína por 5 s (barras en color negro) se presentan aquí. Note que antes del segundo pulso de cafeína, tanto el nivel de Ca^{2+} en el RS como $[Ca^{2+}]_i$ regresaron a sus niveles basales. Una 2da. aplicación de cafeína produce la misma respuesta en el nivel de Ca^{2+} en el RS pero con un mínimo efecto en $[Ca^{2+}]_i$. Posterior a los 2 min. de recuperación, se puede observar un mayor aporte de Ca^{2+} al citoplasma comparado con el segundo estímulo de cafeína. Los resultados numéricos obtenidos de las simulaciones del modelo CbD (líneas color azul) y del modelo CE (líneas color verde) también se presentan aquí. Los resultados experimentales fueron proporcionados por el Dr. Dagnino-Acosta A, previamente publicados en la referencia [22].

Estos resultados son ciertos incluso cuando se usan los parámetros que mejor reproduzcan la respuesta de los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ estimulados por cafeína (vea la Figura 36).

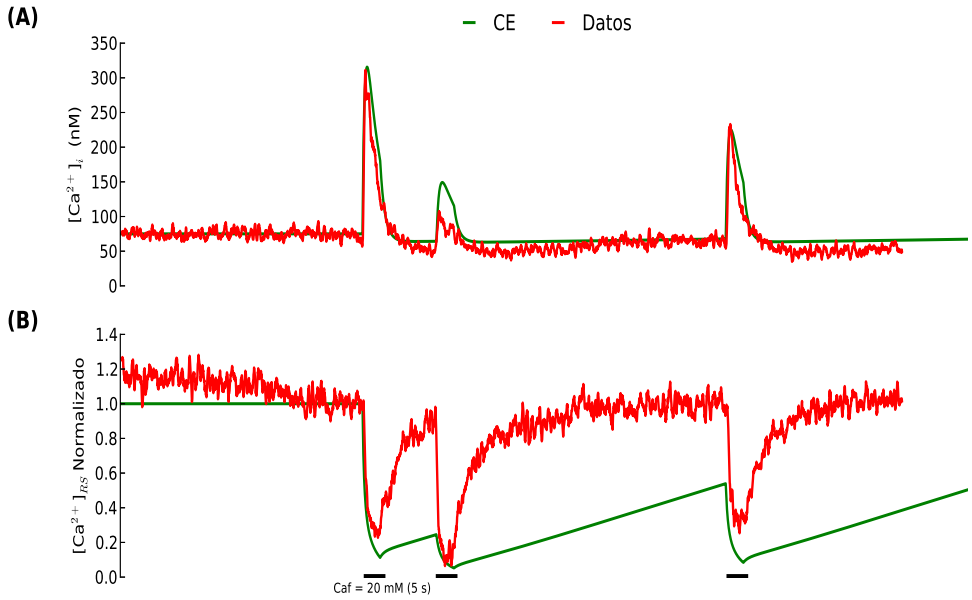

Figura 36: El modelo de cinética estándar no sigue la recuperación del calcio libre luminal. Para lograr que el modelo CE (línea color verde) reproduzca los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ (línea color rojo) inducidos al aplicar 20 mM de cafeína, se incremento el valor de γ a 4.18 %. Note que aunque las respuestas del modelo CE sigue el curso temporal de $[Ca^{2+}]_i$, el curso temporal de la recuperación de $[Ca^{2+}]_{RS}$ es mucho más lenta en el modelo CE que los registros de fluorescencia del Mag-Fluo-4. Esto puede ser explicado al considerar que en el modelo CE tanto $[Ca^{2+}]_{RS}$ como $[Ca^{2+}]_{TRS}$ van de la mano, mientras que en el modelo CbD hay una rápida recuperación de $[Ca^{2+}]_{RS}$ que antecede a la recuperación de $[Ca^{2+}]_{TRS}$, lo cual puede explicar la presencia del periodo refractario debido a la recuperación de $[Ca^{2+}]_{RS}$ pero no de $[Ca^{2+}]_{TRS}$, entonces el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ es mucho más pequeño ante el 2do. estímulo de cafeína.

Esta discrepancia entre los modelos permite que el modelo CbD pueda explicar la aparente paradoja de haber recuperado $[Ca^{2+}]_{RS}$ con una recuperación mínima en $[Ca^{2+}]_{TRS}$. Es-

tos resultados nos sugieren que el modelo CbD describe mejor el comportamiento de las proteínas durante la liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína.

8.4.1. El modelo CbD explica el periodo refractario a pesar del nivel de Ca^{2+} luminal normal

Como se puede observar de las Figuras 30 (línea color azul oscuro de los paneles (B) y (C)) y 35 el modelo CbD predice una rápida recuperación de $[Ca^{2+}]_{RS}$ y una recuperación de $[Ca^{2+}]_{TRS}$ mucho más lenta. De ahí que esto establezca un período refractario, dónde hay una recuperación de $[Ca^{2+}]_{RS}$ pero no hay una recuperación de $[Ca^{2+}]_{TRS}$. Como resultado el segundo transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ disminuye considerablemente, como se ha observado experimentalmente [3, 22, 39]. Por otra parte, el modelo CE no es capaz de seguir la recuperación de $[Ca^{2+}]_{RS}$ experimental, aún cuando se buscaron las condiciones que reprodujeran la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} (vea la Figura 36).

Ikemoto N *et al* [51] han sugerido que una gran porción del Ca^{2+} transportado está unido a las proteínas luminales, como CSQ y que este Ca^{2+} debe ser disociado previo al transporte de Ca^{2+} por la membrana, por lo que se sugiere que este proceso debe involucrar cambios complejos en el Ca^{2+} luminal durante el proceso de liberación de Ca^{2+} a partir del RS. De manera que el grupo de Ikemoto N propone que el proceso de liberación involucra tres fases: (1) hay cambios conformacionales de las proteínas luminales debido a la activación de los canales de liberación, (2) se induce la liberación del Ca^{2+} de las proteínas luminales y un subsecuente incremento en $[Ca^{2+}]_{RS}$ y (3) se da la apertura de los canales de liberación, como resultado el Ca^{2+} se mueve del RS al citoplasma [51, 52, 80, 81]. En este sentido se ha mostrado que hay un glutamato conservado tanto en el RyR como el IP_3R que puede funcionar como un sensor de Ca^{2+} luminal [82]. De manera que ante el incremento de $[Ca^{2+}]_{RS}$ pueda promover la apertura de los canales liberadores permitiendo el flujo de Ca^{2+} hacia el citoplasma [82].

8.5. Los flujos de Ca^{2+} J_1, J_2 y J_3 tanto del modelo CE como del modelo CbD

Con el fin de conocer cómo se comportaban los flujos de Ca^{2+} (J_1, J_2 y J_3) tanto del modelo CE como del modelo CbD durante el proceso de liberación de Ca^{2+} *in silico* realizamos lo siguiente. Simulamos ambos modelos cómo se describió en las secciones 8.1 y 8.2 y obtuvimos los cursos temporales de cada flujo. Es necesario recordar que el flujo J_1 corresponde a los mecanismos de remoción de Ca^{2+} en el citoplasma. A su vez el flujo J_2 corresponde a la liberación de Ca^{2+} del RS al citoplasma vía la bomba SERCA. El flujo J_3 representa el transporte de Ca^{2+} del citoplasma hacia el RS vía la bomba SERCA. En la Figura 37 se muestran los flujos J_1, J_2 y J_3 (líneas azul, rojo y verde respectivamente) generados al aplicar un estímulo de cafeína de 20 mM utilizando tanto el modelo CE (líneas discontínuas) como el modelo CbD (líneas contínuas).

Inicialmente, para el modelo CE (líneas discontínuas) los flujos muestran su valor de estado estacionario (de 0 a 10 s), como es de esperarse J_2 y J_3 comparten un mismo valor de estado estacionario. Esto es así porque en ausencia del estímulo de cafeína no hay cambio en las concentraciones de Ca^{2+} en los compartimentos. Una vez aplicado el estímulo de cafeína a los 10 s de simulación, incrementan los valores de los flujos. A los 15 s de simulación cesa el estímulo de cafeína. Observe que cuando termina el estímulo de cafeína, el flujo J_3 (línea discontínua color verde) regresa a su valor de estado estacionario, no así el flujo J_2 (línea discontínua color rojo). El flujo J_2 se va a cero. Esto es así porque el flujo J_2 es dependiente de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (ecuación 27), la cual es muy baja una vez que se ha vaciado el RS en el modelo CE. Entonces J_2 no representa una competencia para la bomba SERCA y por tanto para el flujo J_3. El resultado es que hay una ganancia neta de Ca^{2+} en el RS (vea las líneas discontínuas color rojo y verde del recuadro de la Figura 37). Esta característica permite que el tercer transitorio de Ca^{2+} obtenido *in silico* usando el modelo CE sea de mayor amplitud comparado con el tercer transitorio de Ca^{2+} usando el modelo CbD (vea las líneas verde y azul de la Figura 35, respectivamente).

Esta característica del flujo J_2 no se presenta para el modelo CbD (vea la línea contínua color rojo de la Figura 35). En este caso, una vez que cesa el estímulo de cafeína, J_2 regresa a su valor de estado estacionario porque se ha recuperado $[Ca^{2+}]_{RS}$. El resultado de esto es que la ganancia neta de Ca^{2+} en el RS es mínima, esto se ve reflejado en que el tercer transitorio de Ca^{2+} utilizando el modelo CbD es de menor amplitud que el transitorio experimental y que el obtenido con el modelo CE (vea las líneas color rojo y verde de la Figura 35). Con el modelo CbD no hay ganancia neta de Ca^{2+}, hay que esperar varias unidades de tiempo de simulación para poder recuperar un tercer transitorio de Ca^{2+} equiparable al experimental.

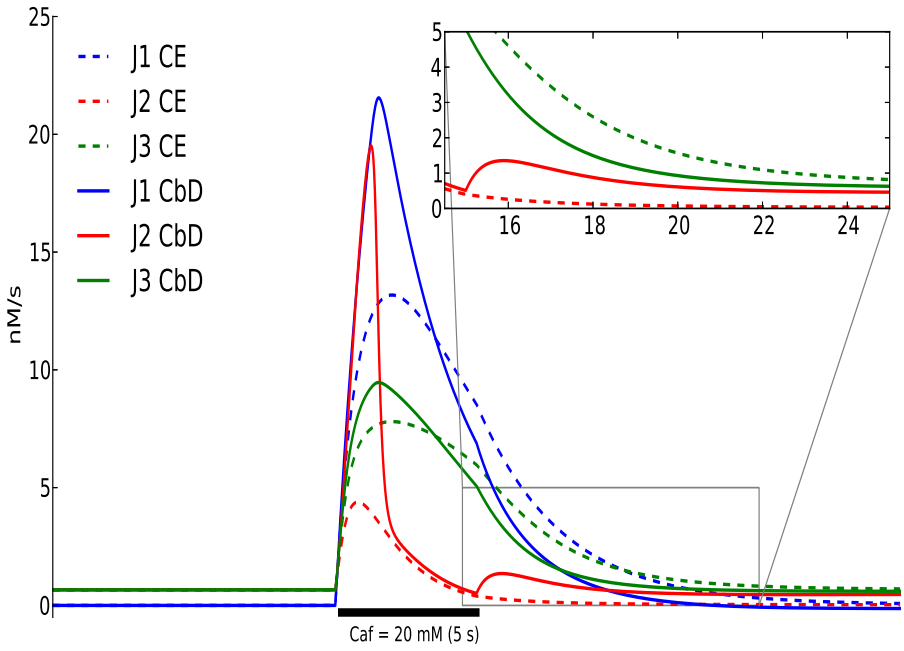

Figura 37: Los flujos de Ca^{2+} de la cinética estándar comparado con la cinética bajo demanda. La gráfica muestra el curso temporal de los flujos J_1, J_2 y J_3 obtenidos al simular un transitorio de Ca^{2+} tanto con el modelo CE (líneas discontínuas) como con el modelo CbD (líneas conínuas) al aplicar [Caf] = 20 mM por 5 s. El resto de los valores parámetros utilizados se muestran en la Tabla 1.

8.6. Condiciones alternativas a las del modelo CbD

8.6.1. Un modelo que considera los diferentes compartimentos en el RS de CML

Mientras las ideas presentadas aquí pueden estimular el campo de la señalización por Ca^{2+}. Nuestra propuesta puede ser que no sea la solución correcta. Los indicadores fluorescentes que se usan para medir Ca^{2+} contienen un grupo éster AM que le permite al fluoróforo cruzar la membrana y acumularse en una gran variedad de organelos [83]. Una vez dentro del citoplasma, el grupo AM (por ejemplo del Mag-Fluo4) es removido por las estereases internas, convirtiéndolo en una molécula permeable que puede alcanzar las pozas intracelulares de Ca^{2+}. En los experimentos realizados por Dagnino *et al* [22] se utilizó Fura-2 y Mag-Fluo4 para registrar los cambios intracelulares y luminales de Ca^{2+} respectivamente. Si bien, las suposiciones sobre las que recaen la interpretación de los resultados es que los fluoróforos están homogeneamente distribuidos (debido al tiempo de incubación del colorante), podemos imaginar otro escenario que nos permita generar la fase 1 observada experimentalmente [22].

En la Figura 38 se muestra un esquema de la sección transversal de una CML ilustrando la relación topológica entre la membrana plasmática, el RS y la envoltura nuclear. Como se puede observar, el RS cuenta con varios compartimentos, que corresponden al retículo superficial, los tubos conectores que estarían en la región citoplásmica y el retículo perinuclear [70]. Bajo este esquema, si el colorante se encuentra localizado principalmente en el retículo perinuclear (Mag-Fluo4:Ca_{per}), al estimularse la liberación de Ca^{2+} al inicio del transitorio se podría observar un incremento de $[Ca^{2+}]_i$, proveniente principalmente del RS superficial, sin un cambio en el registro de fluorescencia del retículo. Esto es porque el colorante se encuentra localizado principalmente en el retículo perinuclear y no detectaría inicialmente la disminución de la concentración de Ca^{2+} en el RS. Ya que este último estaría siendo proporcionado por el Ca^{2+} que está unido a CSQ localizada principalmente en el retículo superficial [70].

El escenario anterior nos permitiría generar la fase 1 observada en el proceso de liberación de Ca^{2+} e incluso la fase 2 [1]. Esto es, en la fase 2 comenzaría a disminuir la

concentración de Ca^{2+} libre en todo el retículo que ahora sí reportaría el fluoróforo pero ya no tendría un impacto significativo en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma.

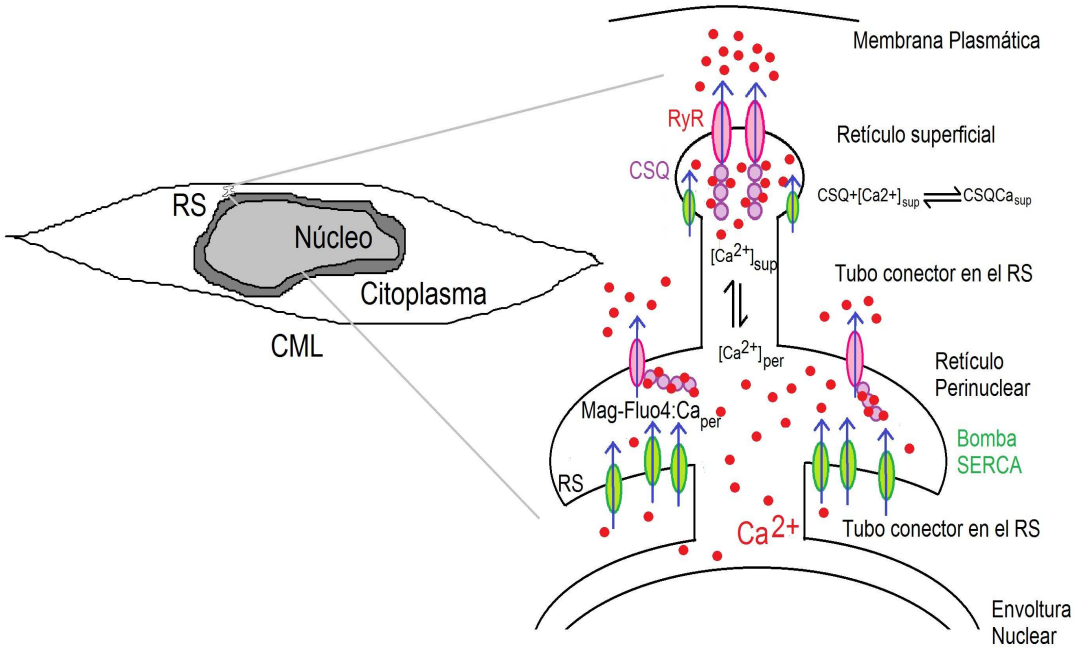

Figura 38: Modelo alternativo para generar la fase 1 observada en el proceso de liberación de calcio. Considere que el RS de CML contiene tres compartimentos: el retículo superficial, los tubos conectores del RS y el retículo perinuclear. Dónde $[Ca^{2+}]_{per}$ es la concentración de Ca^{2+} en el retículo perinuclear, $[Ca^{2+}]_{sup}$ la concentración de Ca^{2+} en el retículo superficial dónde principalmente se localizan las proteínas luminales (CSQ), Mag-Fluo4 representa la concentración del colorante y RyR son los receptores rianodina. En este modelo el Ca^{2+} puede pasar de un compartimento a otro a través de los tubos conectores de forma tal que al estimularse la apertura de los RyR comenzaría a verse un incremento de Ca^{2+} en el citoplasma y este vaciamiento no sería detectado por el colorante, ya que éste se encuentra concentrado principalmente en el retículo perinuclear, lejos de las proteínas luminales. Este escenario nos permitiría observar la fase 1. Imagen modificada de la referencia [70]

8.6.2. Modelos matemáticos que consideran la difusión de Ca^{2+} en el lumen del RS

Recientemente se han reportado modelos matemáticos que investigan la terminación de las chispas de Ca^{2+} en células cardíacas [84, 85]. Estos modelos consideran la difusión de Ca^{2+} dentro del RS. Los autores resportan que el coeficiente de difusión del Ca^{2+} en el retículo longitudinal de las células cardíacas es de $0.6x10^{-10}$ m^2s^{-1} (cómo previamente ya se había estimado [86], pero consideran que este coeficiente es 5 veces mayor en el retículo de unión (3.5 $x10^{-10}$ m^2s^{-1}) [84, 85]. Esto contrasta con la concentración de CSQ no móvil del RS. Esto es, los autores reportan que la concentración de CSQ en el retículo longitudinal es de 6 mM (como previamente se había estimado [87]), mientras que para el retículo de unión reportan que la concentración de CSQ es de (30 mM). Esta situación es más que contradictoria. La intuición nos dice que una alta concentración de CSQ representaría una barrera de difusión para el Ca^{2+}. Sin embargo, esta aparente contradicción enfatiza la importancia de limitar la competencia entre CSQ y el RyR para que el Ca^{2+} libre alcance una liberación eficiente. Deseo subrayar que con nuestro modelo CbD obtuvimos el mismo resultado disminuyendo el número de sitios de unión a Ca^{2+} conforme disminuye $[Ca^{2+}]_{RS}$.

9. Conclusiones

"Everything must be taken into account. If the fact will not fit the theory —let the theory go."

—Agatha Christie.

The Misterious Affair at Styles.

En este trabajo se ha presentado un enfoque diferente al estándar para modelar la cinética de unión de Ca^{2+} a las proteínas amortiguadoras localizadas en el lumen del RS a través de modelado matemático. Del análisis de las curvas de unión a Ca^{2+} a CSQ se observó que el número máximo de sitios de unión a Ca^{2+} aumenta conforme se eleva el Ca^{2+} en el medio [44]. Dichos resultados los interpretamos como si estuviesen apareciendo nuevos sitios de unión a Ca^{2+} conforme se van ocupando. Esto lo tomamos en cuenta en nuestro modelo de una manera heurística. De dónde resultó que nuestra propuesta nos permitió explicar la gran capacidad del RS para donar Ca^{2+}, la participación de la bomba SERCA en el proceso de liberación, así como el periodo refractario de la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} en el RS. Acorde con esto del presente trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

- La liberación de Ca^{2+} es incompatible con la cinética estándar (modelo CE).

- El modelo de cinética bajo demanda (modelo CbD) es una opción que reproduce la liberación de Ca^{2+}. Este modelo nos permite explicar por qué el retículo es capaz de liberar grandes cantidades de Ca^{2+} al citoplasma sin que disminuya la concentración de Ca^{2+} libre luminal, de esta forma podemos explicar la aparente violación a la ley de conservación de la materia encontrada en el proceso de liberación de Ca^{2+}.

- El modelo CbD establece que la capacidad de almacenar Ca^{2+} dentro del retículo es dependiente de la bomba SERCA y que varía con la concentración de Ca^{2+} libre en dicho compartimento.

- El modelo CbD sugiere que para una liberación eficiente es importante evitar la competencia entre los canales de liberación y las proteínas de unión a Ca^{2+} luminales como calsecuestrina.

- El modelo CbD nos permite regular la cantidad de Ca^{2+} libre luminal de forma independiente de la concentración de Ca^{2+} total en el retículo, esto evita el estrés del retículo.

- El modelo CbD sugiere que la variabilidad celular de los transitorios de Ca^{2+} inducidos por cafeína surge de que el retículo puede ocupar del 1 al 10 % del volumen celular.

- La bomba SERCA, las proteínas luminales y los canales de liberación funcionan como un complejo coordinado.

- El modelo CbD sugiere que la bomba SERCA debe estar activa para una liberación de Ca^{2+} eficiente.

- La liberación de Ca^{2+} genera periodos refractarios, esto sugiere que los estímulos fisiológicos no agotan la reserva de Ca^{2+}.

10. Perspectivas

10.1. El uso de indicadores proteínicos para seguir la dinámica de la polimerización de CSQ dependiente de Ca^{2+}

Una parte crítica de nuestro modelo CbD fue la consideración de que el número de sitios de unión a Ca^{2+} de una proteína amortiguadora de Ca^{2+} llamada CSQ aumentan conforme aumenta el Ca^{2+} en el medio [44]. Si este proceso ocurre durante la liberación de Ca^{2+} se podría observar por medio de la técnica de FRET.

El experimento consistiría en colocar en un extremo de CSQ una proteína fluorescente como CSQ-CFP y en el otro extremo otra proteína fluorescente como CSQ-YFP. De manera tal que al excitar con un láser de determinada longitud de onda por ejemplo CSQ-CFP, cuando CSQ-YFP se encuentre en cercanía porque se está formando el polímero se pueda detectar esta señal por medio del FRET. Para estudiar la depedencia del polímero a Ca^{2+} se realizaría este experimento a diferentes concentraciones de Ca^{2+}. Además, lo interesante sería poder demostrar que la activación del RyR es capaz de deshacer el polímero de CSQ, al reducir la señal de FRET una vez que se aplica cafeína.

10.2. Modulación del flujo de Ca^{2+} del RS hacia el citoplasma

En la sección 8.5 se presentó el curso temporal de los flujos de Ca^{2+} J_1, J_2 y J_3 tanto del modelo CE como del modelo CbD. De ese análisis se pudo observar que en el modelo CbD el flujo J_2 que corresponde al transporte de Ca^{2+} del RS al citoplasma regresa a su valor de estado estacionario una vez que cesa el estímulo de cafeína. Esto es así porque el flujo J_2 es dependiente de $[Ca^{2+}]_{RS}$. El resultado de esto es que la ganacia neta por parte del RS es mínima. Una posible acción a considerar en el futuro es modificar la expresión del flujo J_2 en el modelo CbD. Esto es, para aumentar la ganancia neta del RS una vez que ha terminado el estímulo de cafeína, se tendría que agregar una condición dónde se mantuviera el flujo J_2 igualado a cero hasta que la concentración total de Ca^{2+} en el retículo regrese a su condición inicial. Es decir, el flujo J_2 tendría que estar regulado por

la concentración de Ca^{2+} total y no por la concentración libre de Ca^{2+} luminal. Cómo resultado produciríamos una ganancia neta en el retículo.

Referencias

[1] Guerrero-Hernández A, Dagnino-Acosta A, Verkhratsky A, "An intelligent sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} store: Release and leak channels have differential access to a concealead Ca^{2+} pool," *Cell Calcium*, Vol. 48, pp. 143-149, 2010.

[2] Launikonis B, Zhou J, Royer L, Shannon T, Brum G,Rios E, "Depletion "skraps.ªnd dynamic buffering inside the cellular calcium store," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unitated States of America*, Vol. 103, pp. 2982-2987, 2006.

[3] Gómez-Viquez L, Guerrero-Serna G, Garcia U, Guerrero-Hernandez A, "SERCA pump optimizes Ca2+ release by a mechanism independent of store filling in smooth muscle cells," *Biophysical Journal*, Vol. 85, pp. 370-380, 2003.

[4] Berridge M, Bootman M, Roderick H, "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling," *Nature reviews Molecular cell biology*, Vol. 4, pp. 517-529, 2003.

[5] Falcke M, "Reading the patterns in living cells—the physics of Ca2+ signaling," *Advances in Physics*, Vol. 53, pp. 255-440, 2004.

[6] Carafoli E, "The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 4, pp. 326-332, 2003.

[7] Clapham D, "Calcium signaling," *Cell*, Vol. 80, pp. 259-268, 1995.

[8] Maynard Case R, Einser D, Gurney A, Jones O, Muallem S, Verkhratsky A, "Evolution of calcium homeostasis: From birth of the first cell to an omnipresent signalling system," *Cell Calcium*, Vol. 42, pp. 345-350, 2007.

[9] Berridge M, Bootman M, Lipp P, "Calcium-a life and death signal," *Nature*, Vol. 395, pp. 645-648, 1998.

[10] Nägerl U, Novo D, Mody I, Vergara J, “Binding kinetics of calbindin-D 28k determined by flash photolysis of caged Ca2+,” *Biophysical Journal*, Vol. 79, pp. 3009-3018, 2000.

[11] Flynn E, Bradley K, Muir T, McCarron J, “Functionally separate intracellular Ca2+ stores in smooth muscle,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, pp. 36411-36418, 2001.

[12] Friel D, Chiel H, “Calcium dynamics: analyzing the Ca2+ regulatory network in intact cells,” *Trends in neurosciences*, Vol. 31, pp. 8-19, 2008.

[13] Zhou Z, Neher E, “Mobile and inmobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells,” *The Journal of physiology*, Vol. 469, pp. 245-273, 1993.

[14] Pozzo-Miller L, Pivovarova N, Connor J, Reese T, Andrews S, “Correlated measurements of free and total intracellular calcium concentration in central nervous system neurons,” *Microscopy research and technique*, Vol. 46, pp. 370-379, 1999.

[15] Steenbergen J, Fay F, “The Quantal Nature of Calcium Release to Caffeine in Single Smooth Muscle Cells Results from Activation of the Sarcoplasmic Reticulum Ca-ATPase,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271, pp. 1821-1824, 1996.

[16] Vangheluwe P, Raeymaekers L, Dode L, Wuytack F, “Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications,” *Cell Calcium*, Vol. 38, pp. 291-302, 2005.

[17] Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan D, "Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family calcium pumps,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, pp. 14483–14489, 1992.

[18] Toyoshima C, Nakasako M, Nomura M, Ogawa H, Çrystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 resolution,” *Nature*, Vol. 405, pp. 647–655, 2000.

[19] Toyoshima C, Nomura H, "Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium," *Nature*, Vol. 418, pp. 605–611, 2002.

[20] Guerrero-Hernandez A, Gomez-Viquez L, Guerrero-Serna G, Rueda A, Ryanodine receptor in smooth muscle," *Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library*, Vol. 7, pp. 1676-1688, 2002.

[21] Berridge M, Irvine R, Ïnositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction," *Nature Publishing Group*, Vol. 312, pp. 315-321, 1984.

[22] Dagnino-Acosta A, Guerrero-Hernandez A, "Variable luminal sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} buffer capacity in smooth muscle cells," *Cell Calcium*, Vol. 46, pp. 188–196, 2009.

[23] Fall C, Marland E, Wagner J, Tyson J, "Computational Cell Biology ," *Interdisciplinary Applied Mathematics, Springer*, Vol. 20, 2000.

[24] Lanner J, Georgiou D, Joshi A, Hamilton S Ryanodine receptors: Structure, Expression, Molecular details, and Function in Calcium Release," *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Vol. 11, pp. a003996, 2010.

[25] Yan Z, Bai X, Yan C, Wu J, Li Z, Xie T, Peng W, Yin C, Li X, Scheres S, Shi Y, Yan N, "Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution," *Nature*, Vol. 517, pp. 50-55, 2015.

[26] Gyorke S, Fill M, Ryanodine Receptors Adaptation: Control Mechanism of Ca^{2+}-Induced Ca^{2+} release in heart," *Science*, Vol. 260, pp. 807-809, 1993.

[27] Collier M, Ji G, Wang Y, Kotlikoff M, Çalcium-Induced Calcium Release in Smooth Muscle Loose Coupling between the Action Potential and Calcium Release," *The Journal of general physiology*, Vol. 115, pp. 653-662, 2000.

[28] Rosseau E, Meissner G, "Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+-release channel: activation by caffeine," *Cold Am Physiological Soc*, Vol. 256, pp. H328-H33, 1989.

[29] Saiki Y, Ikemoto N, Çoordination between Ca2+ release adn subsequent re-uptake in the sarcoplasmic reticulum," *Biochemistry*, Vol. 38, pp. 3112-3119, 1999.

[30] Aguilar M, Gomez V, Garcia L, Del Angel R, Arias M, Guerrero H, "Histamine potentiates IP3-mediated Ca2+ release via thapsigargin-sensitive Ca2+ pumps," *Cellular Signaling*, Vol. 15, pp. 689-697, 2003.

[31] Zhou Y, Song L, Lakatta E, Xiao R, Cheng H, Çonstitutive β2-adrenergic signalling enhances sarcoplasmic reticulum Ca2+ cycling to augment contraction in mouse heart," *The Journal of Physiology*, Vol. 521, pp. 351-361, 1999.

[32] Gomez-Viquez N, Guerrero-Serna G, Arvizu F, García U, Guerrero-Hernandez A, "Inhibition of SERCA pumps induces desynchronized RyR activation in overloaded internal Ca^{2+} stores in smooth muscle cells," *Am J Physiol Cell Physiology*, Vol. 298, pp. 1038-1046, 2010.

[33] Mathias R, Cohen I, Oliva C, "Limitations of the whole cell patch technique in the control of intracellular concentrations," *Biophysical Journal*, Vol. 58, pp. 759-770, 1990.

[34] Neher E, "The influence of intracellular calcium concentration on degranulation of dialysed mast cells from rat peritoneum," *The Journal of physiology*, Vol. 395, pp. 193-214, 1988.

[35] Neher E, "The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes," *Neuropharmacology*, Vol. 34, pp. 1423-1442, 1995.

[36] Mogami H, Gardner J, Gerasimenko O, Camello P, Petersen O, Tepikin A, "Calcium binding capacity of the cytosol and endoplasmic reticulum of mouse pacreatic acinar cells," *The Journal of physiology*, Vol. 518, pp. 463-467, 1999.

[37] Neher E, Augustine G, "Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells," *The Journal of physiology*, Vol. 450, pp. 273-301, 1992.

[38] Neher E, Taschenberger H, “Transients in global Ca2+ concentration induced by electrical activity in a giant nerve terminal,” *The Journal of physiology*, Vol. 591, pp. 3189-3195, 2013.

[39] Guerrero A, Singer J, Fay F, "Simultaneous Measurement of Ca2+ Release and Influx into Smooth Muscle Cells in Response to Caffeine. A novel approach for calculating the fraction of current carried by calcium,” *The Journal of General Physiology*, Vol. 104, pp. 395-422, 1994.

[40] Manno C, Sztretye M, Figueroa L, Allen P, Ríos E, "Dynamic measurement of the calcium buffering properties of the sarcoplasmic reticulum in mouse skeletal muscle,” *The Journal physiology*, Vol. 591, pp. 423-442, 2013.

[41] Hodgkin A, Keynes R, “Movements of labelled calcium in squid giant axons,” *The Journal of physiology*, Vol. 138, pp. 253-281, 1957.

[42] Kao J, Tsien R, “Ca2+ binding kinetics of fura-2 and azo-1 from temperature-jump relaxation measurements,” *Biophysical Journal*, Vol. 53, pp. 635-639, 1988.

[43] Santillan M, “Chemical kinetics, Stochastic Processes, and Irreversible Thermodynamics,” *Springer*, 2014.

[44] Park H, Park I, Kim E, Youn B, Fields K, Dunker A, and C. Kang “Comparing Skeletal and Cardiac Calsequestrin Structures and Their Calcium Binding,” *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 17, pp. 8026−18033, 2004.

[45] Zima A V, Picht E,Bers D M, Blatter L A, “Termination of Cardiac Ca^{2+} Sparks. Role of Intra-SR [Ca^{2+}], Release Flux, and Intra-SR Ca^{2+} Diffusion,” *Circulation Research*, Vol. 103, pp. 105−115, 2008.

[46] Perez-Rosas NC, Gomez-Viquez NL, Dagnino-Acosta A, Santillan Moises and Guerrero-Hernandez A, “Kinetics on Demand Is a Simple Mathematical Solution that Fits Recorded Caffeine-Induced Luminal SR Ca^{2+} Changes in Smooth Muscle Cells,” *PLoS ONE*, Vol. 10, pp. e0138195, 2015.

[47] Barrero M J, Montero M, Alvarez J, “Dynamics of [Ca2+] in the endoplasmic reticulum and cytoplasmic of intact HeLa cells: A COMPARATIVE STUDY,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, pp. 27694–27699, 1997.

[48] Lukyanenko V, Györke I, Györke S. Regulation of calcium release by calcium inside the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes,” *Eur J Physiol*, Vol. 432, pp. 1047-1054, 1996.

[49] Terentyev D, Kubalova Z, Valle G, Nori A, Vedamoorthyrao S, Terentyeva R, Viatchenko-Karpinski S, Bers M D, Williams S C, Volpe P and Gyorke S, "Modulation of SR Ca release by luminal Ca and calsequestrin in cardiac myocytes: effects of CSQ2 mutations linked to sudden cardiac death,” *Biophysical Journal*, Vol. 95, pp. 2037-2048, 2008.

[50] Hussain A, Inesi G, Ïnvolment of Sarco/endoplasmic Reticulum Ca2+ ATPases in Cell Function and the Celular Consecuences of Their Inhibition,” *The Journal of Membrane Biology*, Vol. 172, pp. 91-99, 1999.

[51] Ikemoto N, Antoniu B, Kang J J, Mészáros L G, Ronjant M, Ïntravesicular Calcium Transient During Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum,” *Biochemistry*, Vol. 30, pp. 5230-5237, 1991.

[52] Ikemoto N, Yamamoto T, "The luminal Ca2+ transient controls Ca2+ release/reuptake of sarcoplasmic reticulum,” *Biochemical and biophysical research comunications*, Vol. 279, pp. 858-863, 2000.

[53] Lee M, Xu X, Zeng W, Diaz J, Kuo T, Wuytack F, Racymaekers L, Muallem S, "Polarized expression of Ca^{2+} pumps in pancreatic and salivary glands cells: role in initiation and propagation of $[Ca^{2+}]_i$ waves,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, pp. 15765-15770, 1997.

[54] RossiF, Kao J, "Nmoc-DBHQ, a new caged molecule for modulating sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase activity with light flashes," *Journal of Biologcial Chemistry*, Vol. 272, pp. 3266-3271, 1997.

[55] Keller M, Kao J, Egger M, Niggli E, Çalcium waves driven by "sensitizacion"wavefronts," *Cardiovascular research*, Vol. 74, pp. 39-45, 2007.

[56] Klipp E, Liebermeister W, Wierling C, Kowald A, Lehrach H, Herwig R, "Systems Biology," *John Wiley & Sons*, 2013.

[57] Zill D, "A first course in differential equations with modelling applications," *Cengage Learning*, 2012.

[58] Wirkus S, Swift R, "A course in ordinary differential equations," *CRC Press*, 2006.

[59] Keener J, Sneyd J, "Mathematical Physiology," *Springer*, 1998.

[60] MacLennan D, Rice J, Green N, "The mechanisms of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum cA2+-ATPase," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, pp. 28815-28818, 1997.

[61] Houart G, Dupont G, Goldbeter A, "Bursting, Chaos and Birhythmicity Originating from Self-modulation of the Inositol 1,4,5-triphosphate Signal in a Model for Intracellular Ca2+ Oscillations," *Bulletin of Mathematical Biology*, Vol. 61, pp. 507-530, 1999.

[62] Atri A, Amundson J, Clapham D, Sneyd J, "A Single-Pool Model for Intracellular Calcium Oscillations and Waves in the Xenopus laevis Oocyte," *Biophysical Journal*, Vol. 65, pp. 1727-1739, 1993.

[63] De Young G, Keizer J, "A single-pool inositol 1,4,5-triphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca2+ concentration," *Biophysics*, Vol. 89, pp. 9895-9899, 1992.

[64] Dupont G, Berridge M, Goldbeter A, “Signal-induced Ca2+ oscillations: properties of a model based on Ca2+-induced Ca2+ release,” *Cell Calcium*, Vol. 12, pp. 73-85, 1991.

[65] Mathews J, Fink K, “Numerical Methods using MATLAB,” *Prentice Hall Upper Saddle River, NJ*, 1999.

[66] Cheng H, Lederer W, “Calcium Sparks,” *Physiology Review*, Vol. 88, pp. 1491-1545, 2008.

[67] Nguyen T, Chin W, "Verdugo. P. (1998) Role of Ca2+/K+ ion exchange in intracellular storage and release of Ca2+,” *Nature*, Vol. 395, pp. 908-912, 1998.

[68] Gomez-Viquez N, "Modulación de la liberación de Ca^{2+} por las ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico en las células de músculo liso,” *Tesis Doctoral*, México, DF, 2003.

[69] Gillespie D, Chen D, Fill M, “Is ryanodine receptor a calcium or magnesium channel? Roles of K+ and Mg2+ during Ca2+ release,” *Cell calcium*, Vol. 51, No. 4, pp. 427-433, 2012.

[70] Laporte R, Hui A, Laher I, “Pharmacological Modulation of Sarcoplasmic Reticulum Function in Smooth Muscle,” *Pharmacological Reviews*, Vol. 56, No. 6, pp. 439-513, 2004.

[71] Havlin S, Buldyrev S, Goldberger A, Mantegna R, Ossadnik S, Peng C, Simons M, Stanley H, “Fractals in biology and medicine,” *Chaos, Solitons & Fractals*, Vol. 6, pp. 171-201, 1995.

[72] Kirber M, Guerrero-Hernandez A, Bowman D, Fogarty K, Tuff R, Singer J, Fay S, "Multiple pathways responsible for the stretch-induced increase in Ca2+ concentration in toad stomach smooth muscle cells,” *The journal of physiology*, Vol. 524, pp. 3-17, 2000.

[73] Santillan M, “On the use of the Hill Functions in Mathematical Models of Gene Regulatory Networks,” *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, Vol. 3, pp. 85-97, 2008.

[74] Sala F, Hernandez-Cruz A, Çalcium diffusion modeling in a spherical neuron. Relevance of buffering properties,” *Biophysical Journal*, Vol. 57, pp. 313-324, 1990.

[75] Roberts WM, "Localization of calcium signal by a mobile calcium buffer in frog saccular hair cells,” *The journal of neuroscience*, Vol. 14, pp. 3246-3262, 1994.

[76] Lee JS, Kim MH, Ho WK, Lee SH, "Presynaptic release probability and readility releasable pool size are regulated by two independent mechanisms during posttetanic potentiation at the calyx of Held synapse,” *The journal of neuroscience*, Vol. 28, pp. 7945-7953, 2008.

[77] Kumar A, Chakravarty H, Bal N, Balaraju T, Jena N, Misra G, Bal C, Pieroni E, Periasamy M, Sharon A, Ïdentification of calcium binding sites on calsequestrin and their implications for polymerization,” *Molecular bioSystems*, Vol. 9, pp. 1949-1957, 2013.

[78] Maxwell JT, Blatter LA, "Facilitation of cytosolic calcium wave propagation by local calcium uptake into the sarcoplasmic reticulum in cardiac myocytes,” *The Journal of physiology*, Vol. 590, pp. 6037-6045, 2012.

[79] Canato M, Scorzeto M, Giacomello M, Protasi F, Reggiani C, Stienen GJM, "Massive alterations of sarcoplasmic reticulum free calcium in skeletal muscle fibers lacking calsequestrin revealed by a genetically encoded probe,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 107, pp. 22326-22331, 2010.

[80] Meszaros LG, Ikemoto N, Çonformational changes of the Ca2+ATPase as early events of Ca2+ release from sarcoplasmic reticulum,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 206, pp. 16076-16079, 1985.

[81] Ikemoto N, Ronjat M, Meszaros LG, Koshita M, "Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum," *Biochemistry*, Vol. 28, pp. 6764-6771, 1989.

[82] Chen W, Wang R, Chen B, Zhong X, Kong H, Bai Y, Zhou Q, Xie C, Zhang J, Guo A, et al, "The ryanodyne receptor store-sensing gate controls Ca2+ waves and Ca2+-triggered arrythmias," *Nature medicine*, Vol. 20, pp. 184-192, 2014.

[83] Lambert DG, Çalcium signaling protocols," *Springer Science & Business Media*, Vol. 312, 2006.

[84] Laver DR, Kong CHT, Imtiaz MS, Cannell MB, "Temination of calcium-induced calcium release by induction decay: an emergent property os stochastic channel gating and molecular scale architecture," *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 54, pp. 98-100, 2013.

[85] Cannell MB, Kong CHT, Imtiaz MS, Laver DR, Çontrol of sarcoplasmic reticulum Ca2+ release by stochastic RyR gating within a 3D model of the cardiac dyad and importance of induction decay for CICR termination," *Biophysical Journal*, Vol. 104, pp. 2149-2159, 2013.

[86] Wu X, Bers DM, "Sarcoplasmic Reticulum and Nuclear Envelope Are One Highly Interconnected Ca^{2+} Store Throughout Cardiac Myocyte," *Circulation Research*, Vol. 99, pp. 283-291, 2006.

[87] Murphy RM, Mollica JP, Bear NA, Knollmann BC, Lamb GD, "Quantification of calsequestrin 2 (CSQ2) in sheep cardiac muscle and Ca2+-binding protein changes in CSQ2 knockout mice," *American journal of physiology*, Vol. 300, pp. H595-H604, 2011.

Apéndices

A. Deducción de la expresión de la probabilidad de apertura del RyR

Se ha reportado que la probabilidad de apertura (Po por sus siglas en inglés) incrementa cuando los iones de Ca^{2+} se unen del lado citoplásmico del receptor; un proceso que es conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR por sus siglás en inglés) [26, 27, 70]. Hay que mencionar, además que en este trabajo se ha usado cafeína [Caf] para incrementar la afinidad de los RyRs por Ca^{2+}, de forma tal que los receptores se abren cuando el Ca^{2+} se encuentra a niveles basales [28]. Con el objetivo de obtener la expresión de la probabilidad de apertura del RyR propusimos que cada una de las cuatro subunidades del receptor tiene sitios de unión a Ca^{2+} y a cafeína y que éstas moléculas interactúan cooperativamente (k_F) cuando están unidas. Así mismo se definieron los siguientes estados para una subunidad (S_2) del RyR: S_2 es el estado cuando los dos sitios de la subunidad del RyR se encuentran libres, no hay ni Ca^{2+} ni cafeína; S_{2Ca} es el estado en el cual la subunidad está unida a Ca^{2+} y el otro sitio se encuentra libre; S_{2Caf} es el estado en el cual la subunidad está unida a cafeína y el otro sitio se encuentra libre; S_{2CaCaf} es el estado en el cual la subunidad está unida tanto a Ca^{2+} como a cafeína. Las reacciones que describen las transiciones entre estos estados se muestan a continuación:

$$[S_2] + [Ca^{2+}]_i \underset{k_{-C}}{\overset{k_C}{\rightleftharpoons}} [S_{2Ca}],$$

$$[S_{2Ca}] + [Caf] \underset{k_{-F'}}{\overset{k_F k_{F'}}{\rightleftharpoons}} [S_{2CaCaf}],$$

$$[S_2] + [Caf] \underset{k_{-F'}}{\overset{k_{F'}}{\rightleftharpoons}} [S_{2Caf}],$$

$$[S_{2Caf}] + [Ca^{2+}]_i \underset{k_{-C}}{\overset{k_F k_C}{\rightleftharpoons}} [S_{2CaCaf}],$$

dónde k_C, k_{-C}, $k_{F'}$ y $k_{-F'}$ son respectivamente las constantes de velocidad de asociación y disociación de la subunidad del RyR con Ca^{2+} y cafeína. El parámetro k_F denota la cooperatividad entre Ca^{2+} y cafeína cuando están unidos a la subunidad del RyR. En el equilibrio y utilizando la ley de acción de masas de la primera reacción se obtiene la ecuación (40):

$$k_C[S_2][Ca^{2+}]_i = k_{-C}[S_{2Ca}]. \tag{40}$$

De todas las reacciones, nos interesa saber cuando el Ca^{2+} esta unido a la subunidad del RyR independientemente de si cafeína está no interaccinando con la subunidad del RyR, por lo tanto de la ecuación (40) se despeja $[S_{2Ca}]$

$$\begin{aligned}[S_{2Ca}] &= \frac{k_C}{k_{-C}}[S_2][Ca^{2+}]_i \\ &= [S_2]\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C},\end{aligned} \tag{41}$$

dónde $K_C = k_{-C}/k_C$ es la constante de disociación de la subunidad del RyR y Ca^{2+}. En el equilibrio y utilizando la ley de acción de masas de la segunda reacción se tiene:

$$k_F k_{F'}[S_{2Ca}][Caf] = k_{-F'}[S_{2CaCaf}]. \tag{42}$$

Interesados en conocer la $[S_{2CaCaf}]$ de la ecuación (42) y sustituyendo la expresión de la ecuación (41) se obtiene:

$$\begin{aligned}[S_{2CaCaf}] &= k_F\frac{k_{F'}}{k_{-F'}}[S_{2Ca}][Caf] \\ &= k_F\frac{[S_{2Ca}][Caf]}{K_F} \\ &= k_F[S_2]\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}\frac{[Caf]}{K_F},\end{aligned} \tag{43}$$

dónde $K_F = k_{-F'}/k_{'F}$ es la constante de disociación de la subunidad del RyR con cafeína. En el equilibrio y utilizando la ley de acción de masas de la tercera reacción se obtiene la ecuación (44):

$$k_{F'}[S_2][Caf] = k_{-F'}[S_{2Caf}]. \tag{44}$$

Interesados en conocer la $[S_{2Caf}]$ de la ecuación (44) se obtiene

$$\begin{aligned}[S_{2Caf}] &= \frac{k_{F'}}{k_{-F'}}[S_2][Caf] \\ &= [S_2]\frac{[Caf]}{K_F}.\end{aligned} \tag{45}$$

En el equilibrio y utilizando la ley de acción de masas de la cuarta reacción se obtiene la ecuación (46):

$$k_F k_C[S_{2Caf}][Ca^{2+}]_i = k_{-C}[S_{2CaCaf}]. \tag{46}$$

Interesados en conocer la $[S_{2Caf}]$ de la ecuación (46) se obtiene la ecuación (47)

$$\begin{aligned}[S_{2CaCaf}] &= k_F\frac{k_C}{k_{-C}}[S_{2Caf}][Ca^{2+}]_i \\ &= k_F[S_{2Caf}]\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C} \\ &= k_F[S_2]\frac{[Caf]}{K_F}\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}.\end{aligned} \tag{47}$$

Por ley de conservación de la materia, la concentración total de la subunidad del RyR $[S]_{2T}$ estará determinada por:

$$[S_2]_T = [S_2] + [S_{2Ca}] + [S_{2Caf}] + [S_{2CaCaf}]. \tag{48}$$

Sustituyendo las ecuaciones (41), (45) y (47) en (48), se obtiene la ecuación (49):

$$[S_2]_T = [S_2] + [S_2]\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C} + [S_2]\frac{[Caf]}{K_F} + k_F[S_2]\frac{[Caf]}{K_F}\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}. \tag{49}$$

Si se desea conocer la probabilidad de que haya Ca^{2+} unido a un sitio de la subunidad independientemente del estado del sitio de unión a cafeína se obtiene:

$$\frac{[S_{2Ca}]+[S_{2CaCaf}]}{[S_2]_T} = \frac{[S_2]\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C} + k_F[S_2]\frac{[Caf]}{K_F}\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}}{[S_2]+[S_2]\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}+[S_2]\frac{[Caf]}{K_F}+m[S_2]\frac{[Caf]}{K_F}\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}}$$
$$= \frac{\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C} + k_F\frac{[Caf]}{K_F}\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}}{1+\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}+\frac{[Caf]}{K_F}+k_F\frac{[Caf]}{K_F}\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}}$$
$$= \frac{\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}(1+k_F\frac{[Caf]}{K_F})}{1+\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}(1+k_F\frac{[Caf]}{K_F})+\frac{[Caf]}{K_F}}. \quad (50)$$

Si proponemos que $k_F > 1$, $[Caf]/K_F \ll 1$ y $k_f = k_F/K_F$ y los utilizamos en la ecuación (50) obtenemos la ecuación (51):

$$P_o = \frac{[S_{2Ca}]+[S_{2CaCaf}]}{[S_2]_T} = \frac{[Ca^{2+}]_i(1+k_f[Caf])}{K_C+[Ca^{2+}]_i(1+k_f[Caf])}. \quad (51)$$

Considerando que el Ca^{2+} necesita estar unido a todas las subunidades para inducir la apertura del RyR y además que hay cooperatividad entre las subunidades [73], la probabilidad de apertura puede ser reescrita como la ecuación (52):

$$P_o = \frac{[[Ca^{2+}]_i(1+k_f[Caf])]^{n_f}}{K_C^{n_f}+[[Ca^{2+}]_i(1+k_f[Caf])]^{n_f}}, \quad (52)$$

dónde n_f es un coeficiente de Hill. Con el propósito de conocer cómo se comporta la P_o con respecto a Ca^{2+} en presencia y ausencia de cafeína utilizamos la ecuación (52) y observamos su comportameinto. En la Figura 39 muestra la probabilidad de apertura P_o del RyR en presencia de Ca^{2+} (línea azul) y de Ca^{2+} con una concentración de cafeína de 20 mM (línea roja). Note que en presencia de cafeína la concentración de Ca^{2+} que se requiere para alcanzar el 50 % de la P_o del RyR es menor.

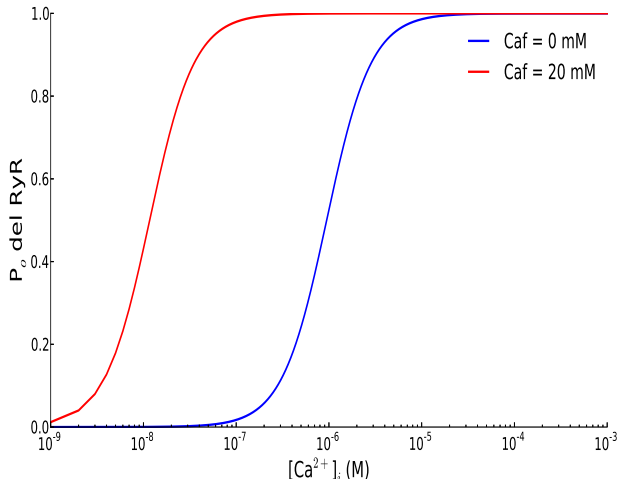

Figura 39: La probabilidad de apertura del RyR como función de la concentración de Ca^{2+}. La curva fue generada en un rango de 1 nM a 1 mM de $[Ca^{2+}]$ y una concentración de cafeína de 20 mM. Los valores de parámetros utilizamos son los siguientes: n_f = 1.8, K_C=945 nM, k_f=4.

B. Análisis de estabilidad de los dos modelos

Este apéndice esta dedicado a la simulación de las trayectorias de los sistemas de EDO tanto del modelo CE como del modelo CbD. A través de estas trayectorias nosotros podemos obtener información cualitativa acerca del comportamiento del sistema.

En las Figuras 40 y 41 se muestra el plano fase tanto del modelo CE como del modelo CbD, en el intervalo comprendido entre 6.75-8.25 μM para la $[Ca^{2+}]_{Ti}$ y entre 1.48-1.81 mM para la $[Ca^{2+}]_{TRS}$.

Utilizando el software XPPAUT obtuvimos las nullclines (líneas punteadas) para ambos modelos. Las nullclines son las curvas obtenidas cuando d$[Ca^{2+}]_{Ti}$/dt=0 y d$[Ca^{2+}]_{TRS}$/dt=0. La intersección de ambas nullclines es un punto de equilibrio. El cual para ambos sistemas corresponde al punto (7.5 μM, 1.65 mM). Las trayectorias fueron obtenidas al variar las condiciones iniciales ($\pm$ 10 % del punto de equilibrio). Los eigenvalores correspondientes al punto de equilibrio para el modelo CE son λ_1 =-0.3659 y λ_2=0.07302 y para el modelo CbD λ_1 =-0.3542 y λ_2=7.3967e-5.

Los eigenvalores del sistema guardan una estrecha relación con los puntos fijos ya que determinan la forma en que las trayectorias interactúan con el punto de equilibrio. En este sentido, el punto de equilibrio (7.5 μM, 1.65 mM) es un nodo. Es decir, este es un punto tal que en sus proximidades todas las trayectorias entran a él. Es asintóticamente estable si las trayectorias están direccionadas al punto lo que sucede si los eigenvalores son reales, negativos y distintos entre si. De aqui que para ambos modelos, el punto de equilibrio es asintóticamente estable.

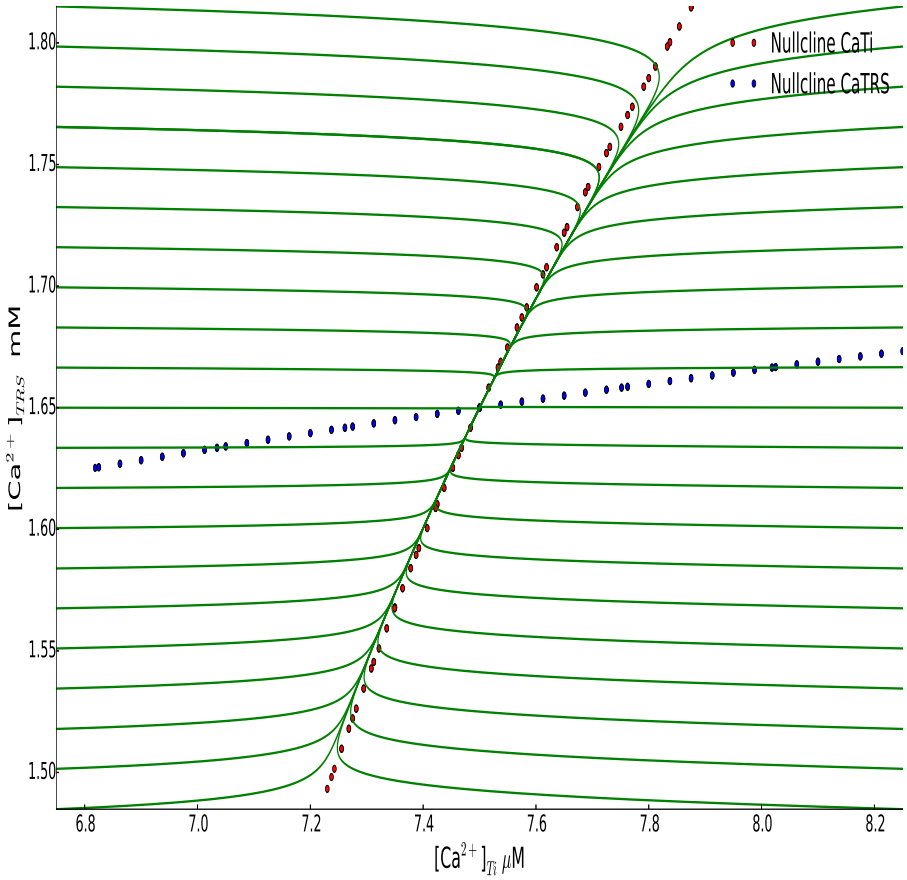

Figura 40: Plano fase del modelo CE. La gráfica muestra las trayectorias solución (líneas color verde) junto con las curvas isóclinas (nullcline) del sistema (líneas punteadas).

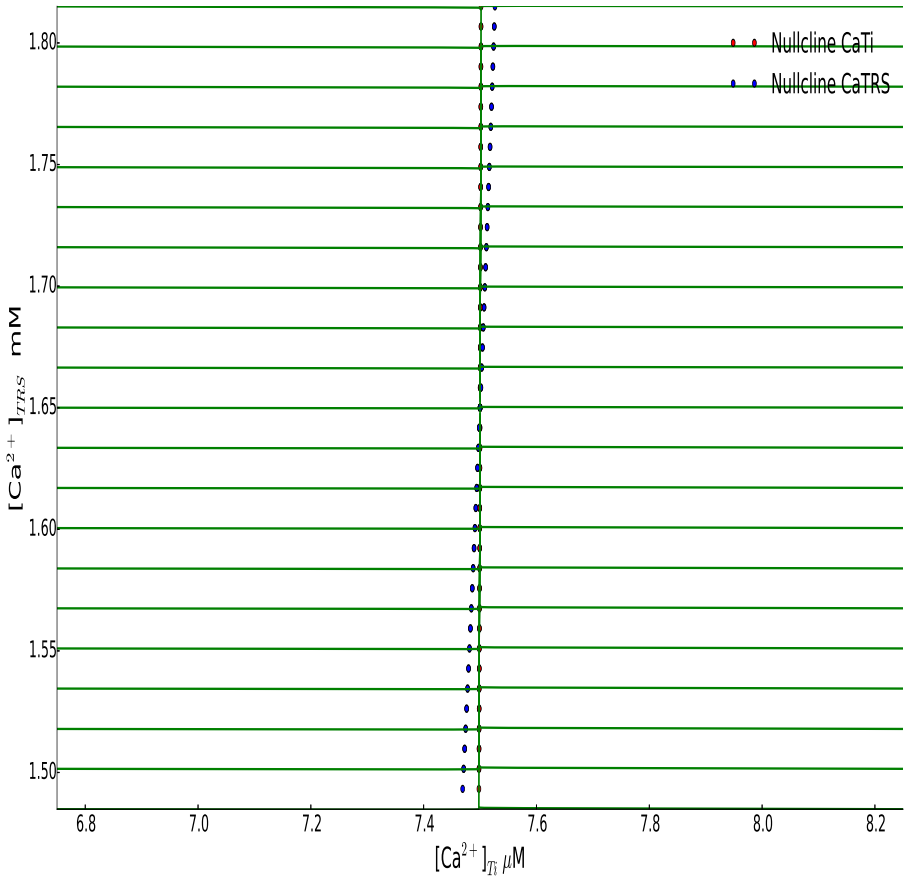

Figura 41: Plano fase del modelo CbD. La gráfica muestra las trayectorias solución (líneas color verde) junto con las curvas isóclinas (nullcline) del sistema (líneas punteadas).

C. Valores de los parámetros

Parámetro	20 mM de cafeína[a]	2 mM de cafeína	TG+20 mM de cafeína
a	35 s^{-1}	35 s^{-1}	35 s^{-1}
b	72.2 s^{-1}	72.2 s^{-1}	72.2 s^{-1}
c	11.25 μM/s	11.25 μM/s	11.25 μM/s
$[Ca^{2+}]_i$	75 nM	75 nM	75 nM
γ	1-10 %	1-10 %	1-10 %
n_v	1.7	1.7	1.7
K_s	300 nM	300 nM	300 nM
n_s	2	2	2
β	100	100	100
n_F	1.8	1.8	1.8
k_f	4 mM^{-1}	4 mM^{-1}	**0.3 mM^{-1}**
[Cafeína]	20 mM	**2 mM**	20 mM
$[Ca^{2+}]_{TRS}$	1.65 mM	1.65 mM	**0.75 mM**
$[Ca^{2+}]_{RS}$	150 μM	150 μM	150 μM
K_R	151.1 μM	151.1 μM	151.1 μM
Tapsigargina	0	0	**1**
Calsecuestrina	10	10	**4**

Tabla 1: **Valores de los parámetros**. La tabla muestra los valores de los parámetros utilizados para generar las simulaciones de variabilidad celular de los transitorios de la $[Ca^{2+}]_i$ para las condiciones control (20 mM de cafeína), baja concentración de cafeína (2 mM) y la inhibición de la bomba SERCA con tapsigargina. La descripción de los parámetros se puede encontrar en la sección 7.3.

[a] a=60 s^{-1}, b=65 s^{-1} y c=0.75 μM/s para el transitorio de Ca^{2+} de la Figura 26

D. Artículo publicado

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Kinetics on Demand Is a Simple Mathematical Solution that Fits Recorded Caffeine-Induced Luminal SR Ca^{2+} Changes in Smooth Muscle Cells

Norma C. Perez-Rosas[1], Norma L. Gomez-Viquez[2], Adan Dagnino-Acosta[3], Moises Santillan[1], Agustín Guerrero-Hernandez[4]*

1 Unidad Monterrey, Cinvestav, Apodaca, Nuevo Leon, Mexico, **2** Departamento de Farmacobiología, Unidad Sur, Cinvestav, Mexico City, Mexico, **3** Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, Colima, Colima, Mexico, **4** Departamento de Bioquímica, Cinvestav, Mexico City, Mexico

* aguerrero@cinvestav.mx

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Perez-Rosas NC, Gomez-Viquez NL, Dagnino-Acosta A, Santillan M, Guerrero-Hernandez A (2015) Kinetics on Demand Is a Simple Mathematical Solution that Fits Recorded Caffeine-Induced Luminal SR Ca^{2+} Changes in Smooth Muscle Cells. PLoS ONE 10(9): e0138195. doi:10.1371/journal.pone.0138195

Editor: Derek Laver, University of Newcastle, AUSTRALIA

Received: April 15, 2015

Accepted: August 27, 2015

Published: September 21, 2015

Copyright: © 2015 Perez-Rosas et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. The mathematical model was deposited in Biomodels Database and assigned the identifier MODEL 1406180001.

Funding: This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (MX) grant 128735 to AGH and grant 266919 to NCPR (http://www.conacyt.mx/). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

The process of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum (SR) comprises 4 phases in smooth muscle cells. Phase 1 is characterized by a large increase of the intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) with a minimal reduction of the free luminal SR $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_{FSR}$). Importantly, active SR Ca^{2+} ATPases (SERCA pumps) are necessary for phase 1 to occur. This situation cannot be explained by the standard kinetics that involves a fixed amount of luminal Ca^{2+} binding sites. A new mathematical model was developed that assumes an increasing SR Ca^{2+} buffering capacity in response to an increase of the luminal SR $[Ca^{2+}]$ that is called Kinetics-on-Demand (KonD) model. This approach can explain both phase 1 and the refractory period associated with a recovered $[Ca^{2+}]_{FSR}$. Additionally, our data suggest that active SERCA pumps are a requisite for KonD to be functional; otherwise luminal SR Ca^{2+} binding proteins switch to standard kinetics. The importance of KonD Ca^{2+} binding properties is two-fold: a more efficient Ca^{2+} release process and that $[Ca^{2+}]_{FSR}$ and Ca^{2+}-bound to SR proteins ($[Ca^{2+}]_{BSR}$) can be regulated separately allowing for Ca^{2+} release to occur (provided by Ca^{2+}-bound to luminal Ca^{2+} binding proteins) without an initial reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$.

Introduction

The main internal Ca^{2+} store is the sarcoplasmic reticulum (SR) in muscle cells and the endoplasmic reticulum (ER) in non-muscle cells. These membrane organelles are distributed throughout the cell and are endowed with three main elements 1) SERCA pumps, 2) different types of Ca^{2+} release channels [Ryanodine or inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (RyRs and IP_3Rs, respectively)], and 3) luminal Ca^{2+}-binding proteins (calsequestrin or calreticulin). All these different types of proteins produce and modulate Ca^{2+} release events that can be either localized in nature or traveling Ca^{2+} waves [1].

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

SERCA pumps refill internal Ca^{2+} stores via ATP hydrolysis [2]. These ATPases are regulated by the free luminal SR/ER $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_{FSR}$) and by different type of proteins [3]. Although the role of SERCA pumps in Ca^{2+} refilling of SR stores is well established, there are also data indicating that SERCA pumps facilitate Ca^{2+} release by a mechanism unrelated to the replenishment of internal Ca^{2+} stores [4]. Ikemoto´s group has shown that activation of RyRs produces an increase in the turnover rate of SERCA pumps before any reduction in the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ [5]. Additionally, they have found that low concentrations of polylysine that activate a small number of RyRs, can induce an initial increase in the luminal SR Ca^{2+} level [6] and activation of SERCA pumps [5,7]. In pancreatic acinar cells, it was shown that inhibition of SERCA pumps with thapsigargin decreases the rate of Ca^{2+} release and eliminates $[Ca^{2+}]_i$ gradients before any reduction of the ER Ca^{2+} store [8]. More recently, it was reported that rapid inhibition of SERCA pumps by UV-mediated uncaging of thapsigargin produces a significantly slower Ca^{2+} wave in heart cells [9]. In HeLa cells, the rapid inhibition of SERCA pumps to avoid any reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$, reduces the histamine-induced potentiation of IP_3-induced Ca^{2+} release [10]. In smooth muscle cells, thapsigargin decreases the amplitude and the rate of rise of caffeine- and carbachol-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses [4,11]. Moreover, inhibition of SERCA pumps decreased the coordinated Ca^{2+} release process even in overloaded Ca^{2+} stores of smooth muscle cells [12]. Interestingly, there is also evidence that increased activity of SERCA pumps enhances Ca^{2+} release. For instance, $RGS2^{-/-}$ knockout displayed facilitation in the agonist-induced Ca^{2+} release, but due to increased expression of SERCA pump instead of the expected, but absent, larger IP_3 production [13]. Overexpression of β adrenoceptors increases both SERCA pump activity and Ca^{2+} spark frequency in heart cells, in the absence of an overloaded SR Ca^{2+} store [14]. Collectively, these data suggest that SERCA pumps play an important role not only in refilling internal Ca^{2+} stores but also, in facilitating activation of release channels.

SR and ER also contain a large variety of proteins that bind Ca^{2+} with low affinity and high capacity, for instance calsequestrin and calreticulin. Interestingly, the Ca^{2+} buffer capacity of calsequestrin increases with the degree of polymerization, from monomer to dimer and to polymer [15]. These characteristics of calsequestrin suggest a possible explanation for the observation that SR and ER are able to supply large quantities of Ca^{2+} with minimal reductions in the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ [11,16–19] i.e. the transition from dimer to monomer, for instance, releases a large quantity of Ca^{2+} with minimal modification of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ [15]. The presence of these concealed sources of Ca^{2+} is evident in cardiac cells as well, because the overexpression of calsequestrin containing a point mutation ($CASQ2^{R33Q}$) produces Ca^{2+} sparks of larger amplitude, although the SR seems to be partially depleted because a reduced resting $[Ca^{2+}]_{FSR}$ is observed [20]. Additionally, the reduction in the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ is similar for the smaller Ca^{2+} sparks than for the larger Ca^{2+} waves [17]. All these data imply that the change in $[Ca^{2+}]_{FSR}$ cannot be correlated with the total amount of Ca^{2+} released by the SR so we have hypothesized that there is a concealed source of luminal Ca^{2+} for release channels [16].

Since it is not feasible yet to look simultaneously at both $[Ca^{2+}]_{FSR}$ and the amount of Ca^{2+}-bound to luminal proteins ($[Ca^{2+}]_{BSR}$), to test this hypothesis a simple deterministic mathematical model was developed, in order to understand how release channels (particularly RyRs), luminal SR proteins and SERCA pumps work together to facilitate Ca^{2+} release in smooth muscle cells. This new model suggests that luminal SR Ca^{2+} binding proteins are working different to what it is commonly believed, since the number of apparent Ca^{2+} binding sites increases as a function of the free luminal SR $[Ca^{2+}]$, this situation we have called Kinetics on Demand (KonD), and requires active SERCA pumps to have an efficient Ca^{2+} release event.

Materials and Methods

Ethics statement on animal use

All animal care and experimental procedures were performed in compliance with the Mexican Official Norm for the Use and Care of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999) and the protocol was approved by the local Ethics Committee on Animal Experimentation (CICUAL-Cinvestav) with the reference number 0306–06 and renewed with the reference number 0131–15. Animals were bred and housed in Cinvestav Animal facility with clean air and controlled both light and temperature. Food and water was given ad libitum. Precautions were implemented to minimize animal use and reduce pain and distress.

Cell isolation and $[Ca^{2+}]_i$ recordings

Male albino guinea pigs of 400 to 490g weight (all from Cinvestav animal facility) were killed by decapitation followed by exsanguination. Single smooth muscle cells were isolated from guinea pig urinary bladder and loaded with fura-2 to record $[Ca^{2+}]_i$ as previously reported [4]. Simultaneous recording of the $[Ca^{2+}]_i$ and the free luminal SR Ca^{2+} level ($[Ca^{2+}]_{FSR}$) in these cells was carried out using fura-2 and Mag-Fluo-4, respectively; as previously described [16]. Ca^{2+} release was induced by application of 2 or 20 mM caffeine with a puffer pipette [4]. Inhibition of SERCA pump with short pulses of thapsigargin was carried out as previously described [4]. The development of the mathematical model is described below.

Model development

For the purpose of the present model we have considered that smooth muscle cells consist of two compartments: the cytoplasm and the SR (S1 Fig), and $[Ca^{2+}]_{Ti}$ and $[Ca^{2+}]_{TSR}$ represent the total $[Ca^{2+}]$ in the respective compartments. Let J_1 be the Ca^{2+} flux from the cytoplasm to outside the cell together with all cytoplasmic Ca^{2+} removal mechanisms (except SERCA pumps) that are involved in keeping a constant basal concentration of this ion, J_2 be the Ca^{2+} flux from the SR to the cytoplasm via RyRs present in the SR membrane, and J_3 be the Ca^{2+} flux from the cytoplasm to the SR via SERCA pumps located in the SR membrane. It follows from these considerations that

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{Ti}}{dt} = -J_1 + J_2 - J_3, \tag{1.1}$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{TSR}}{dt} = \frac{J_3 - J_2}{\gamma}. \tag{1.2}$$

All fluxes have units of concentration/time which are referred to the volume of the cytoplasm. Accordingly, the factor γ denotes the volume ratio between the SR and the cytoplasm.

As indicated above, J_1 considers all plasma membrane Ca^{2+} removal mechanisms and based on the observation that this process has a first order kinetics, as shown by Guerrero et al. [21], we have assumed that

$$J_1 = a\left[[Ca^{2+}]_i - \overline{[Ca^{2+}]_i}\right], \tag{1.3}$$

where $[Ca^{2+}]_i$ is the free cytoplasmic $[Ca^{2+}]$, while $\overline{[Ca^{2+}]_i}$ is the resting basal $[Ca^{2+}]_i$, and a is the first order kinetic constant for this flux. We have assumed that no membrane potential exists across the SR membrane [22], therefore the flux J_2 is driven by the gradient of free Ca^{2+}

ions across this membrane:

$$J_2 = b\gamma^{n_v} P_o([Ca^{2+}]_i, [Caff])[[Ca^{2+}]_{FSR} - [Ca^{2+}]_i], \tag{1.4}$$

where b is a constant parameter proportional to the maximum $[Ca^{2+}]$ flow through a single RyR, $P_o([Ca^{2+}]_i[Caff])$ is the probability that a single RyR is open as a function of $[Ca^{2+}]_i$ and of the caffeine concentration ([Caff]) used to induce Ca^{2+} release from SR store, $[Ca^{2+}]_{FSR}$ is the concentration of free Ca^{2+} in the SR, and γ^{n_v} is a proportionality constant for the number of RyR based on γ being the volume ratio between SR and cytoplasm. SR appears to have a complex fractal-like structure, hence its surface should scale with respect to the volume according to a power law γ^{n_v}, where n_v is a parameter related to the SR fractal dimension [23]. Accordingly, if we assume that the density of RyR on SR surface is constant, the number of these ion channels results to be proportional to γ^{n_v}.

Regarding J_3 flux, we have modeled SERCA pump activity following Lyton et al. [24], and it follows that:

$$J_3 = c\frac{[Ca^{2+}]_i^{n_s}}{K_s^{n_s} + [Ca^{2+}]_i^{n_s}} \tag{1.5}$$

with c representing the maximum Ca^{2+} flux through SERCA pumps, K_s the corresponding half saturation constant, and n_s a Hill coefficient.

In the cytoplasm, Ca^{2+} ions can be either free or bound to buffering proteins. By definition Ca^{2+} buffer (β) is the ratio between the increment in Ca^{2+} bound to proteins and the increment in free $[Ca^{2+}]$, so it follows that:

$$\beta = \frac{\Delta[Ca^{2+}]_B}{\Delta[Ca^{2+}]}. \tag{1.6}$$

Assuming infinitesimal small increments, Eq (1.6) can be solved by Eq (1.7).

$$\beta = \frac{B_T K_D}{[[Ca^{2+}] + K_D]^2}, \tag{1.7}$$

where B_T represents the total amount of Ca^{2+} binding sites with a dissociation constant K_D.

However, this definition is rather impractical because is very difficult to determine the amount of Ca^{2+} bound to proteins in a cell. However, it is rather easy to determine the total amount of Ca^{2+} added to the cell [21], and then a new Ca^{2+} buffering capacity can be defined as:

$$\beta_T = \frac{\Delta[Ca^{2+}]_T}{\Delta[Ca^{2+}]}, \tag{1.8}$$

and in this case, it turns out that Eq (1.8) is related to Eq (1.7) by the following:

$$\beta_T = \beta + 1. \tag{1.9}$$

Interestingly, the cytoplasmic Ca^{2+} buffering of smooth muscle and chromaffin cells appears to be constant [21,25]. We have modeled the relation between free and total cytoplasmic $[Ca^{2+}]$ as:

$$\Delta[Ca^{2+}]_i = \frac{\Delta[Ca^{2+}]_{Ti}}{\beta}. \tag{1.10}$$

Regarding the RyR open probability, it is known that it increases when Ca^{2+} ions bind this channel on its cytoplasmic side, a process regarded as Ca^{2+} induced Ca^{2+} release (CICR), which functions at low efficiency in smooth muscle cell [26]. In this work we have used caffeine to increase the Ca^{2+} affinity of smooth muscle's RyR so they open even when Ca^{2+} is at basal level. To account for the above described phenomenon we have assumed that each of the four subunits of RyR has binding sites for Ca^{2+} and caffeine, and these molecules interact cooperatively when they are bound. From this consideration and the assumption of chemical equilibrium, the probability that there is a Ca^{2+} ion bound to its corresponding binding site, regardless of the state of the caffeine site is:

$$\frac{\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C} + k_F \frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}\frac{[Caff]}{K_F}}{1 + \frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C} + \frac{[Caff]}{K_F} + k_F \frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}\frac{[Caff]}{K_F}} = \frac{\frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}\left(1 + k_F \frac{[Caff]}{K_F}\right)}{1 + \frac{[Ca^{2+}]_i}{K_C}\left(1 + k_F \frac{[Caff]}{K_F}\right) + \frac{[Caff]}{K_F}},$$

where K_C is the dissociation constant of RyR-Ca^{2+} complex, K_F is the dissociation constant of the RyR-caffeine complex, and $k_F > 1$ accounts for the cooperativity between Ca^{2+} and caffeine. Under the assumption that $[Caff]/K_F \ll 1$, the above expression can be rewritten as:

$$\frac{[Ca^{2+}]_i(1 + k_f[Caff])}{K_C + [Ca^{2+}]_i(1 + k_f[Caff])},$$

with $k_f = k_F / K_F$. Finally, considering that Ca^{2+} needs to be bound to all four subunits in order for the channel to open, and that there is a certain amount of cooperativity among subunits, the RyR open probability can be written as [27]:

$$P_o([Ca^{2+}]_i, [Caff]) = \frac{[[Ca^{2+}]_i(1 + [Caff])]^{n_F}}{K_C^{n_F} + [[Ca^{2+}]_i(1 + k_f[Caff])]^{n_F}}, \tag{1.11}$$

with n_F being a Hill coefficient. The Ca^{2+} ion in the SR can be either free or bound to proteins.

Let P denote concentration of Ca^{2+} binding sites within the SR, and P_C the concentration of sites already occupied with Ca^{2+}. Under the assumption of chemical equilibrium, it follows that:

$$K_R = \frac{P[Ca^{2+}]_{FSR}}{P_C}, \tag{1.12}$$

where K_R is the corresponding dissociation constant of this protein P. Moreover, let P_E denote the concentration of Ca^{2+} binding sites in the absence of luminal Ca^{2+}. Hence, it follows from the assumption that the total number of Ca^{2+} binding sites remains constant that

$$P = P_E - P_C. \tag{1.13}$$

By solving for P_C from Eq (1.12) and Eq (1.13) we obtain

$$P_C = P_E \frac{[Ca^{2+}]_{FSR}}{K_R + [Ca^{2+}]_{FSR}}, \tag{1.14}$$

and because Ca^{2+} can only be free or bound then,

$$[Ca^{2+}]_{TSR} = [Ca^{2+}]_{FSR} + P_C. \tag{1.15}$$

Hence, by solving for $[Ca^{2+}]_{FSR}$ from Eq (1.14) and Eq (1.15) we get the following expression for the concentration of free luminal Ca^{2+} in terms of the total Ca^{2+} concentration in the

SR:

$$[Ca^{2+}]_{FSR} = \frac{1}{2}\xi + \frac{1}{2}\sqrt{\xi^2 + 4[Ca^{2+}]_{TSR}K_R}, \tag{1.16}$$

where $\xi = [Ca^{2+}]_{TSR} - P_E - K_R$. This is the classical approach for saturable kinetics (Standard Kinetics, SK) because, as seen in Eq (1.13), the amount of free binding sites is depleted as the amount of luminal Ca^{2+} increases and the available sites are bound. In this case the Ca^{2+} buffer capacity can be estimated by Eq (1.7) (S2A Fig). This graph shows that β is a decreasing function of Ca^{2+} that approaches zero when $Ca^{2+} >> K_D$. Nonetheless, this type of kinetics cannot explain phase 1 of Ca^{2+} release observed in smooth muscle [11,16]. We have come to realize that Ca^{2+} binding to calsequestrin shows an increase of B_{max} as Ca^{2+} was elevated (S3 Fig). Based on fitting, previously published data [28], to binding curves with different values of B_{max}. We have observed that B_{max} value increases as a function of the window of $[Ca^{2+}]$ that was used to calculate the binding curve (S3 Fig). Base on this type of behavior, we have suggested a new kinetic model called **Kinetics on Demand (KonD)**. Additionally, there are data using X-ray microanalysis showing that sections of the ER behave as if the buffering capacity is extremely large [29] in combination with regions in which the free luminal SR $[Ca^{2+}]$ does not change, a situation that might reflect the ability of luminal Ca^{2+} buffering proteins to have a KonD type of Ca^{2+} binding. This observation is compatible with the assumption that new Ca^{2+} binding sites become apparent as the already available ones are bound to Ca^{2+}. Since there is no mathematical framework to model this type of behavior, we decided to test this new paradigm by assuming that Eq (1.13) can be substituted with the following:

$$P = P_E + P_C. \tag{1.17}$$

If we take this new relation and repeat the procedure leading to Eq (1.16) we have obtained the following expression relating the free and the total SR Ca^{2+} concentrations:

$$[Ca^{2+}]_{FSR} = \frac{1}{2}\xi - \frac{1}{2}\sqrt{\xi^2 - 4[Ca^{2+}]_{TSR}K_R}, \tag{1.18}$$

where $\xi = [Ca^{2+}]_{TSR} + P_E + K_R$.

Interestingly, this new type of kinetics displays a growing Ca^{2+} buffering capacity (S2B Fig), as long as Ca^{2+} is below the dissociation constant because

$$\beta = \frac{B_T K_D}{[[Ca^{2+}] - K_D]^2}. \tag{1.19}$$

when Ca^{2+} is above K_D then the buffering power is also a decreasing function as it is the case of Standard Kinetics.

Parameter estimation

The parameters used in the model are shown in Table 1. These were obtained by adjusting data using $[Ca^{2+}]_i$ responses induced by 20 mM caffeine and by assuming that the amount of SR responding to caffeine varied from cell to cell and was between 1 and 10% of the cell volume.

Table 1. Parameters used for KonD mathematical model simulation of variability of $[Ca^{2+}]_i$ responses to caffeine for control condition (20 mM caffeine), lower caffeine (2 mM) and inhibited SERCA pump with thapsigargin. All parameters values were the same as those obtained with 20mM caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response except where indicated with bold letters. The description of parameters can be found in Supporting Information (S1 Text).

Parameters	20 mM caffeine	2 mM caffeine	Thapsigargin + 20 mM caffeine
a	35 s^{-1}	35 s^{-1}	35 s^{-1}
b	72.2 s^{-1}	72.2 s^{-1}	72.2 s^{-1}
c	11.25 μM/s	11.25 μM/s	11.25 μM/s
$[Ca^{2+}]_i$	75 nM	75 nM	75 nM
γ	1–10%	1–10%	1–10%
n_v	1.7	1.7	1.7
K_s	300 nM	300 nM	300 nM
n_s	2	2	2
β	100	100	100
n_F	1.8	1.8	1.8
k_f	4 mM^{-1}	4 mM^{-1}	**0.3 mM^{-1}**
[Caffeine]	20 mM	**2 mM**	20 mM
$[Ca^{2+}]_{TSR}$	1.65 mM	1.65 mM	**0.75 mM**
$[Ca^{2+}]_{FSR}$	150 μM	150 μM	150 μM
K_R	151.5 μM	151.5 μM	151.5 μM
Thapsigargin	0	0	**1**
Calsequestrin	10	10	**4**

doi:10.1371/journal.pone.0138195.t001

Results

Ca^{2+} release from the SR involved four different phases in smooth muscle cells

Simultaneous recordings of $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_{FSR}$ in smooth muscle cells have demonstrated that activation of RyRs by caffeine induces a large increase in $[Ca^{2+}]_i$ before any reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ (phase 1), which is followed by a large reduction of $[Ca^{2+}]_{FSR}$ and a plateau of the $[Ca^{2+}]_i$ increase (phase 2). Additionally, it was found that rapid inhibition of SERCA pump reduces both the amplitude and the rate of rise of the caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response [4,11,16]. Fig 1A shows the effect of 5-sec stimulation with caffeine on the simultaneous recording of the $[Ca^{2+}]_i$ (upper trace) and the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ (middle trace) before and after the inhibition of SERCA pumps with thapsigargin. Application with a second puffer pipette of 10 μM thapsigargin for 5 sec was enough to inhibit completely the recovery of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ after terminating the second application of caffeine (Fig 1A). This effect agrees with, the already described, irreversible inhibitory action of thapsigargin on SERCA pump activity [4]. Fig 1B blue line indicates those four phases of Ca^{2+} release for data shown in Fig 1A in the absence of thapsigargin. The effect of inhibiting SERCA pumps with thapsigargin on the phase diagram is shown in Fig 1B (green line). Interestingly, phase 1 and 2 are fused together in a single phase showing now a linear correlation between the reduction in the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ and the diminished increase in the $[Ca^{2+}]_i$ response.

Kinetics on demand model fitted the caffeine-induced Ca^{2+} release

To get an insight on how SERCA pumps might control SR Ca^{2+} release in smooth muscle cells we have developed a simple deterministic mathematical model based on the $[Ca^{2+}]_i$ response to two different caffeine concentrations (2 and 20 mM) and the effect of rapid inhibition of SERCA pump with thapsigargin on the 20 mM caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response. The

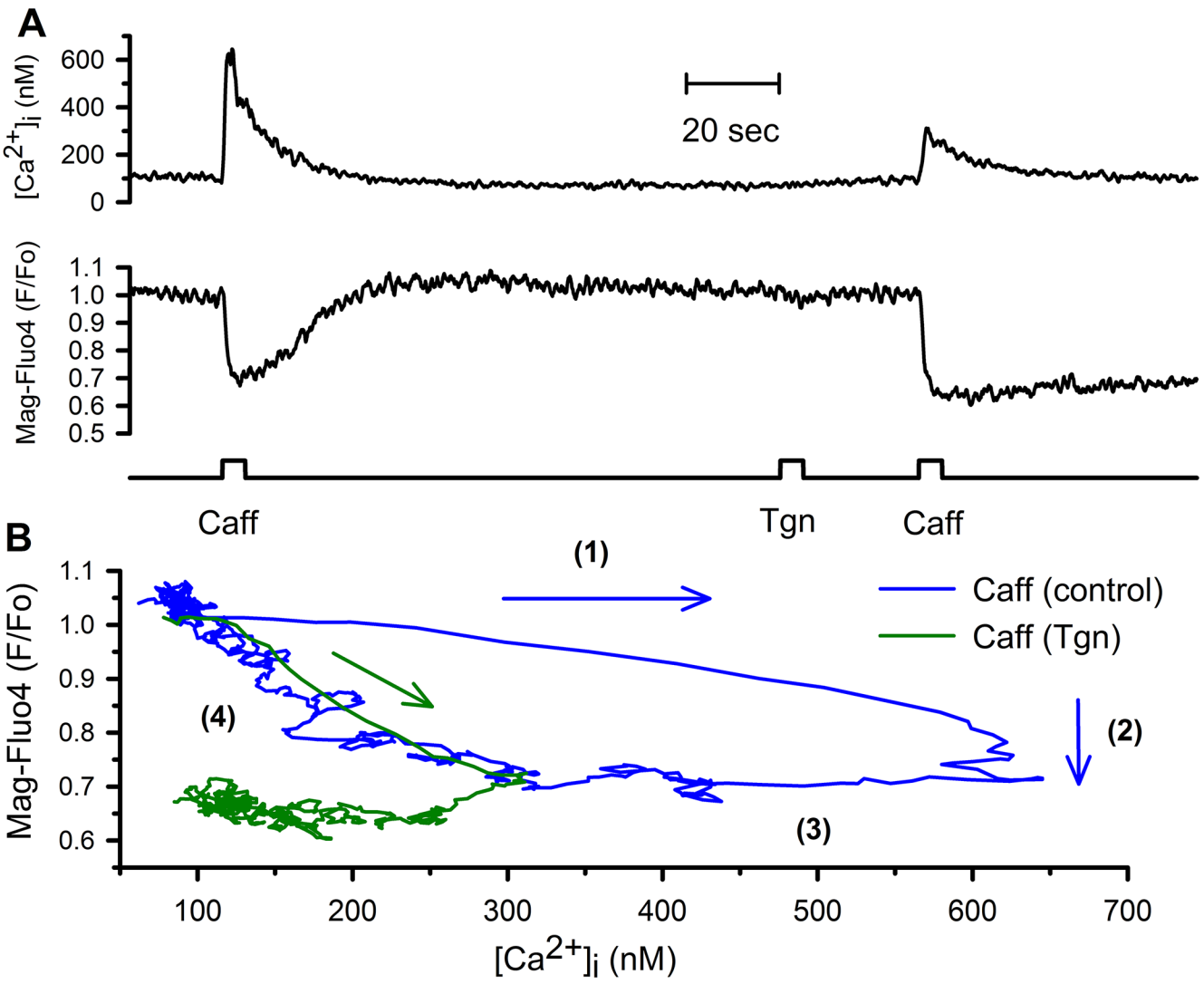

Fig 1. Caffeine-induced Ca^{2+} release involves four phases that require active SERCA pumps in smooth muscle cells. Single freshly isolated smooth muscle cells from guinea pig urinary bladder were loaded with both fura-2 and Mag-Fluo-4 to measure $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_{FSR}$, respectively. (A) Caffeine application (20 mM with a puffer pipette for 5 seconds) induced a transient increase of the $[Ca^{2+}]_i$ and a transient reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$. Inhibition of SERCA pumps with thapsigargin reduced both the amplitude and the rate of $[Ca^{2+}]_i$ response; however, (B) close examination of these responses show that caffeine induced an increase in the $[Ca^{2+}]_i$ before any reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ (phase 1) followed by a sharp reduction in the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ without any effect on the $[Ca^{2+}]_i$ (phase 2). Interestingly, the inhibition of SERCA pumps with thapsigargin fused phase1 and phase 2 in a linear reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ associated with a smaller increase of the $[Ca^{2+}]_i$. Ca^{2+} recording were carried out as previously described (10).

doi:10.1371/journal.pone.0138195.g001

mathematical model is based on a new concept named Kinetics-on-Demand (KonD), where Ca^{2+}-binding sites of SR Ca^{2+}-binding proteins are an increasing function of $[Ca^{2+}]$ (see Model development). RyRs were modeled as homotetrameric channels activated by Ca^{2+} and caffeine. Application of 20 mM caffeine with a puffer pipette to freshly isolated smooth muscle cells loaded with Fura-2 produced a transient $[Ca^{2+}]_i$ response with large variability in the amplitude, the rate of rise and the time to peak. Our mathematical model was able to reproduce this variability by assuming that the SR volume responding to caffeine varied between 1 and 10% of cell volume. The values for the rest of the parameters are shown in Table 1 and were determined using those that fitted $[Ca^{2+}]_i$ responses induced by 20 mM caffeine. Fig 2A shows the relationship between the amplitude of 20 mM caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses and the

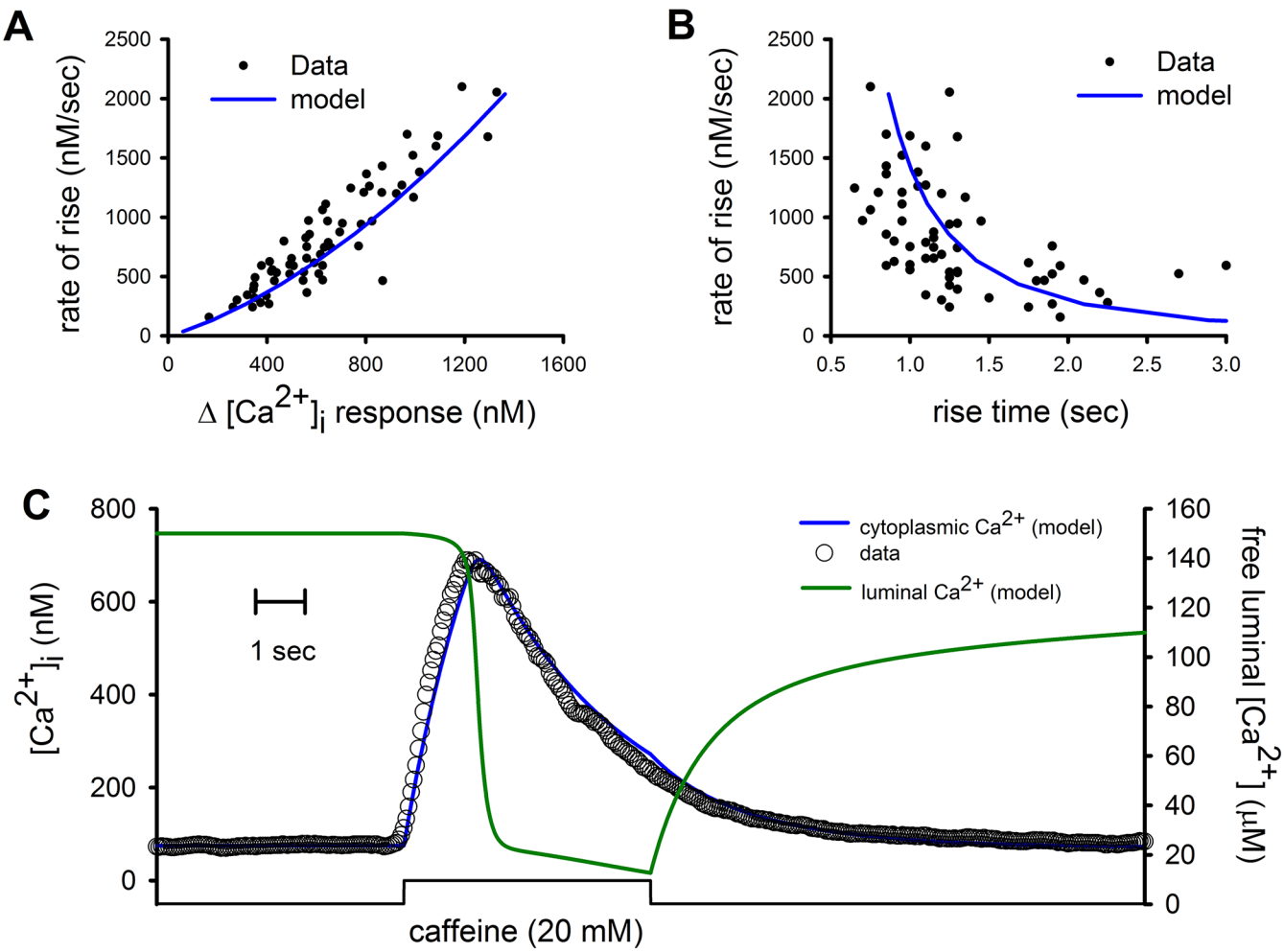

Fig 2. $[Ca^{2+}]_i$ responses induced by 20 mM caffeine and their fitting by KonD model. (A) Variability of the amplitude and the rate of rise of caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses for 66 different cells and the fitting by KonD model (blue line) of these responses. (B) Same responses as shown in (A) but comparing the time to peak and the rate of rise that was fitted by the model. (C) Time course of the $[Ca^{2+}]_i$ response (open circles) fitted by the model (blue line) and the reduction in $[Ca^{2+}]_{FSR}$ predicted by the KonD model (green line).

doi:10.1371/journal.pone.0138195.g002

corresponding maximal rate of rise for 66 different cells and how the model fitted this relationship by varying the fraction of responding SR volume (blue line). The KonD model was also able to reproduce the relation between the peak rate of rise and the rise time of the caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses (Fig 2B). This model was used also to simulate the time course of caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response (Fig 2C, blue line) together with the changes in the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ (Fig 2C, green line).

To assess the robustness of our mathematical model, we used the parameters found for fitting 20 mM-caffeine induced $[Ca^{2+}]_i$ responses to model the responses obtained with 2 mM caffeine. In this case the same parameters shown in Table 1 were used, except for the concentration of caffeine. The application of 2 mM caffeine produced on average smaller and slower $[Ca^{2+}]_i$ responses that were reproduced by the KonD model. There were also good fittings between the maximal rate of $[Ca^{2+}]_i$ rise and either the peak $[Ca^{2+}]_i$ response (Fig 3A) or the rise time (Fig 3B). These parameters also fitted the time course of the 2 mM caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response (Fig 3C, blue line) and show the time-course for the reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ (Fig 3C, green line). These results with 2 mM caffeine suggest that the KonD model is robust

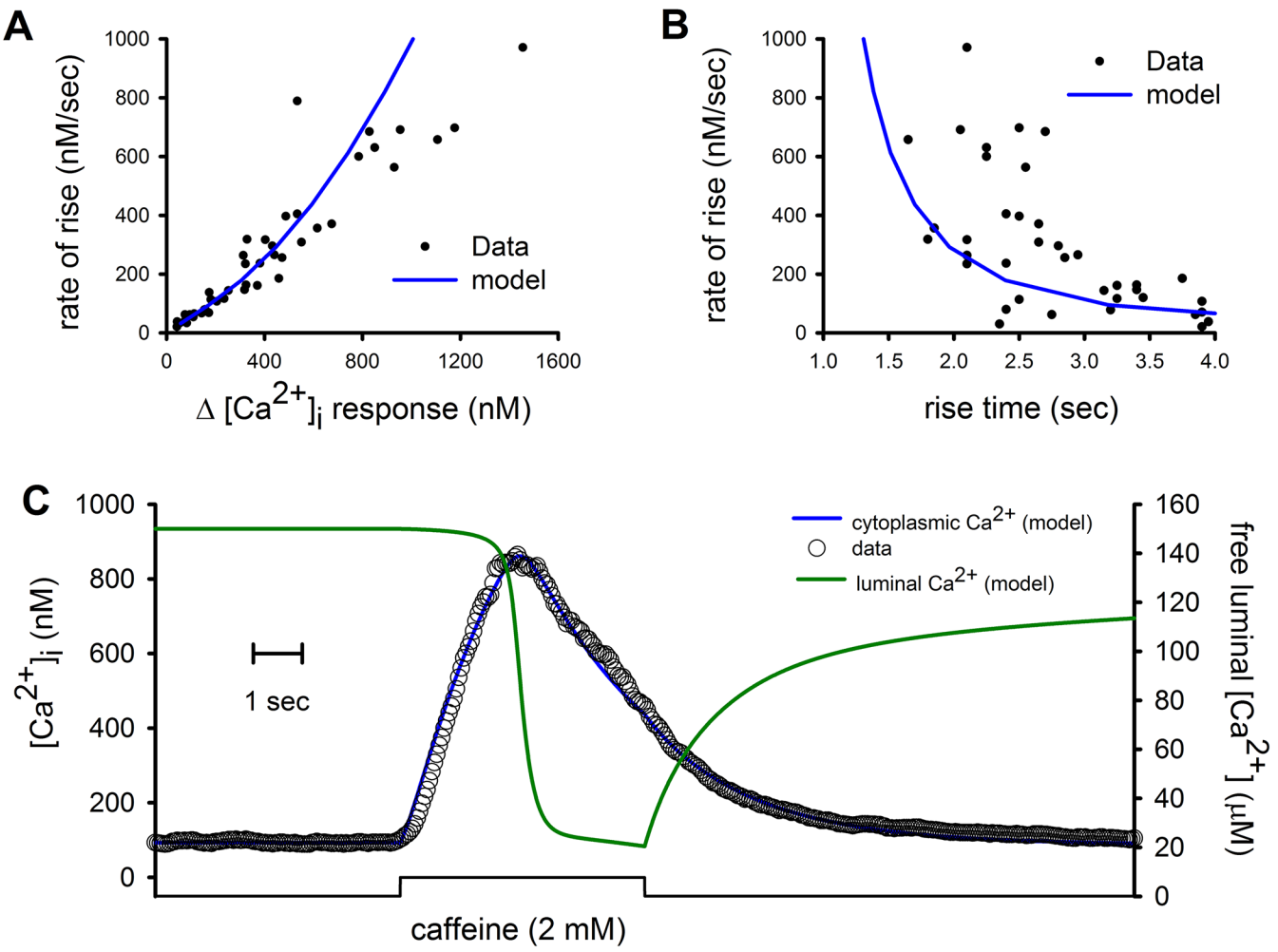

Fig 3. $[Ca^{2+}]_i$ responses induced by 2 mM caffeine and their fitting by KonD model. (A) Variability of the amplitude and rate of rise of the caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses for 49 different cells and the fitting by KonD model (blue line) of these responses. (B) Comparison of the rise time vs rate of rise for the same $[Ca^{2+}]_i$ responses and fitting by KonD model (blue line). (C) Time course for both $[Ca^{2+}]_i$ and KonD model (blue line) together with the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ response derived from the model (green line).

doi:10.1371/journal.pone.0138195.g003

enough to evaluate which parameters play a role in the SERCA-inhibited $[Ca^{2+}]_i$ responses induced by caffeine.

Inhibition of SERCA Ca^{2+} pumps changed caffeine-induced Ca^{2+} release from KonD model to SK model

Application of thapsigargin (10 μM) with a second puffer pipette for 5 seconds and 30 seconds before the application of caffeine resulted, as expected, in smaller (Fig 4A) and slower (Fig 4B) $[Ca^{2+}]_i$ responses. In this case the reduction in the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ occurred at a higher rate than when SERCA pumps are active and yet, the $[Ca^{2+}]_i$ response was both smaller and slower (Fig 4C, green line).

The phase diagram displayed in Fig 1B shows that inhibition of SERCA pump combined phases 1 and 2 resulting now in a linear relation between the increase in the $[Ca^{2+}]_i$ and the reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$. We have used KonD model to determine which parameters need to be changed to reproduce the effect of thapsigargin. This exercise is shown in Fig 5. Where

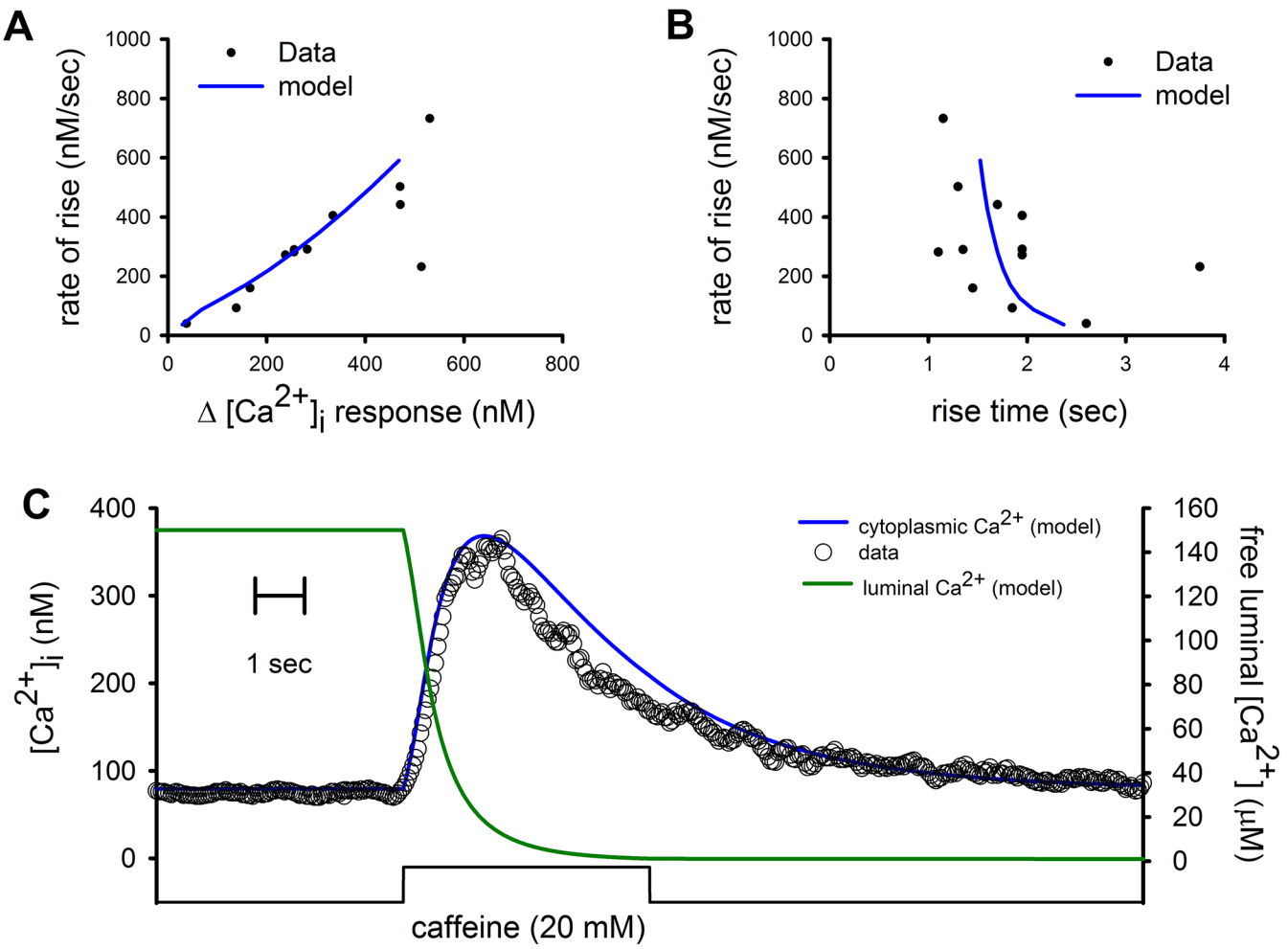

Fig 4. Effect of SERCA pump inhibition by thapsigargin on 20 mM caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses. (A) $[Ca^{2+}]_i$ responses of 12 different cells that were exposed to thapsigargin for 5 seconds, 30 seconds before the application of caffeine, were smaller in amplitude and slower and (B) with a larger rise time. The mathematical model fitted this relationship but only after switching from KonD model to SK model (blue lines). (C) Time course of the $[Ca^{2+}]_i$ response to 20 mM caffeine from a cell that had been previously exposed to thapsigargin together with fitting by modified SK model (blue line) and the resulting reduction in the $[Ca^{2+}]_{SR}$ from this model (green line). Notice there was no recovery of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ as expected for inhibited SERCA pumps.

doi:10.1371/journal.pone.0138195.g004

Fig 5A is the $[Ca^{2+}]_i$ responses to the application of 20 mM caffeine where indicated, while Fig 5B corresponds to the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ and Fig 5C shows the total SR $[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_{TSR}$) which corresponds to the sum of both $[Ca^{2+}]_{BSR}$ and $[Ca^{2+}]_{FSR}$. The complete inhibition of SERCA pump by itself did not importantly alter (red line) the $[Ca^{2+}]_i$ response to the application of 20 mM caffeine (Fig 5A, blue line) but as expected, completely eliminated the recovery of $[Ca^{2+}]_{FSR}$ after caffeine application (Fig 5B, red line). However, we observed a significant reduction in the caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response by changing the way that luminal Ca^{2+}-binding proteins interact with Ca^{2+} by using now SK condition instead of KonD (Fig 5A, green line). Interestingly, the main difference is that the delay for the reduction in the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ has disappeared (Fig 5B, green line) and although the total amount of Ca^{2+} released by the SR is the same in both conditions; in the SK condition occurs at a slower rate than at KonD (Fig 5C, green line vs blue line). This slower kinetics of Ca^{2+} release increased the effect of cytoplasmic Ca^{2+} removal mechanisms on the $[Ca^{2+}]_i$ response. The effect of thapsigargin on caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response is a reduction of both the peak amplitude and the rate of rise. While

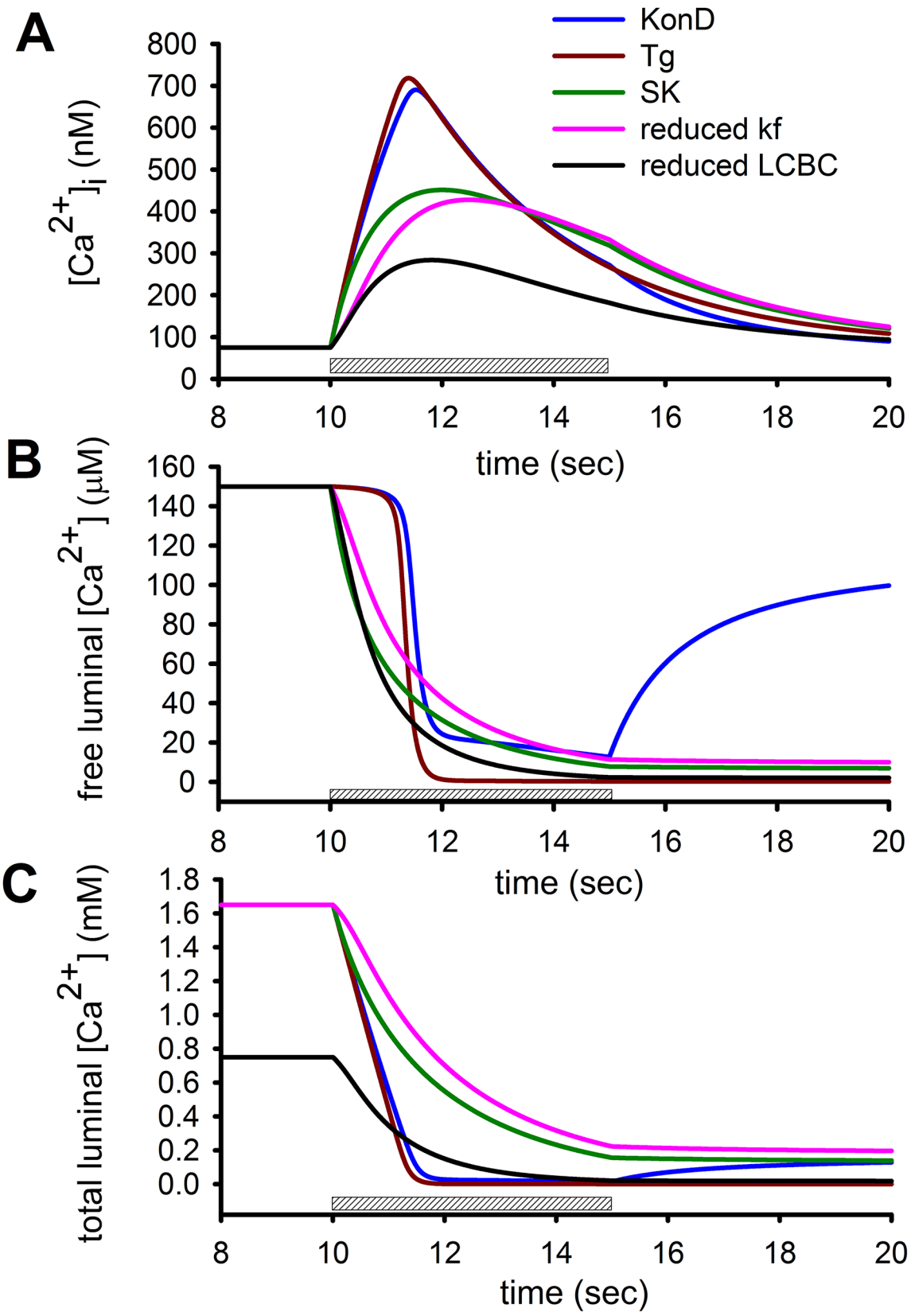
A
KonD
Tg
SK
reduced kf
reduced LCBC
$[Ca^{2+}]_i$ (nM)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
8
10
12
14
16
18
20
time (sec)
B
free luminal $[Ca^{2+}]$ (μM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
time (sec)
C
total luminal $[Ca^{2+}]$ (mM)
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
time (sec)

Fig 5. Inhibition of SERCA pump switches Ca^{2+} release from KonD condition to SK situation. The control response to application of 20 mM caffeine using KonD model is shown for (A) $[Ca^{2+}]_i$, (B) $[Ca^{2+}]_{FSR}$ and (C) $[Ca^{2+}]_{TSR}$ (blue lines). Inhibition of SERCA pump with thapsigargin (B, C, red line) impaired recovery of $[Ca^{2+}]_{FSR}$ but did not alter the $[Ca^{2+}]_i$ response (A, red line). Switching from KonD to SK significantly reduced the amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ (A, green line) because decreased the reduction of $[Ca^{2+}]_{TSR}$ (C, green line) although accelerated the reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ (B, green line). To reduce both the amplitude and the rate of rise, it was reduced the number of release channels involved (k_f, magenta line) and accordingly we have to reduce also the amount of luminal Ca^{2+} binding proteins involved (LCBC, solid line). Caffeine was present for a period of 5 seconds to activate RyRs beginning at the time point of 10 seconds as indicated by the dashed bar.

doi:10.1371/journal.pone.0138195.g005

the former was accomplished by switching from KonD to SK, the latter required a reduction of both k_f parameter (see Model development) and the amount of luminal Ca^{2+} binding proteins involved during Ca^{2+} release (Fig 5A, solid line). Since the time taken by thapsigargin to produce these two effects is rather short, we think that the concentration of luminal Ca^{2+} binding proteins is not modified and instead there is a reduction in the number of RyRs that are coupled to the luminal Ca^{2+}-binding proteins and responding to caffeine. This situation effectively reduces the amplitude of the caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response without any reduction of the $[Ca^{2+}]_{TSR}$. However, to achieve this effect in our model we decided to reduce the $[Ca^{2+}]_{TSR}$ to fit the recorded data (Fig 5C solid line).

The KonD model can reproduce the four phases of Ca^{2+} release, particularly the transition from phase 1 to phase 2 (Fig 6A, blue line). Importantly, switching from KonD to SK showed that phase 1 and 2 disappeared and resulted now in a linear relationship between the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ and the $[Ca^{2+}]_i$ (Fig 6A, red line). Comparison between the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ and $[Ca^{2+}]_{TSR}$ clarifies why KonD condition is more efficient in increasing $[Ca^{2+}]_i$ than SK. In KonD the Ca^{2+} supplied to the cytoplasm comes mainly from Ca^{2+} bound to proteins with minimal reduction in the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ (Fig 6B, blue line) while in the SK situation happens exactly the opposite (Fig 6B, red line). This is very important because explains why the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ does not correlate with the supply of Ca^{2+} to the cytoplasm. Additionally, our mathematical model suggests that SERCA pump modulates the number of release channels coupled to luminal Ca^{2+} binding proteins, such that inhibition of SERCA can produce also a reduction of the amplitude of Ca^{2+} response by decreasing the number of luminal Ca^{2+} binding proteins participating in Ca^{2+} release response (Fig 6B, green line).

KonD model explained the refractory period associated with the recovery of $[Ca^{2+}]_{FSR}$ after caffeine-induced Ca^{2+} release

The activation of ryanodine receptors by a saturating concentration of caffeine produced a transient increase in the $[Ca^{2+}]_i$ due to Ca^{2+} release from the SR. The application of a second pulse of caffeine just 30 seconds after the first pulse, produced a significantly smaller transient $[Ca^{2+}]_i$ response of only 20% in amplitude [21]. A straightforward explanation would be that the SR Ca^{2+} store did not have enough time to recover after caffeine-induced Ca^{2+} release. However, the recorded $[Ca^{2+}]_{FSR}$ shows that this time of 30 seconds was enough to reach the initial level of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ [4,11]. This is a paradox because the SK condition says that recovery of the free luminal $[Ca^{2+}]$ implies the complete recovery of total SR $[Ca^{2+}]$, which in turn should generate a $[Ca^{2+}]_i$ response of similar amplitude to the one produced by the first application of caffeine. Fig 7 shows the fitting by either the KonD model (red line) or the SK model (green line) of the simultaneous recording (blue line) of both the $[Ca^{2+}]_i$ (upper traces) and the changes in the free luminal SR $[Ca^{2+}]$ (lower traces) in response to the dual application of saturating concentrations of caffeine (middle trace). The parameters used here are exactly the same to those shown in Table 1 and employed for fitting the response to 20 mM caffeine shown in Fig 2 except, that here, the ratio between the SR and the cytoplasm was modify to fit the amplitude of the caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response. The same parameters were used for the SK

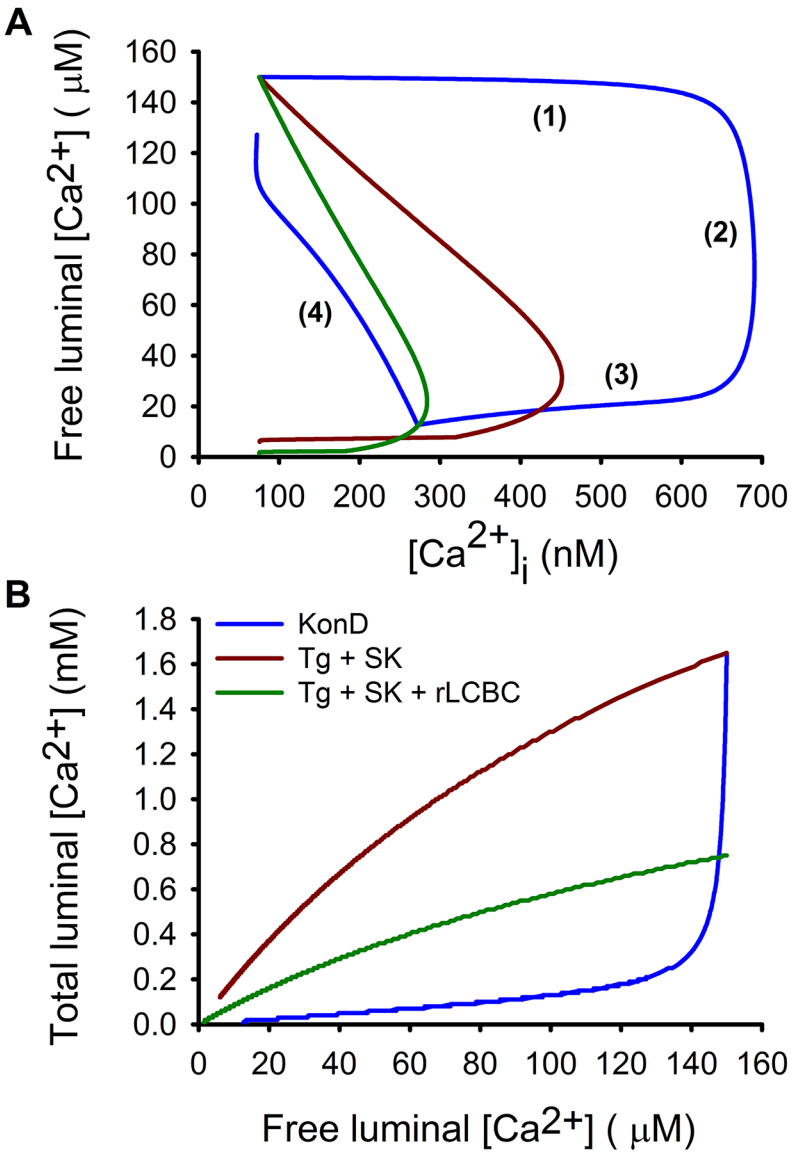

Fig 6. KonD model reproduces phase diagram of Ca^{2+} release. (A) KonD model reproduces phase diagram seen in caffeine-induced Ca^{2+} release (blue line) and this is altered by inhibiting SERCA pump and switching to SK condition (red line). Reducing the number of RyRs participating and the amount of luminal Ca^{2+}-binding proteins (LCBC) reduces even further the amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ response but with a similar phase diagram (green line) that compares very well with experimental data (Fig 1). (B) KonD condition generated a luminal Ca^{2+} buffering power curve with a positive curvature as has been observed in skeletal muscle (blue line). This explains a large supply of Ca^{2+} to the cytoplasm (due to a large reduction in the $[Ca^{2+}]_{TSR}$ with minimal reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$). Switching to SK condition generated a negative curvature that means a larger reduction in the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ but a much smaller reduction of the $[Ca^{2+}]_{TSR}$ (red line) and accordingly a smaller increase in the $[Ca^{2+}]_i$. Reducing the amount of luminal SR Ca^{2+} binding protein participating in response to caffeine decreased the total amount of Ca^{2+} supplied by SR (green line).

doi:10.1371/journal.pone.0138195.g006

model. Since caffeine released the same amount of Ca^{2+} from the SR for both models, the reduced amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ response seen with the standard model was due to the competition for Ca^{2+} between the luminal SR Ca^{2+} binding proteins and the release channels, a situation that is not observed in the KonD model as demonstrated in Fig 6. Since the SK model does not have phase 1, the reduction in the luminal SR $[Ca^{2+}]$ slightly precedes the recorded

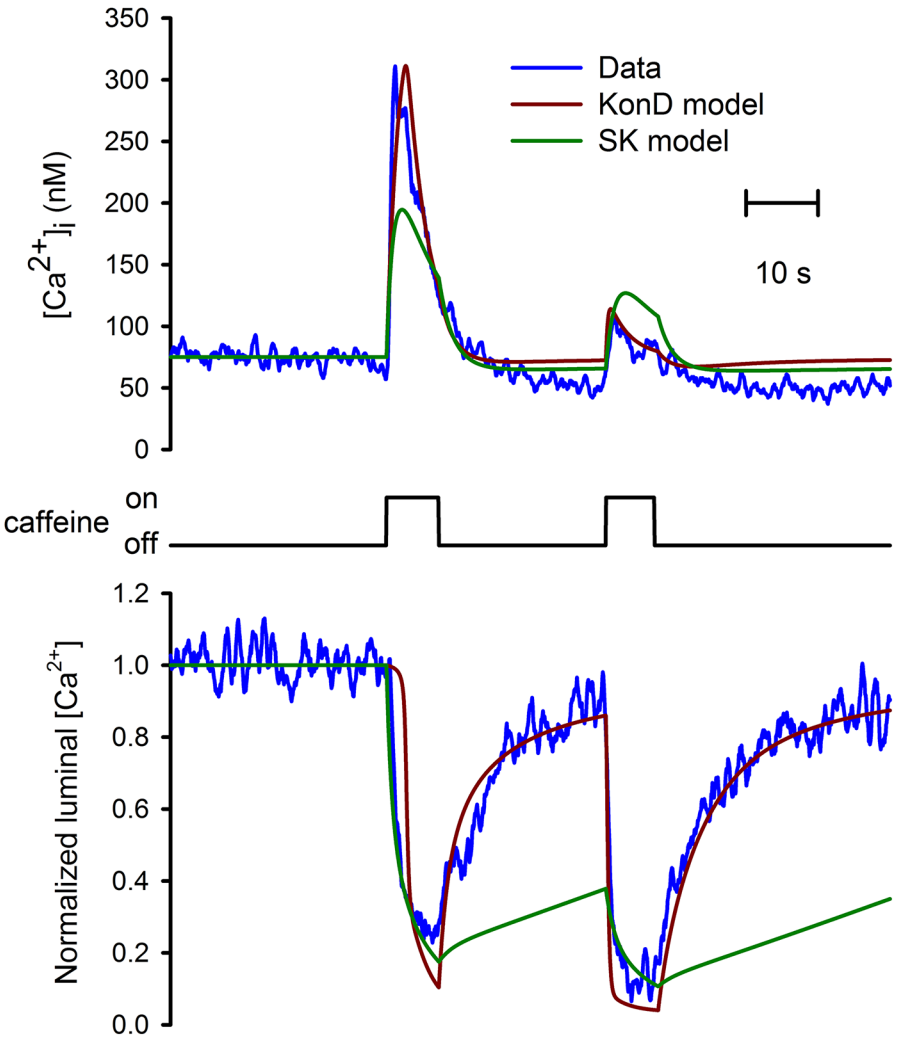

Fig 7. Refractory $[Ca^{2+}]_i$ response to the application of caffeine. A set of experimental results (blue line) of simultaneous recording of $[Ca^{2+}]_i$ (upper trace) and SR Ca^{2+} levels (bottom trace) in response to the application of two pulses of caffeine (middle trace) are presented. Notice that by 30 s after the first application of caffeine both $[Ca^{2+}]_i$ and SR Ca^{2+} levels have recovered to resting levels. A second application of caffeine produce the same response in the SR Ca^{2+} with minimal effect on the $[Ca^{2+}]_i$. The numerical simulations of KonD model (red line) and SK model (green line) are also shown. The simulation for both models was calculated by solving numerically the differential equations with the parameters shown in Table 1 for 20mM of caffeine with parameter gamma equals to 2.54%. Changing parameter gamma helps SK model to fit the caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ transient but does not show the same time course for the recovery of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ (S4 Fig).

doi:10.1371/journal.pone.0138195.g007

reduction of the luminal SR $[Ca^{2+}]$. On the other hand, KonD model shows an exaggerated phase 1. Interestingly, the KonD model shows a rapid recovery of the free luminal SR $[Ca^{2+}]$ that does not involve the recovery of the total SR $[Ca^{2+}]$ (see Fig 5) while in the SK model, since these two parameters go together; there is only a minimal recovery of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$. This result is also true even when using parameters that best fit the caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response (S4 Fig). This discrepancy between these two models, allows KonD model to explain the apparent paradox of having a recovered free luminal SR $[Ca^{2+}]$ with a still reduced total SR $[Ca^{2+}]$. It appears then that KonD describes much better how the SR luminal Ca^{2+} binding proteins behave during caffeine-induced Ca^{2+} release in smooth muscle cells.

Discussion

New Ca^{2+} binding kinetic model based on how calsequestrin binds Ca^{2+}

A deterministic mathematical model has been developed to simulate Ca^{2+} release from the SR and the role of SERCA pump in facilitating this release. The main contribution of this model is the realization that experimental data cannot be fitted using the SK condition for Ca^{2+} binding to proteins. We have assumed a new type of kinetics, KonD, where the number of Ca^{2+} binding sites increases in response to the binding of Ca^{2+} and the opposite happens when there is a reduction of the $[Ca^{2+}]$ (S3 Fig). This idea is supported by the work done with calsequestrin [15], where our own analysis of their Ca^{2+} binding data suggest that B_{max} (the total amount of Ca^{2+} binding sites) increases as $[Ca^{2+}]$ is increased, i.e. B_{max} = 22 in the range of 0 to 0.5 mM $[Ca^{2+}]$, and goes to 40 between 0.5 and 3 mM $[Ca^{2+}]$, B_{max} increases to 65 for the range of 3 to 7 mM $[Ca^{2+}]$ and increases again to 79 from 7 to 20 mM $[Ca^{2+}]$ (see Supporting Information). Moreover, it has been shown that this increase in B_{max} requires protein oligomerization because using a calsequestrin mutant incapable of aggregation shows a saturable constant B_{max} of 22 all the way to 20 mM $[Ca^{2+}]$ [15] (S2 Fig) Additionally, the use of energy-dispersive X-ray microanalysis to determine Ca^{2+} storage in the ER of pyramidal neurons show that certain regions of the ER can accumulate Ca^{2+} in the excess of 100 mM/Kg of dry weight, more importantly, these regions are in continuity with regions of the ER that do not accumulate Ca^{2+}, this implies that the buffering regions of the ER are not in equilibrium with the non-buffering regions of the ER since the former can accumulate large amounts of Ca^{2+} without any change in the total amount of Ca^{2+} of the nearby non-buffering regions of the ER [29].

Caffeine-induced Ca^{2+} release by smooth muscle involves four phases that are reproduced by KonD model

One key element that the model needed to reproduce is the phase 1 observed during SR Ca^{2+} release and the transition from phase1 to phase 2. Phase 1 represents a condition of a very high Ca^{2+} buffer capacity since there are large changes in the $[Ca^{2+}]_i$ with non-existent (particularly for IP_3Rs, [11]) or minimal reduction in the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ which is followed by phase 2 characterized by an abrupt reduction of the luminal Ca^{2+} buffering capacity, because there is a large reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ with a minimal effect on the $[Ca^{2+}]_i$. These two phases and the transition between them cannot be reproduced using SK condition of Ca^{2+} binding proteins, i.e. a condition where there is a fixed number of Ca^{2+} binding sites that reach saturation on increasing the $[Ca^{2+}]$. Interestingly, in skeletal muscle, a transition between phase 1 and phase 2 also produces an SR titration curve with a positive curvature instead of the negative curvature that is expected from the SK condition [30]. However, in this situation it has been argued that there is an increase of the Ca^{2+} binding cooperativity of the luminal SR proteins, which produces positive curvature for the relationship between the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ and the $[Ca^{2+}]_{TSR}$. The main disadvantage of this solution is that the higher the Hill coefficients, the smaller the window where the luminal SR Ca^{2+} binding proteins can effectively buffer the luminal Ca^{2+}. This goes in the opposite direction to what has been described for both SR and ER in the sense that they have a large Ca^{2+} buffering capacity [29]. Accordingly, our KonD condition can explain both an increasing Ca^{2+} buffer capacity and an SR Ca^{2+} buffering curve with a positive curvature. Both situations have been observed experimentally [11,16,30]. A very important difference between SK situation and KonD condition that becomes evident in Fig 6, is that in SK the reduction of the $[Ca^{2+}]$ increases the competition for free Ca^{2+} between the empty Ca^{2+} binding sites of the luminal proteins and the release channel, while this is not the case with the KonD condition because there is an obligatory reduction in the number of Ca^{2+} binding sites due to the

reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$. Additionally, this situation also explains why phase 1 is characterized by a large increase in the $[Ca^{2+}]_i$ with a minimal reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$. Actually, in some cases it has been observed that elevation of the $[Ca^{2+}]_i$, due to Ca^{2+} release from internal stores, is associated with an increase in the luminal $[Ca^{2+}]$ [6,11,31,32]. Importantly, this is basically impossible to achieve with the SK condition, but the KonD model will work, provided that the number of release channels that are open is not too large. Indeed, Ikemoto described how the activation of few RyRs in SR microsomes of skeletal muscle by low concentrations of polylysine produces a transient increase in the luminal SR $[Ca^{2+}]$ and that this effect is not seen when using saturating concentrations of polylysine [6]. This effect was due to the presence of calsequestrin associated to the membrane of the microsomes [26]. Likewise, we have observed that low concentrations of heparin, to partially inhibit IP_3Rs, induced a transient increase in the luminal $[Ca^{2+}]_{FSR}$ in response to the activation of muscarinic receptors in the same type of smooth muscle cell used in this work [11]. Interestingly, this partial inhibition of IP_3Rs resulted in larger, but short-lived, $[Ca^{2+}]_i$ responses to carbachol in agreement with the situation that the driving force for Ca^{2+} release was larger due to a higher luminal $[Ca^{2+}]_{SR}$ but involved a lower number of IP_3Rs [11]. Later on, it has been shown that spontaneous, slow Ca^{2+} waves in heart cells, unexpectedly associate with a simultaneous elevation of the $[Ca^{2+}]_{FSR;}$ while the coordinated activation by membrane depolarization of a larger number of RyRs shows the expected reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ and the increase of the $[Ca^{2+}]_i$ [32]. We think that this characteristic of RyRs and the fact that some RyRs are not associated with SR luminal Ca^{2+} binding proteins might explain why KonD model produces an exaggerated phase 1 for caffeine-induced Ca^{2+} release. Moreover, stimulation of Ca^{2+} release by activation of purinergic receptors in globet cells showed a clear elevation of the luminal ER $[Ca^{2+}]$ before any increase in the $[Ca^{2+}]_i$ [31]. In this case it was suggested that K^+ plays a key role as a counterion in Ca^{2+} release, a situation that has been already demonstrated since the Ca^{2+} release is strongly inhibited in the absence of K^+ [33]. Interestingly, HeLa cells incubated in the absence of external $[Ca^{2+}]$ show a similar amplitude of the histamine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response whether the free luminal ER $[Ca^{2+}]$ was either high or low [19]. These data suggest that release channels have access to a Ca^{2+} source that is different to the free luminal $[Ca^{2+}]$, most likely the Ca^{2+} bound to luminal ER Ca^{2+} binding proteins. Since globet and HeLa cells do not express calsequestrin, these observations also imply that there are other luminal Ca^{2+} binding proteins that function similarly to calsequestrin but in the ER. Actually, the double KO of calsequestrin did not inhibit Ca^{2+} release in skeletal muscle [34].

KonD model explains the refractory period of Ca^{2+} release despite normal luminal SR Ca^{2+} level

We have noticed that KonD model predicts a fast recovery of luminal $[Ca^{2+}]_{FSR}$ and a much slower recovery of the $[Ca^{2+}]_{TSR}$ (compare solid line of Fig 5B versus 5C and see Fig 7). This establishes a refractory period where there is recovery of $[Ca^{2+}]_{FSR}$ but not of the $[Ca^{2+}]_{TSR}$ so a second $[Ca^{2+}]_i$ response would be greatly diminished [4,11,21,35]. The opposite situation might happen where $[Ca^{2+}]_{FSR}$ can be reduced by leak but not the Ca^{2+} bound to proteins [18].

It has been suggested that Ca^{2+} release from the luminal proteins is more an "active" process than a "passive" one [6]. In other words, SK condition (which is a passive process) cannot explain the transient increase in the luminal $[Ca^{2+}]$. Additionally, Ikemoto proposes that Ca^{2+} release involves 3 stages: 1) conformational activation of release channels, 2) induction of Ca^{2+} release from the luminal proteins and the subsequent increase in the luminal $[Ca^{2+}]$ and 3) opening of release channels and Ca^{2+} moving from the SR to the cytoplasm [5–7,36]. In this regard, it has been described that a conserved glutamate in both RyRs and IP_3Rs can function

as a luminal Ca^{2+} sensor, where the increase in the luminal [Ca^{2+}] would trigger the opening of the release channel and allow Ca^{2+} movement to the cytoplasm [37].

Role of SERCA pumps in facilitating Ca^{2+} release

Inhibition of SERCA pumps reduces Ca^{2+} release and in general it has been assumed that this is due to depletion of the internal Ca^{2+} stores. However, this is not always the case, in pancreatic acinar cells the inhibition of SERCA pumps resulted in a slower Ca^{2+} release and disappearance of the Ca^{2+} gradients by a mechanism that does not involve the reduction of the luminal ER [Ca^{2+}] [8]. Additionally, SERCA pump activity potentiates histamine-induced Ca^{2+} release in HeLa cells [10]. Rapid inhibition of SERCA pump in heart cells results in a slower velocity of the Ca^{2+} wave without any reduction in the caffeine-sensitive store [9]. The opposite is also true, increased activity of SERCA pump due to overexpression of adrenergic receptors in heart cells results in higher and faster Ca^{2+} release in the absence of an increased loading of SR Ca^{2+} store [14]. SERCA pump inhibition in guinea pig urinary bladder smooth muscle cells results in a decreased amplitude and slower Ca^{2+} release for both RyRs and IP_3Rs [4], this was the case even when there is no reduction of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ [4,11]. Collectively, these data suggest that inhibition of SERCA pump slows Ca^{2+} release while its activation has the opposite effect. However, there is no clear explanation for this effect of SERCA pump. Our mathematical model suggest that inhibition of SERCA pump changes Ca^{2+} release from KonD condition to the less efficient SK situation, so this might explain the slower Ca^{2+} release. Additionally, it appears that there is also a reduction in the number of the release channels participating (k_f), so this might be the reason behind a lower amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ transient.

Alternative models to KonD conditions

KonD condition is the simplest solution, we were able to visualize for an SR Ca^{2+} buffering capacity with a positive curvature; however, although likely in the right direction might not be the right solution. This is because another characteristic of SR Ca^{2+} stores is that Ca^{2+} freely diffuses in the lumen, a condition that is not expected from the KonD condition. The most likely solution is that the trapping of Ca^{2+} by luminal SR Ca^{2+} binding proteins does not occur instantaneously because it depends on the conformational changes and aggregation of proteins, a situation that might take a longer time than the one required for free diffusion of Ca^{2+} in the lumen of SR, so KonD model should consider that the kinetics of dissociation of Ca^{2+} from luminal SR proteins is rather fast while the kinetics of association is rather slow.

A mathematical model of Ca^{2+} spark termination in heart cells has contemplated Ca^{2+} diffusion inside the SR [38,39]. Interestingly, this model says that Ca^{2+} diffusion coefficient in the non-junctional SR is 0.6 x 10^{-10} m^2 s^{-1} (as previously estimated, [40]) but considers that this coefficient is 5-fold larger in junctional SR, that is 3.5 x 10^{-10} m^2 s^{-1} [38,39]. However, this contrasts with the concentration of non-mobile calsequestrin. The model says that calsequestrin in the non-junctional SR is 6 mM (as previously estimated, [41]) while it says is 5-fold higher in the junctional SR (30 mM [38,39]). This situation is rather paradoxical because we think that a higher concentration of a non-mobile calsequestrin should become a barrier for Ca^{2+} diffusion. However, this apparent paradox stresses the importance of limiting the competition between calsequestrin and RyRs for free luminal Ca^{2+} to achieve an efficient Ca^{2+} release event. Here, we have obtained the same result by reducing the number of luminal Ca^{2+} binding sites driven by a reduction of the luminal SR [Ca^{2+}]. Alternatively, our results can be reproduced if the luminal Ca^{2+} binding proteins diffuse away from the RyRs during the opening of release channels. However, we think that this scenario is unlikely since there is no driving force for this to happen and this process might not be fast enough to avoid competition with RyRs for the free

luminal Ca^{2+}. Another scenario involves restricted diffusion of both Ca^{2+} and Mag-Fluo-4 (they are maintained in the bulk of the SR away from the RyRs), so they are not in rapid equilibrium with the calsequestrin, which is known to be associated with RyRs [42]. If the diffusion of Ca^{2+} between these two compartments is very low, then it is expected to see recovery of the free luminal SR Ca^{2+} level (provided that SERCA pumps are located where Mag-Fluo-4 is) even when the RyRs are still open (a situation that have not been observed). Alternatively, if the diffusion barrier is not that important, then the transition between phase 1 and phase 2 will not be clear. A situation that was observed only in the presence of thapsigargin. In conclusion, we think that our mathematical model stresses the importance of Ca^{2+} binding proteins rapidly switching from high to low Ca^{2+} buffering capacity during Ca^{2+} release event, and this provides enough free luminal Ca^{2+} for an efficient release by RyRs. How exactly this process is achieved inside the SR is not clear and deserves further studies.

Supporting Information

S1 Fig. Schematic representation. Graphical model of smooth muscle, not at scale, of the two intracellular compartments of interest, as well as those Ca^{2+} fluxes between these two compartments.
(TIF)

S2 Fig. Buffer capacity as a function of $[Ca^{2+}]$. (A) Typical relationship for a 3 mM Ca^{2+} binding protein with a K_D of 151.1μM using Eq (1.7). (B) Ca^{2+} buffering capacity for the same $[Ca^{2+}]$ as in A but using KonD model and Eq (1.19) with values indicated in the text.
(TIF)

S3 Fig. Fitting of different Ca^{2+} saturation levels of calsequestrin. Models of Ca^{2+} bound to calsequestrin as a function of $[Ca^{2+}]$; data replotted from Fig 5 of reference [28]. Data were fitted to a Hill equation. Fitting results suggests that the maximal number of Ca^{2+} binding sites (B_{max}) is increasing as a function of the $[Ca^{2+}]$. The inset shows the fitting for $[Ca^{2+}]$ in the range of 0–0.6mM. Park et al. have shown that blocking polymerization of calsequestrin inhibits this effect of increasing B_{max}, so B_{max} value stays around 22 for the whole range of $[Ca^{2+}]$ tested (triangle line) [28]. At least 5 points were used to calculate B_{max} value higher than 70.
(TIF)

S4 Fig. SK model cannot follow the recovery of the free luminal SR $[Ca^{2+}]$. In this case the gamma value used in the SK model (red line) was modified to fit the caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ response (blue line). Although there is now a good fitting of the $[Ca^{2+}]_i$ responses induced by caffeine, the time course of recovery of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ is much slower in the SK model than is recorded by the Mag-Fluo-4 indicator. This can be explained by considering that free and total Ca^{2+} go together in the SK model, while in the KonD model (see Figs 5 and 7) there is a rapid recovery of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ that precedes the recovery of the $[Ca^{2+}]_{TSR}$, which explains the presence of a refractory period due to the recovery of the $[Ca^{2+}]_{FSR}$ but not of the total, so the second caffeine-induced Ca^{2+} response is much smaller.
(TIF)

S1 Text. Parameter estimation.
(DOCX)

Acknowledgments

This model was deposited in Biomodels Database [43] and assigned the identifier MODEL 1406180001.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MS AGH. Performed the experiments: NLGV ADA. Analyzed the data: NCPR NLGV ADA MS AGH. Contributed reagents/materials/analysis tools: NCPR NLGV ADA MS AGH. Wrote the paper: NCPR MS AGH. Mathematical modelling: NCPR MS.

References

1. Clapham D.E., Calcium signaling, Cell. 80 (1995) 259–268. doi: 10.1016/0092-8674(95)90408-5 PMID: 7834745
2. Steenbergen J.M., Fay F.S., The quantal nature of calcium release to caffeine in single smooth muscle cells results from activation of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase., J. Biol. Chem. 271 (1996) 1821–1824. doi: 10.1074/jbc.271.4.1821 PMID: 8567621
3. Vangheluwe P., Raeymaekers L., Dode L., Wuytack F., Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca2 + ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications., Cell Calcium. 38 (2005) 291–302. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.033 PMID: 16105684
4. Gómez-Viquez L., Guerrero-Serna G., García U., Guerrero-Hernández A., SERCA pump optimizes Ca2+ release by a mechanism independent of store filling in smooth muscle cells., Biophys. J. 85 (2003) 370–80. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74481-6 PMID: 12829491
5. Ikemoto N., Yamamoto T., The luminal Ca2+ transient controls Ca2+ release/re-uptake of sarcoplasmic reticulum., Biochem. Biophys. Res. Commun. 279 (2000) 858–63. doi: 10.1006/bbrc.2000.4031 PMID: 11162440
6. Ikemoto N., Antoniu B., Kang J.J., Meszaros L.G., Ronjat M., Intravesicular calcium transient during calcium release from sarcoplasmic reticulum, Biochemistry. 30 (1991) 5230–5237. doi: 10.1021/bi00235a017 PMID: 2036390
7. Meszaros L.G., Ikemoto N., Conformational changes of the Ca2+-ATPase as early events of Ca2+ release from sarcoplasmic reticulum., J. Biol. Chem. 260 (1985) 16076–16079. http://www.jbc.org/content/260/30/16076.short (accessed April 9, 2015). PMID: 2933405
8. Lee M.G., Xu X., Zeng W., Diaz J., Kuo T.H., Wuytack F., et al., Polarized Expression of Ca2+ Pumps in Pancreatic and Salivary Gland Cells: ROLE IN INITIATION AND PROPAGATION OF [Ca2+] i WAVES, J. Biol. Chem. 272 (1997) 15771–15776. doi: 10.1074/jbc.272.25.15771 PMID: 9188473
9. Keller M., Kao J.P.Y., Egger M., Niggli E., Calcium waves driven by "sensitization" wave-fronts., Cardiovasc. Res. 74 (2007) 39–45. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.02.006 PMID: 17336953
10. Aguilar-Maldonado B., Gómez-Viquez L., García L., Del Angel R.M., Arias-Montaño J.A., Guerrero-Hernández A., Histamine potentiates IP3-mediated Ca2+ release via thapsigargin-sensitive Ca2+ pumps, Cell. Signal. 15 (2003) 689–697. doi: 10.1016/S0898-6568(03)00012-3 PMID: 12742229
11. Dagnino-Acosta A., Guerrero-Hernández A., Variable luminal sarcoplasmic reticulum Ca(2+) buffer capacity in smooth muscle cells., Cell Calcium. 46 (2009) 188–96. doi: 10.1016/j.ceca.2009.07.005 PMID: 19679350
12. Gómez-Viquez N.L., Guerrero-Serna G., Arvizu F., García U., Guerrero-Hernández A., Inhibition of SERCA pumps induces desynchronized RyR activation in overloaded internal Ca2+ stores in smooth muscle cells., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 298 (2010) C1038–46. doi: 10.1152/ajpcell.00222.2009 PMID: 20107042
13. Wang X., Huang G., Luo X., Penninger J.M., Muallem S., Role of regulator of G protein signaling 2 (RGS2) in Ca(2+) oscillations and adaptation of Ca(2+) signaling to reduce excitability of RGS2-/- cells., J. Biol. Chem. 279 (2004) 41642–9. doi: 10.1074/jbc.M406450200 PMID: 15292238
14. Zhou Y.Y., Song L.S., Lakatta E.G., Xiao R.P., Cheng H., Constitutive beta2-adrenergic signalling enhances sarcoplasmic reticulum Ca2+ cycling to augment contraction in mouse heart., J. Physiol. 521 Pt 2 (1999) 351–61. PMID: 10581307
15. Park H., Park I.Y., Kim E., Youn B., Fields K., Dunker A.K., et al., Comparing skeletal and cardiac calsequestrin structures and their calcium binding: a proposed mechanism for coupled calcium binding and protein polymerization., J. Biol. Chem. 279 (2004) 18026–33. doi: 10.1074/jbc.M311553200 PMID: 14871888
16. Guerrero-Hernandez A., Dagnino-Acosta A., Verkhratsky A., An intelligent sarco-endoplasmic reticulum Ca2+ store: Release and leak channels have differential access to a concealed Ca2+ pool, Cell Calcium. 48 (2010) 143–149. doi: 10.1016/j.ceca.2010.08.001 PMID: 20817294

17. Zima A. V., Picht E., Bers D.M., Blatter L. a., Termination of cardiac Ca2+ sparks: Role of intra-SR [Ca2+], release flux, and intra-SR Ca2+ diffusion, Circ. Res. 103 (2008). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.183236

18. Launikonis B.S., Zhou J., Royer L., Shannon T.R., Brum G., Ríos E., Depletion "skraps" and dynamic buffering inside the cellular calcium store., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 2982–2987. doi: 10.1073/pnas.0511252103 PMID: 16473932

19. Barrero M.J., Montero M., Alvarez J., Dynamics of [Ca2+] in the Endoplasmic Reticulum and Cytoplasm of Intact HeLa Cells: A COMPARATIVE STUDY, J. Biol. Chem. 272 (1997) 27694–27699. doi: 10.1074/jbc.272.44.27694 PMID: 9346910

20. Terentyev D., Kubalova Z., Valle G., Nori A., Vedamoorthyrao S., Terentyeva R., et al., Modulation of SR Ca release by luminal Ca and calsequestrin in cardiac myocytes: effects of CASQ2 mutations linked to sudden cardiac death., Biophys. J. 95 (2008) 2037–2048. doi: 10.1529/biophysj.107.128249 PMID: 18469084

21. a Guerrero J.J. Singer F.S. Fay, Simultaneous measurement of Ca2+ release and influx into smooth muscle cells in response to caffeine. A novel approach for calculating the fraction of current carried by calcium., J. Gen. Physiol. 104 (1994) 395–422. doi: 10.1085/jgp.104.2.395 PMID: 7807055

22. Gillespie D., Chen H., Fill M., Is ryanodine receptor a calcium or magnesium channel? Roles of K+ and Mg2+ during Ca2+ release, Cell Calcium. 51 (2012) 427–433. doi: 10.1016/j.ceca.2012.02.001 PMID: 22387011

23. Havlin S., V Buldyrev S., Goldberger a L., Mantegna R.N., Ossadnik S.M., Peng C.K., et al., Fractals in biology and medicine., Chaos. Solitons. Fractals. 6 (1995) 171–201. doi: 10.1136/jcp.48.1.93-b PMID: 11539852

24. Lytton J., Westlin M., Burk S.E., Shull G.E., MacLennan D.H., Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps, J. Biol. Chem. 267 (1992) 14483–14489. PMID: 1385815

25. Zhou Z., Neher E., Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells., J. Physiol. 469 (1993) 245–273. PMID: 8271200

26. Kirber M.T., Guerrero-Hernández a, Bowman D.S., Fogarty K.E., Tuft R. a, Singer J.J., et al., Multiple pathways responsible for the stretch-induced increase in Ca2+ concentration in toad stomach smooth muscle cells., J. Physiol. 524 Pt 1 (2000) 3–17. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-4-00003.x PMID: 10747180

27. Santillan M., On the Use of the Hill Functions in Mathematical Models of Gene Regulatory Networks, Math. Model. Nat. Phenom. 3 (2008) 85–97.

28. Park H., Park Y. Il, Kim E., Youn B., Fields K., Dunker a. K., et al., Comparing skeletal and cardiac calsequestrin structures and their calcium binding: A proposed mechanism for coupled calcium binding and protein polymerization, J. Biol. Chem. 279 (2004) 18026–18033. doi: 10.1074/jbc.M311553200 PMID: 14871888

29. Pozzo-Miller L.D., Pivovarova N.B., Connor J.A., Reese T.S., Andrews S.B., Correlated measurements of free and total intracellular calcium concentration in central nervous system neurons., Microsc. Res. Tech. 46 (1999) 370–9. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19990915)46:6<370::AID-JEMT5>3.0.CO;2–3 PMID: 10504214

30. Manno C., Sztretye M., Figueroa L., Allen P.D., Ríos E., Dynamic measurement of the calcium buffering properties of the sarcoplasmic reticulum in mouse skeletal muscle., J. Physiol. 591 (2013) 423–42. doi: 10.1113/jphysiol.2012.243444 PMID: 23148320

31. Nguyen T., Chin W.C., Verdugo P., Role of Ca2+/K+ ion exchange in intracellular storage and release of Ca2+., Nature. 395 (1998) 908–912. doi: 10.1038/27686 PMID: 9804425

32. Maxwell J.T., a Blatter L., Facilitation of cytosolic calcium wave propagation by local calcium uptake into the sarcoplasmic reticulum in cardiac myocytes., J. Physiol. 590 (2012) 6037–45. doi: 10.1113/jphysiol.2012.239434 PMID: 22988145

33. Hofer A.M., Schlue W.R., Curci S., Machen T.E., Spatial distribution and quantitation of free luminal [Ca] within the InsP3-sensitive internal store of individual BHK-21 cells: ion dependence of InsP3-induced Ca release and reloading., FASEB J. 9 (1995) 788–98. PMID: 7601343

34. Canato M., Scorzeto M., Giacomello M., Protasi F., Reggiani C., Stienen G.J.M., Massive alterations of sarcoplasmic reticulum free calcium in skeletal muscle fibers lacking calsequestrin revealed by a genetically encoded probe., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2010) 22326–22331. doi: 10.1073/pnas.1009168108 PMID: 21135222

35. Brochet D.X.P., Yang D., Di Maio A., Lederer W.J., Franzini-Armstrong C., Cheng H., Ca2+ blinks: rapid nanoscopic store calcium signaling., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 3099–3104. doi: 10.1073/pnas.0500059102 PMID: 15710901

36. Ikemoto N., Ronjat M., Meszaros L.G., Koshita M., Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum, Biochemistry. 28 (1989) 6764–6771. doi: 10.1021/bi00442a033 PMID: 2790030

37. Chen W., Wang R., Chen B., Zhong X., Kong H., Bai Y., et al., The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca2+ waves and Ca2+-triggered arrhythmias., Nat. Med. 20 (2014) 184–92. doi: 10.1038/nm.3440 PMID: 24441828

38. Laver D.R., Kong C.H.T., Imtiaz M.S., Cannell M.B., Termination of calcium-induced calcium release by induction decay: an emergent property of stochastic channel gating and molecular scale architecture., J. Mol. Cell. Cardiol. 54 (2013) 98–100. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.10.009 PMID: 23123322

39. Cannell M.B., Kong C.H.T., Imtiaz M.S., Laver D.R., Control of sarcoplasmic reticulum Ca2+ release by stochastic RyR gating within a 3D model of the cardiac dyad and importance of induction decay for CICR termination, Biophys. J. (2013). doi: 10.1016/j.bpj.2013.03.058

40. Wu X., Bers D.M., Sarcoplasmic reticulum and nuclear envelope are one highly interconnected Ca2+ store throughout cardiac myocyte, Circ. Res. (2006). doi: 10.1161/01.RES.0000233386.02708.72

41. Murphy R.M., Mollica J.P., Beard N.A., Knollmann B.C., Lamb G.D., Quantification of calsequestrin 2 (CSQ2) in sheep cardiac muscle and Ca2+-binding protein changes in CSQ2 knockout mice., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. (2011). doi: 10.1152/ajpheart.00902.2010

42. Baddeley D., Crossman D., Rossberger S., Cheyne J.E., Montgomery J.M., Jayasinghe I.D., et al., 4D super-resolution microscopy with conventional fluorophores and single wavelength excitation in optically thick cells and tissues., PLoS One. 6 (2011) e20645. doi: 10.1371/journal.pone.0020645 PMID: 21655189

43. Le Novère N., Bornstein B., Broicher A., Courtot M., Donizelli M., Dharuri H., et al., BioModels Database: a free, centralized database of curated, published, quantitative kinetic models of biochemical and cellular systems., Nucleic Acids Res. 34 (2006) D689–D691. doi: 10.1093/nar/gkj092 PMID: 16381960