



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

Curso Académico:

*Quisiera dedicar este Trabajo
Final de Grado a mi tutora
Lucía Romero Pérez por la
ayuda y dedicación. A mi
familia y amigos por su apoyo
todos estos años.*

RESUMEN

Hoy en día, la mayoría de los estudios relacionados con el comportamiento eléctrico del corazón y sus alteraciones consisten en ensayos experimentales, principalmente en animales. Una alternativa que se encuentra en auge son los modelos computacionales de cardiomiocitos. Estos modelos ofrecen numerosas ventajas frente a los ensayos experimentales entre las que destacan la gran reproducibilidad y repetibilidad y la posibilidad de realizar modificaciones para simular condiciones anómalas y sus tratamientos.

Las mutaciones en genes relacionados con las células cardiacas suelen derivar en alteraciones de la función celular que conllevan la aparición de fenómenos adversos como las arritmias. Los modelos computacionales pueden ser adaptados para reproducir los cambios experimentales observados en portadores de las mutaciones. Gracias a estos modelos personalizados es posible estudiar posteriormente los efectos que fármacos o tratamientos tienen sobre las células o el tejido.

En el trabajo final de grado presentado a continuación, se han desarrollado una serie de herramientas computacionales para evaluar el efecto de alteraciones en la dinámica de calcio. Las herramientas se han programado en Matlab y para facilitar su uso se ha creado una sencilla interfaz gráfica que implementa todas las funciones y permite realizar el análisis completo.

Para probar el funcionamiento de la herramienta, se ha realizado un análisis de sensibilidad de determinados biomarcadores electrofisiológicos con las velocidades de transición del modelo de Markov del canal de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (RyR2). Los biomarcadores estudiados son: el pico máximo del potencial de membrana, los valores máximos de la concentración de calcio en los compartimentos celulares, la probabilidad del estado abierto del canal RyR2, el tiempo de pico de la concentración intracelular de calcio, el pico máximo de la corriente de calcio tipo L (I_{CaL}) y el periodo del potencial de membrana (BCL *basic cycle length*). También se ha estudiado el efecto del desplazamiento de la compuerta de activación de la corriente I_{CaL} (dL). Este estudio de sensibilidad se ha utilizado para proponer un modelo de la mutación R420Q del RyR2 que reproduzca los cambios experimentales observados por Wang et al. (2017) para dicha mutación. Estos cambios se resumen en el aumento del tiempo de pico y del BCL y la disminución de la corriente I_{CaL} . Para ello, se ha utilizado el modelo de cardiomiocito del nodo sino-auricular de conejo desarrollado por Severi et al. (2012). La mutación R420Q del RyR2 se ha modelizado aplicando un desplazamiento de la compuerta dL de -3 mV y multiplicando por 30 el parámetro K_0Ca , del cual depende la velocidad de transición del estado cerrado al abierto del RyR2.

Palabras clave: Modelos computacionales, mutaciones cardiacas, canal RyR2, modelos de Markov, nodo sino-auricular, R420Q.

ABSTRACT

Nowadays, most of the studies related to the electrical behaviour of the heart and its alterations are experimental, mainly on animals. Computational models of cardiac myocytes are an alternative which is becoming more relevant in recent years. These models offer a wide range of advantages over experimental techniques, reproducibility, repeatability and the possibility of making modifications to simulate abnormal conditions and treatments being the most important.

Mutations in genes related to cardiac cells often results in alterations of the cellular function that may lead to adverse effects such as arrhythmia. Computational models can be modified to reproduce the experimental changes produced by a mutation. Further comprehension of the effect of treatments and drugs on cells and tissues can be achieved by using these models.

In this bachelor's degree final project, a series of software tools have been developed to analyse the effect of alterations in the calcium dynamics. The tools have been programmed on Matlab and a simple user interface has been created for facilitate its use.

A sensitivity analysis of certain biomarkers with the transition rates of the Markov model for the sarcoplasmic reticulum calcium release channel (RyR2) has been conducted by using these tools. The studied biomarkers are: maximum peak of the membrane potential, maximum value if the calcium concentration in the cell model compartments, RyR2 channel open state probability, time to peak of the intracellular calcium concentration, maximum peak of the type L calcium current (I_{CaL}) and the basic cycle length (BCL) of the action potential. The effects of a shift on the type L calcium current's activation gate (dL) have also been studied. The results of this sensitivity analysis have been used to propose a model for the RyR2's R420Q mutation based on the experimental changes reported by Wang et al. (2017). These changes are: increased time to peak of the intracellular calcium concentration and BCL as well as a decreased maximum peak of the I_{CaL} current. The rabbit sinus node model developed by Severi et al. (2012) has been used for this purpose. Finally, the RyR2's R420Q mutation has been modelled by applying a -3 mV shift in the activation gate dL and by multiplying by 30 the K_0Ca parameter, which is related to the close to open state transition velocity in the Markov model of the RyR2 channel.

Keywords: Computational models, cardiac mutations, RyR2 channel, Markov models, sinus node, R420Q.

RESUM

Avui dia, la majoria dels estudis relacionats amb el comportament elèctric del cor i les seues alteracions consisteixen en assajos experimentals, principalment en animals. Una alternativa que es troba en auge són els models computacionals de cardiomiòcits. Aquests models ofereixen nombrosos avantatges enfront dels assajos experimentals entre les quals destaquen la gran reproductibilitat i repetibilitat i la possibilitat de realitzar modificacions per a simular condicions anòmales i els seus tractaments.

Les mutacions en gens relacionats amb les cèl·lules cardíques solen derivar en alteracions de la funció cel·lular que comporten l'aparició de fenòmens adversos com les arítmies. Els models computacionals poden ser adaptats per a reproduir els canvis experimentals observats en portadors de les mutacions. Gràcies a aquests models personalitzats és possible estudiar posteriorment els efectes que fàrmacs o tractaments tenen sobre les cèl·lules o el teixit.

En el treball final de grau presentat a continuació, s'han desenvolupat una sèrie d'eines computacionals per a avaluar l'efecte d'alteracions en la dinàmica de calci. Les eines s'han programat en Matlab i per a facilitar el seu ús s'ha creat una senzilla interfície gràfica que implementa totes les funcions i permet realitzar l'anàlisi completa.

Per a provar el funcionament de l'eina, s'ha realitzat una anàlisi de sensibilitat de determinats biomarcadors electrofisiològics amb les velocitats de transició del model de Markov del canal d'alliberament de calci del reticle sarcoplasmàtic (RyR2). Els biomarcadors estudiats són: el pic màxim del potencial de membrana, els valors màxims de la concentració de calci en els compartiments cel·lulars, la probabilitat de l'estat obert del canal RyR2, el temps de pic de la concentració intracel·lular de calci, el pic màxim del corrent de calci tipus L (I_{CaL}) i el període del potencial de membrana (BCL *basic cycle length*). També s'ha estudiat l'efecte del desplaçament de la comporta d'activació del corrent I_{CaL} (dL). Aquest estudi de sensibilitat s'ha utilitzat per a proposar un model de la mutació R420Q del RyR2 que reproduísca els canvis experimentals observats per Wang et al. (2017) per aquesta mutació. Aquests canvis es resumeixen en l'augment del temps de pic i del BCL i la disminució del corrent I_{CaL} . Per a açò, s'ha utilitzat el model de cardiomiòcit del node sinó-auricular de conill desenvolupat per Severi et al. (2012). La mutació R420Q del RyR2 s'ha modelitzat aplicant un desplaçament de la comporta dL de -3 mV i multiplicant per 30 el paràmetre K_0Ca , del com depèn la velocitat de transició de l'estat tancat a l'obert del RyR2.

Paraules clau: Models computacionals, mutacions cardíques, canal RyR2, models de Markov, node sinó-auricular, R420Q.

ÍNDICE DE LA MEMORIA

1.	MOTIVACIÓN	3
2.	OBJETIVOS	4
3.	INTRODUCCIÓN	5
3.1.	ANATOMOFISIOLOGÍA	5
3.2.	ELECTROFISIOLOGÍA	7
3.3.	MEMBRANA CELULAR	9
3.4.	POTENCIALES DE ACCIÓN	12
3.5.	ARRITMIAS CARDIACAS	14
3.6.	MUTACIONES GENÉTICAS	15
3.7.	MODELADO BIOELÉCTRICO	16
3.8.	MODELOS DE MARKOV	18
4.	DISEÑO DE SOFTWARE	21
4.1.	HERRAMIENTAS	21
4.2.	INTERFAZ GRÁFICA Y MANUAL DE USUARIO	26
5.	RESULTADOS	34
5.1.	ANÁLISIS SENSIBILIDAD RYR2	35
5.2.	ANÁLISIS MODELO MARKOV	37
5.3.	ANÁLISIS DEL DESPLAZAMIENTO DE LA COMPUERTA DE ACTIVACION DE I_{Ca}	41
6.	CONCLUSIONES	49
7.	LÍNEAS FUTURAS	51
8.	BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1.	INTRODUCCIÓN	55
2.	PRESUPUESTO DETALLADO	55
2.1.	COSTE DE MANO DE OBRA	55
2.2.	COSTE DE HARDWARE	56
2.3.	COSTE DE SOFTWARE	56
3.	PRESUPUESTO FINAL	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Localización del corazón en la caja torácica. Tomada de Drake et al. (2010).	5
Figura 2: A. Estructura interna del corazón con las cavidades, vasos y válvulas. B. Representación esquemática de los circuitos circulatorios. Tomado de Drake et al. (2010).	6
Figura 3: Representación de los cambios de presión y volumen que tienen lugar en las diferentes estructuras cardíacas durante el ciclo cardíaco. Modificado de Hall & Guyton (2011).	7
Figura 4: Esquema de la interconexión de los cardiomiocitos. Tomado de Hall & Guyton (2011).	8
Figura 5: Sistema de conducción cardíaco. Tomado de Costanzo (2011).	9
Figura 6: Estructura de la membrana celular, bicapa lipídica, proteínas integradas y canales. Tomado de Raisman & González (2013).	9
Figura 7: Concentraciones de los iones más abundantes en los medios intra y extracelulares. .	10
Figura 8: Esquema del movimiento de los principales iones entre el medio intra y extracelular cuando el potencial de membrana es negativo. Tomado de Ferrero y de Loma-Osorio (2016). 12	
Figura 9: Representación del potencial de acción del nodo sino-auricular y las principales corrientes que lo conforman. Las flechas de las corrientes apuntando hacia arriba indican que son entrantes al citoplasma celular, hacia abajo que son salientes. Modificado de Manfredi et al. (2013).	13
Figura 10: Circuito equivalente de una célula. Tomado de Ferrero y de Loma-Osorio (2016).	16
Figura 11: Modelo celular de cardiomiocito del nodo SA. Tomado de Severi et al. (2012)	18
Figura 12: Modelo de Markov de un canal iónico con cuatro estados. Tomado de Rudy & Silva (2006).	19
Figura 13: Modelo de Markov del canal RyR2 utilizado en el modelo. Tomado de Stern et al. (1999).	20
Figura 14: Ejemplo de tabla de sensibilidad obtenida con la herramienta TablaSensibilidadFn. Se representa la tendencia de las variables I _{CaL} y O al modificar los parámetros K _{OCa} y Kim. .	23
Figura 15: Ejemplo de gráfica obtenida con la herramienta GraficosParametrosFn. Se representa el potencial de membrana para diferentes variaciones del parámetro K _{om} (multiplicar y dividir por 3 y 10).	24
Figura 16: Ejemplo de gráfica obtenida con la herramienta GraficoComparativoFn. Se representa la variación de la concentración intracelular de calcio para modificaciones de los parámetros Kim y K _{om}	25
Figura 17: Ventana de inicio de la interfaz gráfica, desde aquí se ejecuta el resto de herramientas.	27
Figura 18: Cuadro de confirmación para cerrar la interfaz gráfica.	27
Figura 19: Ventana de la interfaz para realizar las tablas de sensibilidad.	28
Figura 20: Ventana de error al dejar vacío el campo parámetros, si se dejan en blanco los otros campos se genera un mensaje similar.	29
Figura 21: Cuadro de confirmación de la ejecución	29
Figura 22: Ventana de la interfaz para realizar los gráficos de últimos pulsos por parámetros.	30
Figura 23: Ventana de introducción de título.	31
Figura 24: Ventana de la interfaz para la simulación del protocolo de voltage clamp.	32
Figura 25: Mensaje de error en caso de introducir un cero en los intervalos.	33

Figura 26: Mensaje de error en caso de introducir un valor negativo de intervalo y un valor superior de máximo que mínimo.....	33
Figura 27: Alerta en caso de introducir un carácter no numérico en los campos.....	33
Figura 28: Tabla de sensibilidad del modelo del nodo sino-auricular de humano de Fabbri et al. (2017). La sensibilidad se ha calculado siguiendo las ecuaciones 12, 13 y 14, considerando la simulación multiplicando por 10 menos la dividiendo entre 10. El color azul indica que al aumentar el parámetro disminuye la variable mientras que el rojo indica lo contrario. Los números indican el valor de la sensibilidad, de forma que cuanto mayor sea su valor mayor será el cambio de la variable al aumentar el parámetro.	36
Figura 29: Tabla de sensibilidad para el modelo de célula del nodo sino-auricular de conejo desarrollado por Severi et al.(2012).	37
Figura 30: Resultados proporcionados por la herramienta GráficosParámetrosFn al modificar el parámetro K_{Ca_Kim} , se muestran todas las simulaciones realizadas. A. Concentración de calcio intracelular durante los dos últimos pulsos de la simulación. B. Evolución de la corriente de calcio de los canales tipo L durante los dos últimos pulsos de la simulación. C. Potencial de membrana durante los dos últimos pulsos de la simulación. D. Tiempo de pico de la concentración intracelular de calcio del último pulso. E. BCL, periodo del potencial de acción de la simulación.....	38
Figura 31: Evolución del BCL al modificar cada uno de los parámetros.	39
Figura 32: Evolución de la corriente de calcio tipo L al modificar cada uno de los parámetros.	40
Figura 33: Evolución del tiempo de pico al modificar cada uno de los parámetros.	40
Figura 34: Resultados del protocolo de voltage clamp para la corriente de calcio tipo L del modelo de conejo.	42
Figura 35: Evolución del BCL al aplicar un desplazamiento de -3 mV en la compuerta de activación de la I _{CaL} y modificar los parámetros del modelo de Markov del RyR2. El punto en negro representa el valor del BCL en control, sin alterar dL.	43
Figura 36: Evolución del tiempo de pico al aplicar un desplazamiento de -3 mV en la compuerta de activación de la I _{CaL} y modificar los parámetros del modelo de Markov del RyR2. El punto en negro representa el valor del tiempo de pico en control, sin alterar dL.....	44
Figura 37: Evolución del pico máximo de la I _{CaL} al aplicar un desplazamiento de -3 mV en la compuerta de activación de la I _{CaL} y modificar los parámetros del modelo de Markov del RyR2. El punto en negro representa el valor del pico en control, sin alterar dL.....	44
Figura 38: Evolución temporal de la concentración intracelular de calcio de los últimos pulsos de la simulación con un desplazamiento de la compuerta dL de -3 mV y multiplicando por 30 K_{Ca} (modelo de la mutación R420Q del RyR2), y en control.....	46
Figura 39: Evolución temporal de la I _{CaL} calcio de los últimos pulsos de la simulación con un desplazamiento de la compuerta dL de -3 mV y multiplicando por 30 K_{Ca} (modelo de la mutación R420Q del RyR2), y en control.....	47
Figura 40: Evolución temporal del BCL de los últimos pulsos de la simulación con un desplazamiento de la compuerta dL de -3 mV y multiplicando por 30 K_{Ca} (modelos de la mutación R420Q del RyR2), y en control.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentraciones iónicas iniciales del protocolo de voltage clamp.	26
Tabla 2: Porcentajes de variación del BCL, tiempo de pico y pico máximo de la corriente de calcio tipo L frente a cambios en $KOCa$	45
Tabla 3: Porcentajes de variación del BCL, tiempo de pico y pico máximo de la corriente de calcio tipo L frente a cambios en $KiCa$	45
Tabla 4: Porcentajes de variación del BCL, tiempo de pico y pico máximo de la corriente de calcio tipo L frente a cambios en $KOCa_{Kim}$	45
Tabla 5: Desglose de los costes de mano de obra del trabajo.	55
Tabla 6: Desglose de los costes de hardware del trabajo.	56
Tabla 7: Desglose de los costes de software del trabajo.	57
Tabla 8: Coste total del trabajo.	57

MEMORIA

1. MOTIVACIÓN

En los últimos años, los avances tecnológicos, han permitido tener un mayor conocimiento sobre los genes y sus alteraciones. Gracias a ello, surge el concepto de medicina personalizada, en la cual las estrategias de tratamiento se planifican atendiendo al genotipo, proteínas y ambiente del paciente.

Las mutaciones genéticas cardíacas suelen desencadenar problemas relacionados con la generación de arritmias potencialmente mortales. Conocer el genotipo, fenotipo y ser capaces de reproducir sus efectos es de gran importancia para el tratamiento de las mismas. En los últimos años se han descubierto mutaciones en las proteínas que controlan la dinámica de calcio que pueden contribuir al desarrollo de arritmias cardíacas como la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica y otras arritmias supraventriculares.

Los modelos celulares computacionales son una herramienta muy útil para hacer frente a los problemas antes descritos. Seleccionando el modelo deseado se pueden realizar tantas modificaciones como se deseen para intentar reproducir el comportamiento de la mutación. Además, es posible realizar modelos personalizados que se ajusten al comportamiento de cada paciente y sobre los que estudiar el efecto de tratamientos o fármacos. Gracias a estas ventajas, los modelos computacionales han ganado importancia recientemente.

En este trabajo, se han desarrollado herramientas que permiten analizar el efecto de alteraciones en la dinámica de calcio celular, en concreto en el canal de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (RyR2) y la corriente I_{CaL} . Posteriormente, se ha ajustado un modelo computacional para reproducir los datos experimentales de la mutación R420Q del RyR2, que es una mutación que se ha relacionado con taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica y otras arritmias supraventriculares.

2. OBJETIVOS

El Trabajo Final de Grado comprende la elaboración de un proyecto original en que se pongan de manifiesto las competencias adquiridas a lo largo del Grado de Ingeniería Biomédica. Este proyecto en particular se enmarca en el área de bioelectricidad y, más concretamente, en la actividad eléctrica cardíaca.

El objetivo principal del proyecto es el desarrollo de herramientas *software* que permitan estudiar el efecto que determinadas alteraciones tienen sobre la dinámica de calcio celular.

Los objetivos secundarios que se derivan del desarrollo de la herramienta son:

- Implementar el cálculo del tiempo de pico de la concentración intracelular de calcio y el periodo del potencial de acción (BCL *basic cycle length*).
- Implementar las ecuaciones para la obtención de la sensibilidad de los biomarcadores.
- Seleccionar un modelo del nodo sino-auricular que contemple los dos relojes celulares, el de membrana y el de calcio.
- Desarrollar las rutinas para la elaboración de los diferentes tipos de gráficas.
- Realizar un estudio de sensibilidad de los biomarcadores seleccionadas con las velocidades de transición del modelo de Markov del RyR2 y el desplazamiento de la compuerta de activación de la I_{CaL} (dL).
- Desarrollo de un modelo que se ajuste a los datos experimentales observados en la mutación R420Q del RyR2.
- Desarrollar una interfaz de usuario que facilite el uso de las herramientas elaboradas.

3. INTRODUCCIÓN

A continuación, se realizará una introducción a la morfología y fisiología del corazón, así como del aparato circulatorio, con el objetivo de entender los conceptos expuestos posteriormente y el comportamiento del órgano en cuestión.

3.1. ANATOMOFISIOLOGÍA

El corazón es el principal órgano del sistema circulatorio, se trata de una bomba muscular con capacidad contráctil que genera suficiente presión para desplazar la sangre por todo el cuerpo. Gracias a esta capacidad realiza su función, suministrar nutrientes y oxígeno al resto de tejidos y retirar los productos de deshecho que los mismos producen.

En cuanto a su localización anatómica, el corazón se sitúa en la parte central del tórax, en el mediastino medio e inferior. Tiene forma piramidal con el vértice hacia abajo e inclinado hacia la izquierda. Su base se encuentra en la parte superior, de la que surgen los grandes vasos. En relación con el resto de órganos, se localiza entre los dos pulmones, apoyado sobre el diafragma y detrás del esternón. En la figura 1 se presenta un esquema del torso con la localización anatómica del corazón.

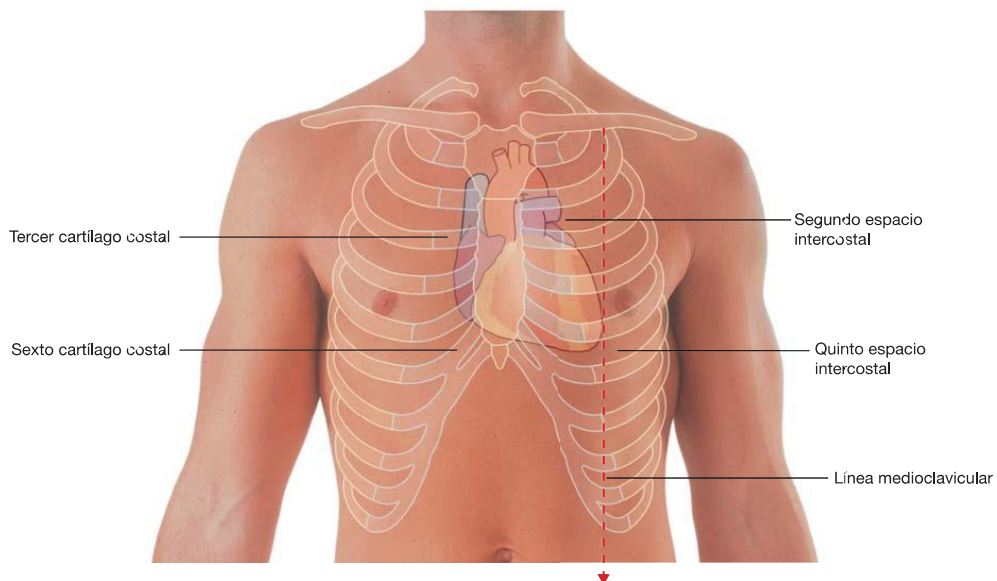


Figura 1: Localización del corazón en la caja torácica. Tomada de Drake et al. (2010).

El corazón es un órgano hueco que presenta cuatro cavidades, dos superiores llamadas aurículas y dos inferiores llamadas ventrículos. La aurícula y ventrículo derechos (AD y VD respectivamente) se encuentran comunicados por la válvula tricúspide mientras que sus homólogos del lado izquierdo (AI y VI) lo están por la válvula mitral. Estas cuatro cámaras, junto con los vasos sanguíneos, conforman dos circuitos circulatorios que se encargan de llevar la sangre al resto del organismo (figura 2-B). A continuación se explicaran dichos circuitos:

- **Circulación mayor:** También llamada sistémica ya que es la que lleva la sangre cargada de oxígeno y nutrientes a todo el organismo y recoge los productos de deshecho del mismo. Comienza en el VI que impulsa la sangre hacia la arteria aorta, la sangre realiza su recorrido por el cuerpo y finalmente retorna al corazón a través de las venas cavas (superior e inferior) que se insertan en la aurícula derecha. El mayor tamaño de este circuito justifica el hecho de que la pared muscular del ventrículo izquierdo sea más gruesa que la del derecho.
- **Circulación menor:** También llamada pulmonar, se trata de un circuito de menor envergadura. La sangre desoxigenada que ha llegado a la aurícula derecha pasa al ventrículo derecho y de ahí es bombeada a través de las arterias pulmonares que, como su nombre indica, conducen el fluido hacia los pulmones. Allí tiene lugar el intercambio gaseoso donde la sangre se vuelve a oxigenar. Dicha sangre retorna por las venas pulmonares a la aurícula izquierda y comienza el ciclo de nuevo.

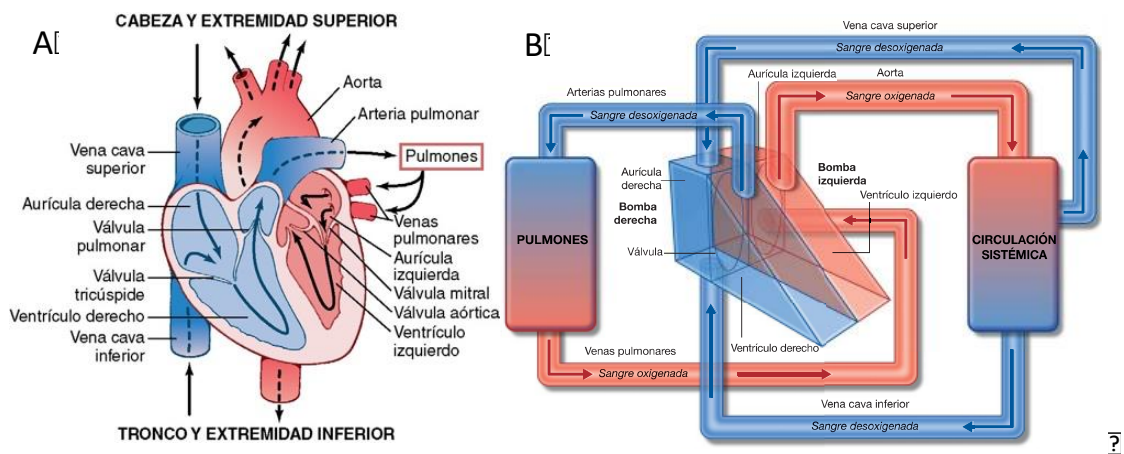


Figura 2: A. Estructura interna del corazón con las cavidades, vasos y válvulas. B. Representación esquemática de los circuitos circulatorios. Tomado de Drake et al. (2010).

El ciclo cardiaco comprende todos los eventos mecánicos que ocurren en el corazón de forma periódica y que permiten el correcto flujo sanguíneo. En este ciclo, existen dos procesos principales, la sístole o contracción y la diástole o relajación.

Durante la sístole, la presión intraventricular es inferior a la existente en las aurículas, esta diferencia de presión provoca la apertura de las válvulas aurículo-ventriculares (AV) y el flujo de sangre hacia los ventrículos que se van llenando rápidamente. Posteriormente se produce un pequeño flujo de sangre directamente de las venas a los ventrículos, llamado diástasis. Por último, esta fase termina con la sístole auricular, en la que se contraen dichas cavidades y se termina de expulsar la sangre hacia su ventrículo correspondiente.

A continuación, se produce la sístole. Durante esta etapa se produce la expulsión de la sangre de los ventrículos a través de las arterias. La sístole comienza con una contracción isovolumétrica (sin cambio de volumen) que incrementa la presión intraventricular hasta que se produce la apertura de las válvulas aórtica y pulmonar. De esta forma, la sangre empieza a salir de los ventrículos hacia el organismo. Pasado un tiempo, esa contracción pierde eficacia y el flujo saliente de sangre decrece. En ese momento se produce una contracción muscular apreciable que termina de vaciar los ventrículos. A continuación,

tiene lugar la relajación ventricular, que hará descender la presión para que comience de nuevo la diástole. Cabe mencionar que en la última etapa (la relajación) la sangre intenta retornar de las arterias a los ventrículos, sin embargo las válvulas aórtica y pulmonar se cierran evitando el retorno (Ferrero Corral et al., 1994; Hall & Guyton, 2011).

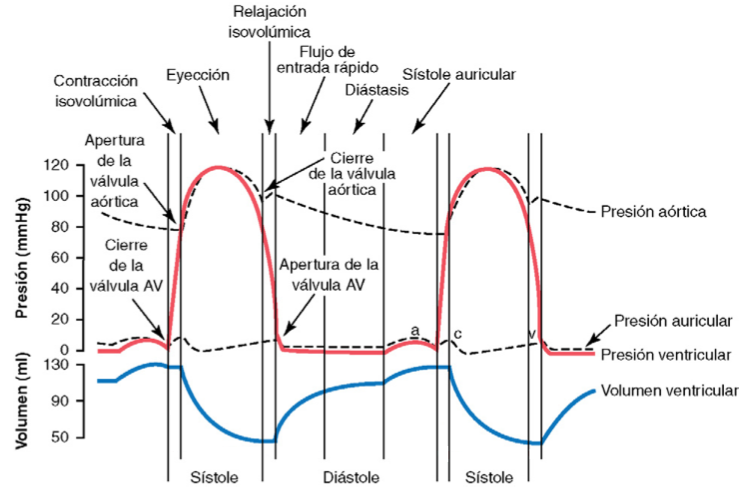


Figura 3: Representación de los cambios de presión y volumen que tienen lugar en las diferentes estructuras cardiacas durante el ciclo cardíaco. Modificado de Hall & Guyton (2011).

3.2. ELECTROFISIOLOGÍA

El corazón es un músculo y, como tal, está formado por células musculares o cardiomiocitos. Estas células son un tipo especial de células musculares solo presentes en este órgano y que poseen características de las células estriadas (contracción fuerte) y de las células lisas (contracción involuntaria). Existen tres tipos fundamentales de cardiomiocitos:

- **Nodales:** Su principal característica es la autoexcitabilidad, por la cual son capaces de generar impulsos excitatorios de forma autónoma. No poseen excesiva capacidad contráctil.
- **Conductores:** Se ocupan de trasladar los impulsos eléctricos generados en los nodales al resto de miocitos cardiacos. También poseen capacidad contráctil reducida.
- **Trabajo:** Las células musculares de trabajo se encargan de producir la contracción efectiva del órgano. Existen miocitos de trabajo auricular y ventricular.

Los miocitos cardiacos se organizan en fibras conectadas a través de unas estructuras denominadas *gap junctions* que permiten la transmisión de los potenciales de acción (PA). De esta manera se genera una red de miocitos que permiten al corazón comportarse como un sincitio funcional que se contrae de forma sincrona (tanto en las aurículas como en los ventrículos) (Hall & Guyton, 2011).



Figura 4: Esquema de la interconexión de los cardiomiocitos. Tomado de Hall & Guyton (2011).

En cuanto al sistema de excitación y conducción eléctrica responsable de generar los potenciales de acción y transmitirlos al resto de cardiomiocitos, este comienza en el nodo sinoauricular (SA). Dicho nodo se sitúa en la pared posterolateral superior de la aurícula derecha y se compone fundamentalmente de cardiomiocitos nodales. La principal característica de esta región es la autoexcitabilidad que permite a los cardiomiocitos generar impulsos eléctricos rítmicos que se transmiten al resto del órgano. La frecuencia de disparo del nodo puede ser regulada mediante neurotransmisores en función de las necesidades fisiológicas de los individuos.

Tras el disparo del potencial de acción, éste se propaga por las aurículas, excitando el tejido y produciendo la contracción auricular a su paso. Una vez ha recorrido todas las aurículas, el estímulo llega al nodo AV que separa las aurículas de los ventrículos. La principal función de este nodo es ralentizar la propagación del impulso para permitir un correcto bombeo sanguíneo. Además, el nodo AV actúa de filtro, de manera que si en las aurículas se produce una frecuencia de disparo excesivamente elevada, el nodo impide que todos esos impulsos lleguen a los ventrículos y desencadenen consecuencias graves. Al tratarse de cardiomiocitos nodales, éstos también poseen capacidad de autoexcitación, sin embargo su frecuencia de disparo es inferior a la del nodo SA y solo actúa como marcapasos si dicho nodo falla.

Finalmente, el impulso llega a los ventrículos y se propaga por el haz de His, que se encuentra localizado en el tabique interventricular. Posteriormente éste se divide en dos ramas, llamadas fibras de Purkinje, que conducen el impulso a los ventrículos permitiendo la contracción de los mismos desde la ápex hasta las aurículas y la correcta expulsión de la sangre (Hall & Guyton, 2011). En la figura 5 se presenta un esquema del sistema de conducción.

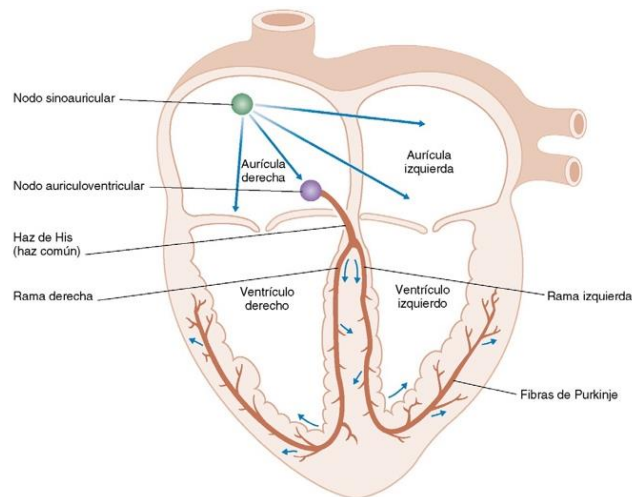


Figura 5: Sistema de conducción cardíaco. Tomado de Costanzo (2011).

3.3. MEMBRANA CELULAR

La membrana celular es una bicapa lipídica fina, elástica y flexible. Posee un grosor de entre 7.5 y 10 nm y su función es separar el medio extracelular del intracelular. La membrana celular está compuesta de fosfolípidos y proteínas. Los primeros son moléculas anfipáticas que poseen una zona polar orientada hacia los medios intra y extracelulares y una zona apolar hacia el interior, conformando así la bicapa. En cuanto a las proteínas, éstas se pueden localizar en cualquiera de las dos caras de la bicapa o incluso atravesarla por completo formando canales que atraviesan la membrana. Estas proteínas realizan funciones diversas, como la unión celular, protección, reconocimiento celular, etc. En la figura 6 se presenta un esquema de la estructura de la membrana (Hall & Guyton, 2011).

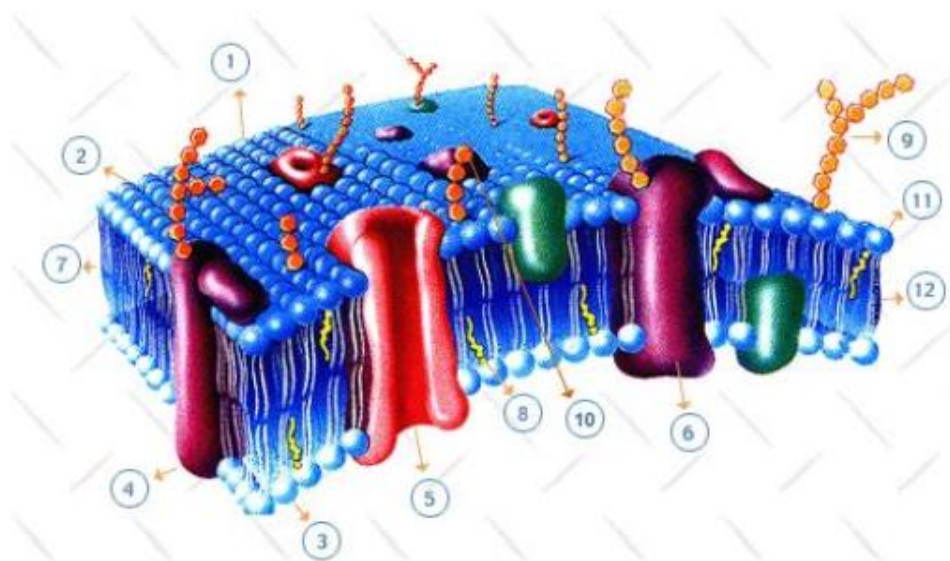


Figura 6: Estructura de la membrana celular, bicapa lipídica, proteínas integradas y canales. Tomado de Raisman & González (2013).

Como se ha comentado anteriormente, la membrana se encarga de separar el interior de la célula del medio extracelular, sin embargo también actúa de mediador entre dichos compartimentos. Una de las principales funciones de esta estructura y la que interesa para el estudio es el transporte iónico a través de la membrana. Este transporte permite regular el equilibrio de las concentraciones iónicas durante el reposo. La alteración cíclica de dicho equilibrio es la responsable de la generación de los potenciales de acción (Ferrero Corral et al., 1994; Hall & Guyton, 2011). En la figura 7 se presenta un gráfico con los principales iones intra y extracelulares y sus proporciones en cada medio.

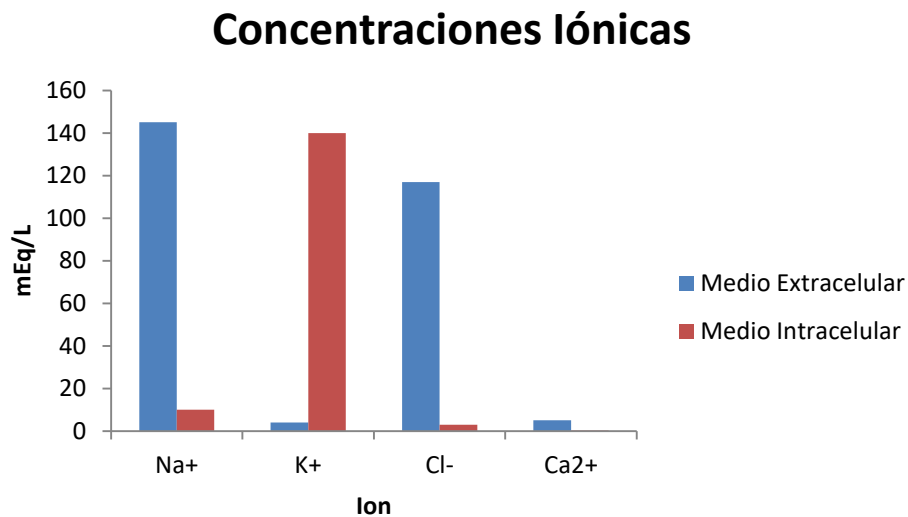


Figura 7: Concentraciones de los iones más abundantes en los medios intra y extracelulares.

Como se ha mencionado, la alteración del equilibrio iónico es la responsable del disparo de los potenciales de acción. Este desequilibrio se consigue mediante el transporte de iones a través de la membrana. Dicho transporte está gobernado por dos tipos de fuerzas:

- **Difusión:**

Este tipo de fuerzas se generan por las diferencias existentes en las concentraciones de los iones entre los dos medios. Siempre que dichas concentraciones no sean iguales y los iones se puedan desplazar se producirá un flujo iónico a favor del gradiente de concentración, es decir, de las zonas con mayor concentración a las de menor.

Dado que la membrana celular separa los medios extra e intracelular los iones deben atravesarla. Las proteínas de membrana son las que se encargan de regular dicho intercambio iónico. En función de la necesidad o no de gasto energético para realizar el transporte iónico se pueden distinguir dos mecanismos:

- **Mecanismos pasivos:** No necesitan aporte energético para que se produzca el transporte iónico, ya que éste tiene lugar a favor de las fuerzas de difusión, a favor del gradiente. Existen tres tipos diferentes de mecanismos pasivos:

- **Canales iónicos:** Son proteínas transmembrana que forman un poro deformable a través del cual se produce una difusión selectiva (tan solo ciertos tipos de iones pueden atravesar cada canal). Los canales se cierran y abren permitiendo el paso de sustancias en función de las condiciones del medio (químicas, temperatura, estímulos, etc.)
 - **Difusión simple:** Algunos iones y moléculas de pequeño tamaño pueden atravesar la membrana directamente, si bien esta tiene una permeabilidad baja y esta difusión es de pequeño orden de magnitud.
 - **Intercambiadores y co-transportadores:** Realizan un fenómeno conocido como difusión facilitada, por el cual se aprovecha el transporte a favor de gradiente de un ion para transportar otro diferente en contra de su gradiente.
- **Mecanismos activos:** Estos mecanismos requieren de un aporte energético externo suministrado por la desfosforilación del adenosin trifosfato (ATP). Con esta energía transportan iones en contra de su gradiente de concentración. Ejemplos de estos mecanismos son las bombas de sodio-potasio y la de calcio (Ferrero Corral et al., 1994; Ferrero y de Loma-Osorio, 2016).

- **Campo eléctrico**

Es el segundo mecanismo, complementario a la difusión por gradiente de concentración. Al ser los iones moléculas cargadas, su presencia en diferente proporción en los medios intra y extracelular provoca una diferencia de potencial entre los medios, por lo que los iones se desplazarán en ese campo eléctrico en función de su carga.

A la diferencia de potencial antes descrita se le denomina potencial de membrana (V_m) y se calcula como la diferencia entre el potencial intracelular (V_i) y el extracelular (V_e).

$$V_m = V_i - V_e \quad (\text{Ec. 1})$$

Observando la ecuación 1 podemos distinguir tres situaciones: que el potencial de membrana sea positivo, negativo o cero. Para las explicaciones posteriores no consideraremos el caso transitorio cuando el potencial es cero. A continuación, se explicará la situación en la que el potencial es positivo ($V_i > V_e$). En primer lugar, se expondrá el efecto exclusivo del campo eléctrico en los principales iones y, posteriormente, se añadirá el efecto de la difusión.

- **Na⁺, Ca⁺² y K⁺:** Al tener carga positiva, en la situación en la que nos encontramos estos iones tenderán a salir de la célula por el campo eléctrico.
- **Cl⁻:** Dado que su carga es negativa tenderá a entrar en la célula si el potencial de membrana es positivo.

Cuando ponemos en conjunto los efectos de las fuerzas de difusión y campo eléctrico pueden darse dos situaciones: que ambas empujen a los iones en el mismo sentido o que estas se opongan. A continuación, se explicará lo que sucede para cada ión:

- **Na⁺ y Ca²⁺**: Como se apreciaba en la figura 7, estos iones tienden a entrar en la célula por difusión al ser la concentración intracelular de los mismos superior a la extracelular. Sin embargo por campo eléctrico, si el potencial de membrana es positivo, tenderán a salir de la célula. Dado que estas dos fuerzas son de una magnitud similar, la oposición de las mismas genera una corriente resultante nula.
- **Cl⁻ y K⁺**: En este caso el ion cloro tiende a entrar en la célula por difusión mientras que el ion potasio tiende a salir de la misma por difusión. En ambos casos el sentido de esta fuerza es el mismo que el de campo eléctrico por lo que la resultante será una entrada de cloro y salida de potasio.

En la figura 8 se han representado las fuerzas de difusión (DIF) y campo eléctrico (ELE) de los principales iones, además algunas bombas e intercambiadores presentes en la membrana como el co-transportador de K⁺/Cl⁻, el intercambiador Na⁺/Ca²⁺, la bomba Na⁺/K⁺ y la bomba de Ca²⁺.

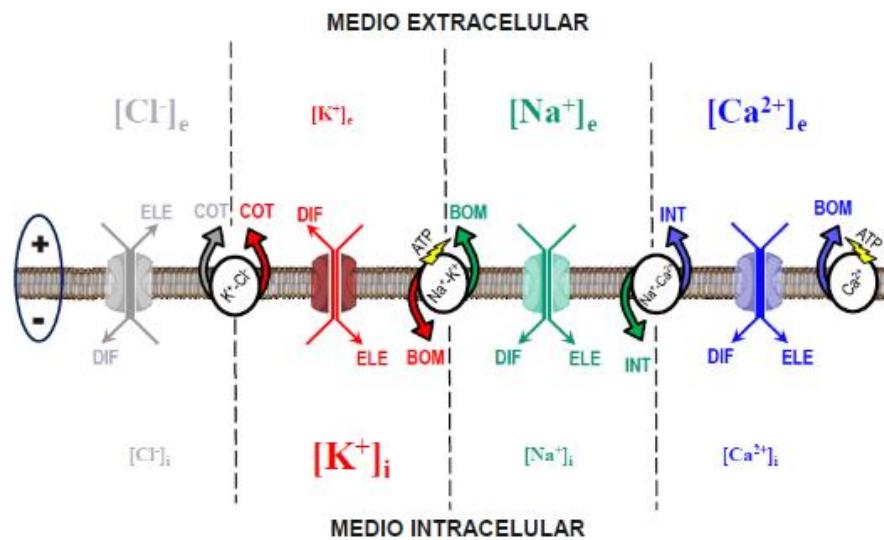


Figura 8: Esquema del movimiento de los principales iones entre el medio intra y extracelular cuando el potencial de membrana es negativo. Tomado de Ferrero y de Loma-Osorio (2016).

Como se puede observar, en la figura 8 se representa la situación opuesta a la explicada anteriormente.

3.4. POTENCIALES DE ACCIÓN

Los potenciales de acción son la principal señal eléctrica de las células excitables, es decir, las neuronas y células musculares. Estos potenciales son la forma de transmisión de los estímulos excitatorios. Los impulsos se transmiten a través de los axones neuronales del sistema nervioso y, al llegar a los músculos, provocan la contracción muscular.

En la propagación de los potenciales de acción se produce una rápida inversión de la polaridad de la membrana seguida de un retorno al equilibrio. Estos fenómenos se

denominan despolarización y repolarización respectivamente. Para que tenga lugar la despolarización es necesario aplicar a la célula un estímulo eléctrico superior a un determinado umbral. Dicho estímulo puede provenir de células adyacentes o de una fuente externa como un electrodo.

Dependiendo del tipo de célula y la función que ésta realice, los potenciales de acción tendrán diferentes morfologías. Estas morfologías vienen determinadas por el cierre y apertura de los diferentes canales iónicos celulares.

En cuanto a los potenciales de acción miocárdicos, presentan diferentes morfologías en función de la zona del sistema de conducción en la que se registren. A pesar de esas diferencias, la mayoría de los potenciales miocárdicos presentan las mismas fases. Un caso especial, y de interés para este estudio, son los potenciales de acción del nodo sino-auricular ya que, debido a su automaticidad, no presentan un potencial de reposo estable. En la figura 9 se presenta un esquema del potencial de acción del nodo sino-auricular.

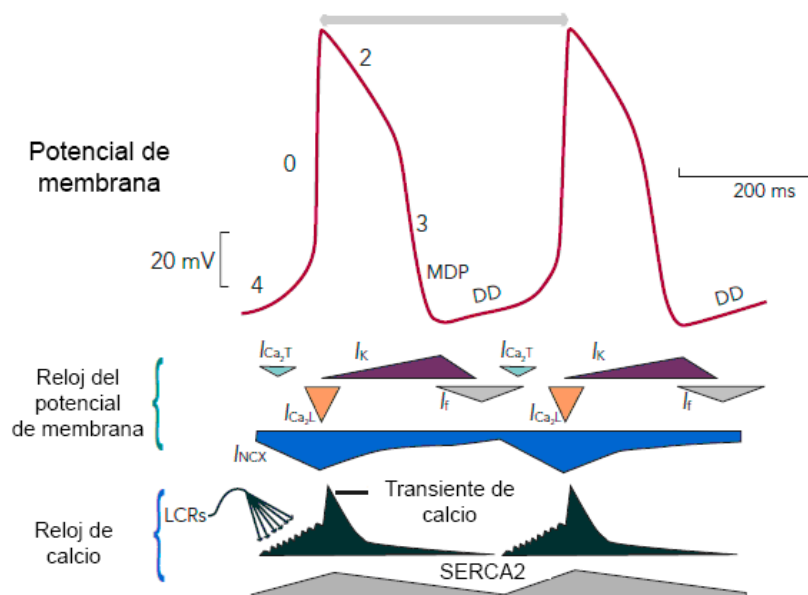


Figura 9: Representación del potencial de acción del nodo sino-auricular y las principales corrientes que lo conforman. Las flechas de las corrientes apuntando hacia arriba indican que son entrantes al citoplasma celular, hacia abajo que son salientes. Modificado de Manfredi et al. (2013).

Como se observa en la figura anterior podemos distinguir varias fases en el potencial de acción del nodo. Del mismo modo, estas fases están relacionadas con lo que ocurre en los dos relojes celulares, el de membrana y el de calcio (figura 9). A continuación, se detallaran estas fases:

- Fase 0: En esta fase ocurre la despolarización. En lo referente al reloj de membrana, se produce la apertura de los canales de calcio tipo L, a través de los cuales el calcio entra en la célula elevando rápidamente el potencial intracelular y produciendo la inversión de la polaridad de la membrana. También existe un flujo entrante de

sodio a través del intercambiador sodio-potasio (I_{NaK}). En cuanto al reloj de calcio, se produce una liberación de calcio del retículo sarcoplasmático al citoplasma.

- Fase 2: Comienzo de la repolarización. Los canales de calcio de la membrana y el retículo se van cerrando y empiezan a abrirse los canales de potasio.
- Fase 3: Repolarización. Los canales de calcio se han cerrado por completo y solo quedan abiertos los de potasio. Al ser la corriente de potasio saliente, hace disminuir el potencial intracelular, devolviendo el potencial de membrana al reposo.
- Fase 4: Las células del nodo sino-auricular son autoexcitables, por lo que no tienen un potencial de reposo estable. En esta fase, en el reloj de calcio comienzan a producirse pequeñas liberaciones de calcio del retículo. En cuanto al reloj de membrana, existe una corriente de sodio, *funny current*, que lentamente produce una entrada de sodio en la célula, elevando el potencial intracelular. Esta corriente es la que desestabiliza el potencial de reposo y genera la automaticidad.

3.5. ARRITMIAS CARDIACAS

Las arritmias cardiacas son la fisiopatología cardiaca más frecuente. Se producen por una alteración de la generación o conducción del impulso eléctrico que provoca una variación del ritmo cardiaco. Esta alteración puede tener distintas manifestaciones, como cambios de la frecuencia cardiaca o la secuencia de activación de las regiones del corazón. Si el gasto cardiaco, la cantidad de sangre bombeada por minuto, se ve seriamente afectado la arritmia puede ser potencialmente mortal. Entre las causas desencadenantes de arritmias están:

- Anormalidad en la frecuencia del nodo sino-auricular.
- Interrupción de la vía de conducción normal.
- Estimulación en zonas del corazón diferentes al nodo sino-auricular.

Las arritmias se pueden clasificar según diferentes puntos de vista:

- Origen del impulso: Las arritmias pueden ser ventriculares o supraventriculares, dependiendo del lugar donde tenga lugar la alteración del ritmo.
- Frecuencia: Si la frecuencia cardiaca es mayor a 100 pulsaciones por minuto se denomina taquicardia. Por otro lado, si es menor de 60 pulsaciones por minuto se llamará bradicardia. En general los aumentos y disminuciones de la frecuencia cardiaca no son necesariamente patológicos, ya que la frecuencia varía de forma fisiológica en función de las necesidades metabólicas. Así, cuando se hace ejercicio el corazón está taquicárdico mientras que cuando estamos dormidos está bradicárdico.
- Duración y aparición: Se denominan arritmias paroxísticas cuando aparecen y desaparecen de forma aleatoria. Tienen una duración variable pero finita que oscila entre segundos y días. Si por el contrario persisten en el tiempo se denominan crónicas.

- Hemodinámica: Las arritmias serán estables si no afectan al gasto cardiaco, asintomáticas. Por el contrario, será inestable si el gasto cardiaco se ve afectado, presentando síntomas apreciables.
- Pronóstico: Si las arritmias son asintomáticas y poseen tratamiento son benignas. Por otro lado, las malignas pueden llegar a causar la muerte (Montagud Balaguer, 2015).

Un caso particular de arritmia, de interés para este estudio, es la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT por sus siglas en inglés). Se trata de una arritmia letal que, bajo condiciones de estrés, causa muerte súbita a los sujetos que la padecen. Suele manifestarse en niños y adultos jóvenes y se trata de una patología genética (Domingo et al., 2014) cuyos mecanismos de actuación no están totalmente estudiados. Los pacientes con CPVT a menudo manifiestan bradicardia y disfunciones del nodo sino-auricular (Wang et al., 2017).

3.6. MUTACIONES GENÉTICAS

Las mutaciones genéticas son alteraciones en la secuencia de bases de las cadenas de ADN. Estos cambios provocan a su vez variaciones en los aminoácidos que codifican dando lugar a modificaciones en las proteínas finales. Podemos clasificar las mutaciones según diferentes criterios:

- Efecto: Las mutaciones son sinónimas si no provocan cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Esto es posible porque un mismo aminoácido se codifica por diferentes codones, que son tripletes de nucleótidos. Este tipo de mutaciones no provocan alteración en la proteína final y, por lo tanto, son asintomáticas. Por el contrario, las mutaciones son no sinónimas cuando sí que producen variaciones en la secuencia de aminoácidos. En estos casos sí que existe un efecto apreciable, que suele ser la codificación de una proteína no funcional o incluso otra diferente.
- Transmisión a la descendencia: Las mutaciones somáticas son aquellas que se producen en células que no pertenecen a la línea germinal del individuo. En estos casos la alteración no se transmitirá a la descendencia. Por otro lado, si las mutaciones se producen en las células germinales sí que se transmitirán a la descendencia.

La alteración que causa la mutación puede ser de diferente índole, por ejemplo, eliminación de bases (delecciones), adición de bases o transposición de las mismas. En cualquiera de las situaciones, si la secuencia de la proteína se ve alterada se producirá un efecto biológico de mayor o menor gravedad (Loewe, 2008).

Para este estudio resultan de especial interés las mutaciones que afectan a los canales de los cardiomiocitos. En general estas mutaciones provocan alteraciones en las corrientes iónicas que desencadenan eventos adversos en el ciclo cardiaco. En este trabajo se centra la atención en una mutación del gen que codifica el receptor de ryanodina tipo 2 (RyR2) de

los canales de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático, en concreto la mutación R420Q. Se trata de una alteración genética heredable, ya que se han reportado casos de familias portadoras, en el extremo C-terminal del gen del RyR2. Dicha mutación se ha relacionado con la aparición de CPVT y bradicardia en los pacientes estudiados (Domingo et al., 2014).

3.7. MODELADO BIOELÉCTRICO

Los modelos computacionales para simular el comportamiento del corazón, ya sea de células aisladas o de tejido completo, resultan de especial interés para estudiar los efectos de mutaciones y posibles vías de tratamiento. A continuación, se explicarán algunos conceptos básicos sobre los modelos unicelulares.

Eléctricamente, la célula es equivalente a un circuito como el que se presenta en la figura 10 donde se pueden apreciar diferentes elementos:

- Membrana: Al tratarse de una bicapa lipídica que separa dos medios conductores, equivale a un condensador de capacidad C_m .
- Canales iónicos: Se representan como una conductancia g_n en serie con una fuente de tensión E_n . Los diferentes canales son disposiciones en paralelo del equivalente de un canal.
- Intercambiadores, bombas y co-transportadores: Aparecen representados como fuentes de corriente en paralelo.
- Estímulo externo: Se representa como un aporte de corriente externo que se inyecta al circuito.

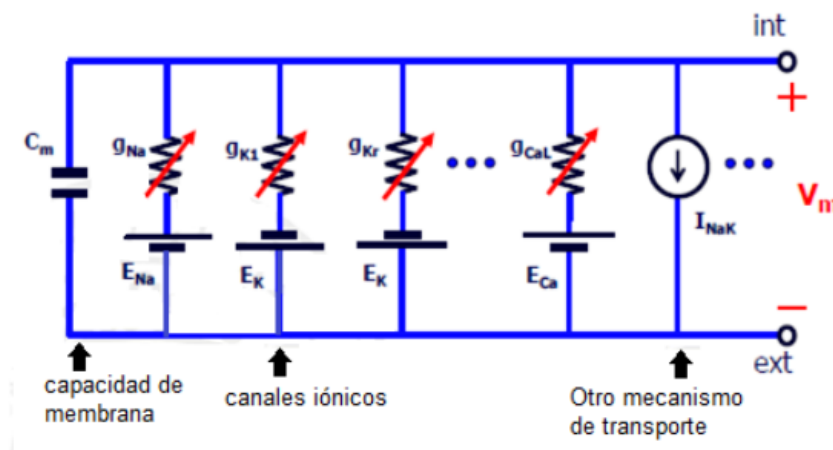


Figura 10: Circuito equivalente de una célula. Tomado de Ferrero y de Loma-Osorio (2016).

El circuito antes presentado se resuelve aplicando la primera ley de Kirchhoff, es decir, que el sumatorio de las corrientes en los nodos debe de ser nulo. Siguiendo esto obtenemos la ecuación 2.

$$C_m \frac{dV_m}{dt} + \sum_S I_S(t) + \sum_{B,I,C} I_{B,I,C} + I_{stim} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde I_s representa la corriente de los canales iónicos y $I_{B, I, C}$ la de las bombas, intercambiadores y co-transportadores respectivamente.

Como se ha explicado anteriormente, los canales iónicos se abren y cierran a lo largo del potencial de acción en función del potencial de membrana. Es por esto que los canales se pueden considerar como una especie de diodos donde, a partir de cierto potencial, generan una corriente (Ecuaciones 3 y 4).

$$\text{Si } V_m > \text{umbral } I_s = \gamma_s(t)(V_m(t) - E_s) \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\text{Resto } I_s = 0 \quad (\text{Ec. 3})$$

$$E_s = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[S]_o}{[S]_i} \right) \quad (\text{Ec. 4})$$

En este caso, la corriente que circula por cada canal no se calcula empleando la impedancia del canal, sino que se usa su inversa, la conductancia (Ω^{-1}). El valor de este parámetro se obtiene de forma experimental mediante técnicas de *patch clamp* que permiten, mediante micropipetas acopladas a la membrana, medir la corriente que circula por un tipo de canal a diferentes potenciales impuestos por el ensayo. En la ecuación 3, aparece el parámetro E_s que se corresponde con el potencial de equilibrio para una determinada especie iónica. Dicho potencial se calcula mediante la ley de Nernst (ecuación 4) donde R es la constante de los gases, F es la constante de Faraday, T la temperatura del medio en Kelvin, S_o la concentración intracelular del ion y S_i la extracelular.

Realmente, en la membrana celular no existe un solo canal de cada familia, sino que hay muchos distribuidos a lo largo de toda la membrana, es por esto que la ecuación 3 se modifica quedando:

$$I_s(t) = G_s(t, V_m, [S])(V_m(t) - E_s) \quad (\text{Ec. 5})$$

$$G_s(t, V_m, [S]) = N_s \cdot \gamma_s \cdot f_s(t) \quad (\text{Ec. 6})$$

En este caso, G_s es la conductancia de toda la población de canales en un instante determinado, N_s el número de canales de la familia de interés y f_s la fracción de canales que se encuentra abierta en dicho instante (en tanto por uno) (Ferrero Corral et al., 1994; Ferrero y de Loma-Orsorio, 2016).

Hoy en día, existen numerosos modelos bioeléctricos de células cardiacas con variaciones entre ellos. Para este estudio son de especial interés los modelos de células del nodo sino-auricular responsables de la automaticidad del corazón. A continuación, se presenta un esquema del modelo de Severi (2012):

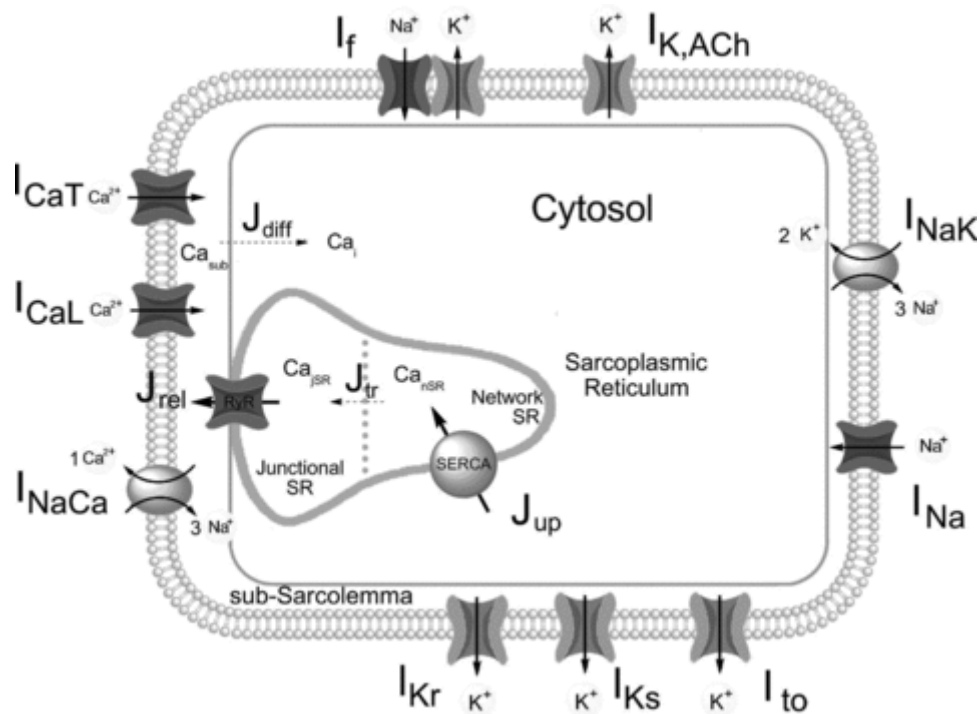


Figura 11: Modelo celular de cardiomiocito del nodo SA. Tomado de Severi et al. (2012)

La principal característica de este modelo, y por lo que resulta de interés, es que formula con gran detalle la dinámica de calcio del retículo sarcoplásmico. Este modelo considera tanto el reloj de membrana como el reloj de calcio que se presentaron en la figura 9. Este aspecto es de gran relevancia para este estudio, ya que la mutación R420Q antes expuesta afecta a la dinámica de liberación de calcio.

Como se puede observar, en el modelo se representan los principales compartimentos celulares:

- Espacio intracelular: dividido en citosol (Cytosol) y espacio sub-sarcolémico (sub-Sarcolemma), este último es el que está en contacto directo con el retículo sarcoplásmico.
- Retículo sarcoplásmico: Dividido en la red del retículo (Network SR) y la zona de unión al espacio intracelular (Junctional SR).

Además, aparecen representadas las diferentes corrientes de los canales iónicos, tanto los de la membrana celular como los de calcio del retículo sarcoplásmico.

3.8. MODELOS DE MARKOV

En una primera aproximación a los modelos de canales iónicos, se supuso que el comportamiento de éstos se podía explicar mediante compuertas que abrían y cerraban el canal en función del potencial de membrana. Estas compuertas podían ser de activación o inactivación dependiendo de si se abrían o cerraban respectivamente al variar el potencial.

Así pues, según esta hipótesis, la corriente que pasa a través de una familia de canales es proporcional al grado de apertura de los mismos (Hodgkin & Huxley, 1952).

Esta primera hipótesis explicaba el comportamiento de las corrientes, pero es simple. La segunda hipótesis, que mejora a la primera, es que la apertura y cierre de los canales iónicos es un proceso aleatorio. Los canales cambian su estado constantemente y la corriente de una familia es proporcional al número de canales que se encuentren abiertos en cada instante.

Para poder modelar este comportamiento se desarrollaron los modelos de Markov, que permiten reproducir el comportamiento de los canales iónicos. Los cambios de estado de los canales se deben a variaciones en la conformación de las proteínas que provocan el cambio en el estado del canal. En los modelos de Markov, la transición entre estados se representa mediante ratios de transición que determinan la probabilidad de pasar de un estado a otro. Una de las principales ventajas de estos modelos es que se pueden incluir variables que afecten a los ratios de transición y representen el efecto de mutaciones y fármacos (Rudy & Silva, 2006).

El modelo de Markov del canal iónico más simple posible incorporaría dos estados, abierto (O) y cerrado (C). Sin embargo, a nivel molecular, la mayoría de los canales iónicos pueden inactivarse. Esta inactivación es independiente del estado en el que se encuentre el canal por lo que tendremos otros dos estados, canales abiertos inactivos (I_o) y cerrados inactivos (I_c). En la figura 12 se presenta un esquema del modelo de Markov de cuatro estados.

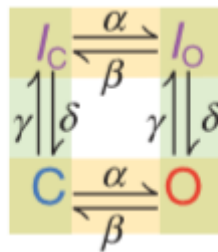


Figura 12: Modelo de Markov de un canal iónico con cuatro estados. Tomado de Rudy & Silva (2006).

Como se observa en la figura 12, el modelo incorpora los cuatro estados antes explicados y cuatro ratios de transición (α , β , δ , γ). Estos ratios (en ms^{-1}) dependen del voltaje y se caracterizan de forma experimental. La ocupación de cada uno de los estados existentes se calcula según las siguientes ecuaciones 7, 8, 9 y 10.

$$\frac{dC}{dt} = \beta \cdot O + \delta \cdot I_c - (\alpha + \gamma) \cdot C \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\frac{dO}{dt} = \alpha \cdot C + \delta \cdot I_o - (\beta + \gamma) \cdot O \quad (\text{Ec. 8})$$

$$\frac{dI_c}{dt} = \beta \cdot I_c + \gamma \cdot C - (\alpha + \delta) \cdot I_c \quad (\text{Ec. 9})$$

$$\frac{dI_O}{dt} = \alpha \cdot I_O + \gamma \cdot O - (\beta + \delta) \cdot I_O \quad (\text{Ec. 10})$$

Finalmente, la formulación de la corriente presentada en las ecuaciones 5 y 6 cambia para adaptarse al nuevo modelo, la ecuación actualizada se presenta en la ecuación 11.

$$I_s(t) = G_s(t, V_m, [S]) \cdot O \cdot (V_m(t) - E_s) \quad (\text{Ec. 11})$$

En este estudio, nos centramos en el canal de liberación de calcio el retículo sarcoplasmático (RyR2) y la mutación R420Q que afecta al mismo. Por lo tanto, es de interés presentar el modelo de Markov que gobierna el comportamiento de dicho canal en el modelo escogido (figura 11). En la figura 13 se muestra el esquema del modelo. Como se puede observar se trata de un modelo sencillo que se rige por las ecuaciones 7-10 presentadas anteriormente. Donde el estado R se corresponde con el canal cerrado, O con el abierto y las I representan los estados inactivados, ya se abierto o cerrado.

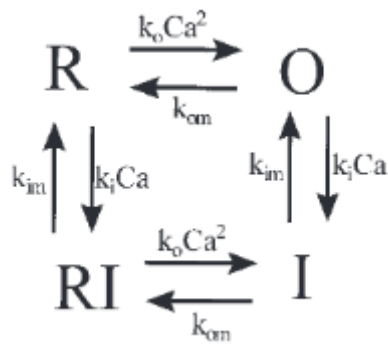


Figura 13: Modelo de Markov del canal RyR2 utilizado en el modelo. Tomado de Stern et al. (1999).

4. DISEÑO DE SOFTWARE

Para facilitar el análisis del efecto que determinados parámetros tienen sobre el modelo y ver si estos se ajustan o no a los cambios observados experimentalmente, se han desarrollado diferentes herramientas computacionales. Para comodidad de uso y manejo, estas herramientas se han incorporado dentro de una interfaz gráfica sencilla que permite el acceso rápido a las mismas.

Mediante el uso de estas herramientas se pretenden evaluar el efecto que tiene sobre las variables de interés modificar ciertos parámetros del modelo. La información mostrada por cada herramienta es complementaria y, en conjunto, permite determinar si es posible reproducir con un determinado modelo ciertos cambios observados experimentalmente.

Tanto las herramientas como la interfaz gráfica de este trabajo se han desarrollado utilizando Matlab 2018a (The MathWorks Inc., Natick, EEUU). Los modelos de interés se encuentran programados en OpenCOR, una herramienta de código abierto disponible para todos los sistemas operativos. Por lo tanto, se ha utilizado OpenCOR para simular los modelos. Los datos generados por las simulaciones deben ser exportados a archivos de valores separados por comas (CSV) para poder ser utilizados con Matlab. Estos archivos se generan directamente desde OpenCOR al realizar una simulación y se leerán con la herramienta correspondiente.

4.1. HERRAMIENTAS

En total se han desarrollado cuatro funciones de Matlab cuyo funcionamiento se explicará a continuación.

- **TablaSensibilidadFn:** Se trata de una función que, como su nombre indica, permite evaluar la sensibilidad de las variables de interés frente a parámetros del modelo. A continuación, se explican sus entradas, salidas y funcionamiento:

Entradas:

- **Parámetros:** Debe indicarse el nombre de los parámetros que se han modificado en el modelo. Si se han modificado varios, estos se deberán introducir dentro de la misma línea de texto separándolos por un espacio. En caso de que se haya realizado una simulación de control (sin modificar ningún parámetro), se debe indicar aquí añadiendo la palabra 'Control' como primer parámetro de la lista. Hay que tener en cuenta que el nombre introducido es el que se utilizará en las gráficas posteriores. Por ejemplo, si se han realizado simulaciones multiplicando y dividiendo por 10 los parámetros A y B del modelo, en este campo se introducirá: 'Control A B'.
- **Variables:** Corresponde al nombre de las variables de interés cuya sensibilidad se quiere estudiar. Se deben introducir de la misma manera que los parámetros y

deben de estar escritos de la misma manera que aparecen en los encabezamientos de los archivos CSV. La variable tiempo debe de estar incluida en el CSV y ser introducida al principio de la lista. Por ejemplo, si se desea ver el efecto de los parámetros A y B anteriores sobre la corriente de calcio tipo L, en este campo se escribirá: 'Time ICaL'.

- Simulaciones: Debe introducirse el indicativo de las simulaciones entre las cuales se desea realizar el análisis de sensibilidad. Esto depende del usuario y como se hayan guardado los CSV que contienen las simulaciones. Siguiendo con el ejemplo anterior, si se desea seleccionar las simulaciones dividir entre 10 (multiplicar por 0.10) y multiplicar por 10 para el análisis, en este campo se debe introducir: '0.10 10'.
- Título: Se debe introducir el nombre que tendrá el archivo que genera la función. Se trata de un archivo tipo figura de Matlab.

Salidas:

- Tabla: Devuelve la ruta a la imagen recién creada que contiene la tabla de sensibilidad.

Funcionamiento: La función devuelve una tabla que posee tantas filas como variables y tantas columnas como parámetros se deseen analizar. Para poder evaluar cómo cambia una variable en función de las modificaciones a los parámetros se utilizan tres simulaciones. Dos de esas simulaciones representan los rangos de variación del parámetro entre los que se desea calcular la sensibilidad. La tercera debe de ser la simulación de control, utilizada para calcular la sensibilidad. Por ejemplo, si consideramos el parámetro P, la variable V y las simulaciones aumentar y disminuir P un 10%, la sensibilidad se calcularía (Romero et al., 2009):

$$D_{V,P,+10\%} = \frac{(V_{P,+10\%} - V_{control})}{V_{control}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 12})$$

$$D_{V,P,-10\%} = \frac{(V_{P,-10\%} - V_{control})}{V_{control}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 13})$$

$$S_{V,P} = \frac{\Delta D_{V,P}}{\Delta\%} = \frac{D_{V,P,+10\%} - D_{V,P,-10\%}}{0.2} \quad (\text{Ec. 14})$$

La función lee todos los archivos CSV necesarios y genera una tabla que recoge los valores de sensibilidad. La tabla se genera mediante la función heatmap (Ameya Deoras, 2016) obtenida del intercambiador de archivos de Matlab. Los resultados obtenidos mediante las ecuaciones 12-14 se normalizan por filas, es decir, por variable, y se presenta con un mapa de color binario. Los valores azules representan sensibilidades negativas, donde al aumentar el parámetro disminuye el valor de la variable, mientras que los valores en rojo son sensibilidades positivas. Además, en cada celda se incluye en valor de la sensibilidad calculada para proporcionar conocimiento sobre qué variable cambia más.

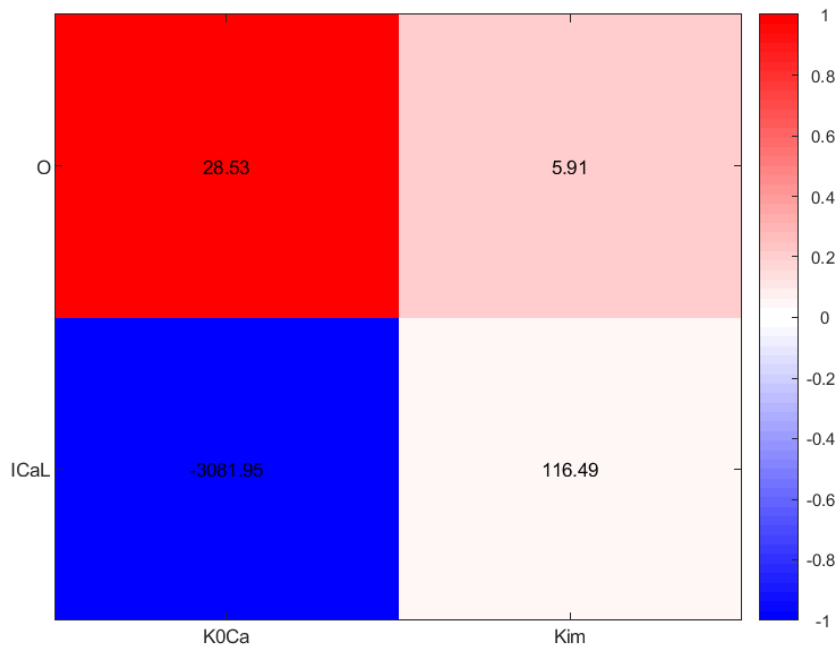


Figura 14: Ejemplo de tabla de sensibilidad obtenida con la herramienta *TablaSensibilidadFn*. Se representa la tendencia de las variables *ICaL* y *O* al modificar los parámetros *KOca* y *Kim*.

- **GraficosParametrosFn:** Esta función coge los archivos CSV que el usuario selecciona y representa un periodo de tiempo de cada variable. Para este estudio se representan los dos últimos pulsos de la simulación. Las entradas, salidas y funcionamiento son los siguientes:

Entradas:

- Parámetros, variables y simulaciones: son los mismos que para la tabla de sensibilidad.
- App: Entrada que contiene los elementos de la interfaz gráfica para poder trabajar con ella posteriormente.

Salidas: Dado que se generan varias gráficas dependiendo de las entradas y no una sola como en el caso anterior, esta función de Matlab no genera ninguna salida.

Funcionamiento: La herramienta recoge todas las entradas y combina los parámetros con las simulaciones para saber qué archivos CSV leer. Hecho esto, genera una gráfica para cada parámetro y variable donde se representan los dos últimos pulsos de todas las simulaciones resultantes de modificar ese parámetro. Las gráficas se guardan dentro de una carpeta cuyo nombre tiene la siguiente estructura: 'fecha_actual_GraficosFamilias'. Dentro de esa carpeta se generan tantas subcarpetas como parámetros se hayan analizado (cuyo nombre se corresponde con el parámetro) y ahí se guardan las gráficas correspondientes.

El periodo de tiempo a graficar se corresponde con los dos últimos pulsos de la simulación. Este periodo se calcula considerando como inicio de un pulso el momento de máxima derivada del potencial de membrana. Por este motivo, aunque no se desee analizar la variable potencial de membrana, ésta tiene que estar en el CSV.

Por ejemplo, si tenemos los parámetros P1 y P2, variables V1 y V2 y simulaciones +10, +20 y +30%. El programa creará la carpeta 'fecha_actual_GraficosFamilias', dentro de esa carpeta creará dos subcarpetas P1 y P2 y en cada subcarpeta se guardarán 2 gráficas, V1 y V2. En esas gráficas aparecerán representados los dos últimos pulsos de las 3 simulaciones de cada parámetro a la vez.

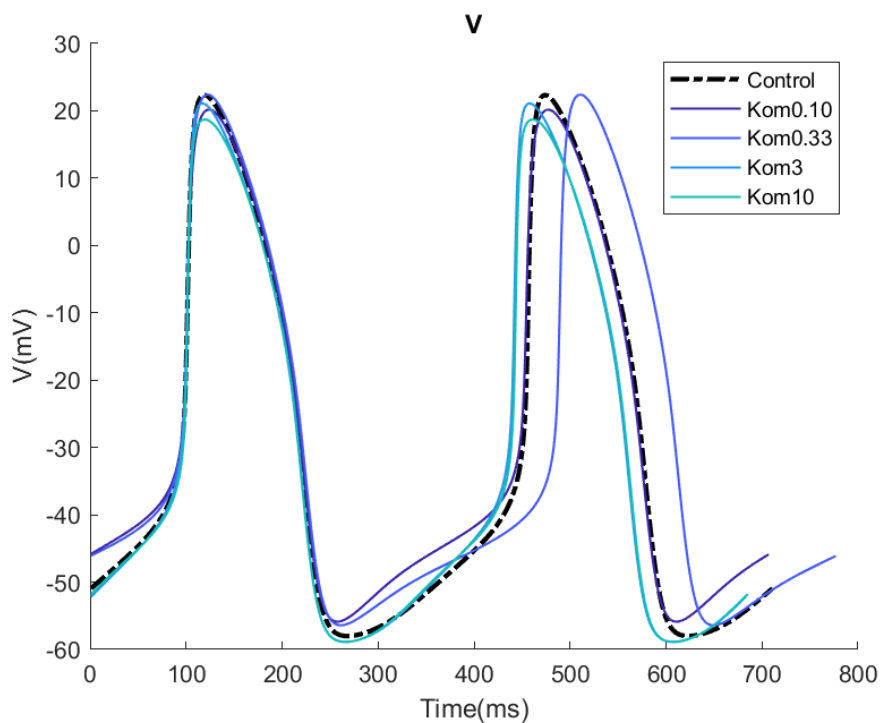


Figura 15: Ejemplo de gráfica obtenida con la herramienta GraficosParametrosFn. Se representa el potencial de membrana para diferentes variaciones del parámetro Kom (multiplicar y dividir por 3 y 10).

Esta herramienta permite visualizar en la misma gráfica múltiples simulaciones correspondientes a la variación de un parámetro. Con esto se puede evaluar el efecto de un parámetro en una variable de forma visual e intuitiva.

- **GraficoComparativoFn:** La función coge los archivos de datos seleccionados por el usuario y representa cómo afecta la modificación de un parámetro a una variable.

Entradas: Son las mismas que para la función **GraficosParametrosFn**.

Salidas: Igual que para la función **GraficosParametrosFn**.

Funcionamiento: Combina todos los parámetros con las simulaciones para saber los archivos CSV necesarios. Posteriormente, genera una gráfica por cada variable que se

desea estudiar. En dichas gráficas se representa la variación de la variable para cada uno de los parámetros. De esta forma, en cada gráfica aparece una línea por cada parámetro que tiene tantos puntos como simulaciones con dicho parámetro se han estudiado. Las gráficas se guardan dentro de una carpeta con el nombre 'fecha_actual_GraficosComparativos'.

Por ejemplo, si queremos analizar como los parámetros P1 y P2 afectan a las variables V1 y V2 cuando se multiplican y dividen por 10. El programa generará dos gráficas llamadas V1 y V2, en cada gráfica habrá dos líneas, P1 y P2 y cada línea tendrá dos puntos P1/P2*10 y P1/P2/10.

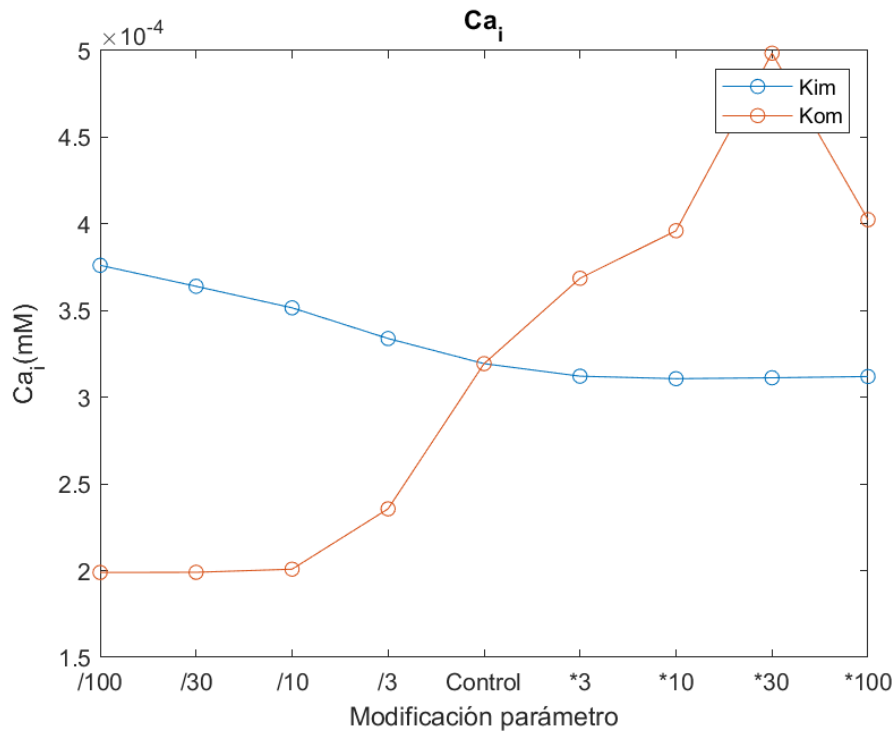


Figura 16: Ejemplo de gráfica obtenida con la herramienta GraficoComparativoFn. Se representa la variación de la concentración intracelular de calcio para modificaciones de los parámetros Kim y Kom.

Con estas gráficas se puede visualizar de forma compacta cómo múltiples cambios de varios parámetros afectan a las variables de interés.

- V_clamp:** Esta función sirve para simular un protocolo de *Voltage Clamp* en Matlab. Con estos protocolos se busca medir una corriente concreta del modelo celular seleccionado. Para ello se introducen las ecuaciones de la corriente a estudiar, se fijan las condiciones iniciales (como los valores de las concentraciones iónicas) y se imponen diferentes potenciales de membrana para estudiar la evolución de la corriente. Del mismo modo, si se aplica un protocolo determinado y se modifica algún otro parámetro se puede ver el efecto de dicho parámetro en la corriente. La función tiene las siguientes entradas y salidas:

Entradas:

- Potencial: Se introducen los valores de tensión entre los que se quiere realizar el protocolo. Se debe indicar el valor mínimo y el máximo de potencial.
- Intervalo potencial: Un único valor que se corresponde con los incrementos de tensión que se desean realizar. Se calculará la corriente para todos los valores de potencial que van desde el mínimo hasta el máximo anterior a intervalos del valor introducido en este campo.
- Shift: Parámetro de interés para el estudio, es un desplazamiento del potencial de la compuerta de activación dL de los canales de calcio tipo L. Se introducen los valores máximo y mínimo de tensión a añadir. Con esos valores se altera la dinámica del canal y se observa el efecto sobre la corriente I_{CaL} .
- Invervalo_shift: Valor que se corresponde con los incrementos de potencial del shift. Se irá del mínimo al máximo en intervalos de este valor.

Salidas: Devuelve la ruta a la gráfica creada donde se representa la corriente para las variaciones de los parámetros anteriores.

Funcionamiento: Para este estudio se ha programado la corriente de calcio de los canales tipo L (I_{CaL}) del modelo de Severi et al. (2012) Presentado en la figura 12. La función toma los parámetros de entrada y calcula la corriente para cada una de las combinaciones de voltaje y shift posibles. Posteriormente, genera una gráfica donde se representan todas las corrientes. Para facilitar el análisis, en la leyenda de la gráfica se muestra el porcentaje de reducción de la corriente con respecto a la simulación de control.

Las concentraciones iónicas iniciales y las condiciones de control se han obtenido del protocolo seguido por Wang et al. (2017) para el análisis de la mutación R420Q de interés para el estudio. A continuación se detallan las concentraciones iónicas iniciales:

	Calcio	Potasio	Sodio
Intracelular (mM)	0.04	130	10
Extracelular (mM)	1.8	5.4	140

Tabla 1: Concentraciones iónicas iniciales del protocolo de voltage clamp.

4.2. INTERFAZ GRÁFICA Y MANUAL DE USUARIO

Para facilitar el uso de las funciones anteriores se ha diseñado una sencilla interfaz gráfica. La interfaz consta de cuatro archivos '.mlapp'. A continuación, se explicará el funcionamiento de la misma.

La interfaz de ejecuta haciendo doble click en el archivo llamado '*Main_window.mlapp*'. Este archivo genera una interfaz como la que se muestra a continuación:

Ventana Principal:

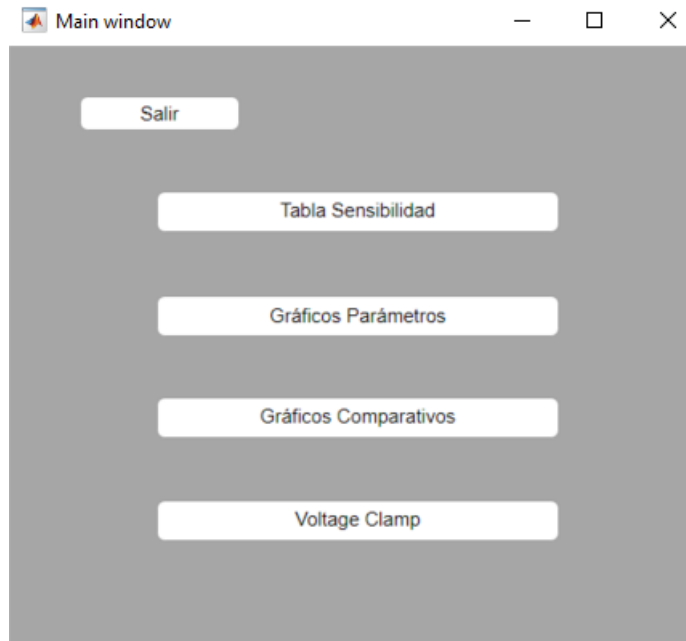


Figura 17: Ventana de inicio de la interfaz gráfica, desde aquí se ejecuta el resto de herramientas.

Ésta es la ventana inicial de la interfaz gráfica y consta de cinco botones desde los que se accede a las diferentes herramientas.

- **Salir:** Cierra esta ventana y todas las que se encuentren abiertas en ese momento. Antes de cerrar, genera un cuadro de diálogo que pide al usuario confirmación para salir del programa.

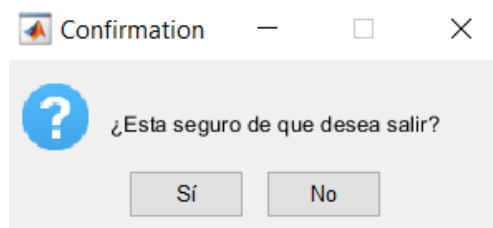


Figura 18: Cuadro de confirmación para cerrar la interfaz gráfica.

Si el usuario presiona **Sí** se cerrarán todas las ventanas y detendrá la interfaz. Por el contrario, si presiona **No** se cerrará el cuadro de diálogo y la interfaz continuará abierta para seguir trabajando.

- **Tabla Sensibilidad:** Ejecuta la ventana de la interfaz que se utiliza para elaborar las tablas de sensibilidad.
- **Gráficos Parámetros:** Abre la ventana para hacer uso de la función `GraficosParametrosFn`.
- **Gráficos Comparativos:** Ejecuta la interfaz que llama a la función `GraficosComparativosFn`.

- **Voltage Clamp:** Lanza la ventana para realizar el protocolo de *voltage clamp*.

Cuando se presionan los botones antes descritos se abren las ventanas de la interfaz utilizadas para ejecutar cada una de las herramientas. Los nombres de los botones se corresponden con el de las funciones descritas anteriormente. A continuación, se explicará cada una de las ventanas siguiendo el orden en el que se presentan los botones.

Tabla Sensibilidad:

Figura 19: Ventana de la interfaz para realizar las tablas de sensibilidad.

Esta ventana se compone de tres botones, cuatro cuadros de texto y un panel gráfico.

- **Salir:** Cierra la ventana de tablas de sensibilidad, pero mantiene abierta el resto de ventanas.
- **Parámetros:** Aquí se introducen los parámetros que servirán de entrada a la función. Se deben escribir con las restricciones explicadas cuando se expuso la función.
- **Variables:** El texto aquí introducido es la entrada 'variables' de la función. El formato de introducción es el explicado anteriormente.
- **Simulaciones:** Se seleccionan las simulaciones entre las cuales se quiere realizar el análisis de sensibilidad. Anteriormente se explicó que la función utiliza tres simulaciones para el análisis, siendo una de ella la de control. En este campo se

deben introducir las otras dos simulaciones, en la figura 19 se puede ver un ejemplo donde se han elegido las simulaciones 0.10 y 10.

- **Título:** Texto con el que se guardará la tabla de sensibilidad generada.
- **Ejecutar:** Llama a la función *'TablaSensibilidadFn'* y la ejecuta con los valores introducidos en los campos de texto anteriores.
- **Seleccionar tabla:** Abre el explorador de archivos y permite seleccionar la figura que se desea mostrar en el panel gráfico.

Para ejecutar la función y generar la tabla de sensibilidad, el usuario debe rellenar los campos de texto y presionar el botón **ejecutar**. Si los campos **parámetros**, **variables** y **simulaciones** están vacíos cuando se presiona el botón, se generará un mensaje de error que indica el campo que se ha dejado en blanco. Por el contrario, si el campo **título** está en blanco no se mostrará ningún error, el programa se ejecutará y la tabla generada se guardará con un nombre genérico: *'Tabla_Sensibilidad'*.

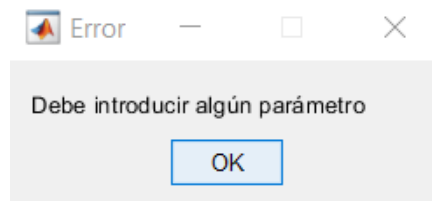


Figura 20: Ventana de error al dejar vacío el campo parámetros, si se dejan en blanco los otros campos se genera un mensaje similar.

Si se han introducido correctamente todos los campos, al presionar el botón **ejecutar**, se llama a la función *'TablaSensibilidadFn'* con los valores introducidos por el usuario. Para indicar que es posible ejecutar correctamente la función, se muestra un mensaje por pantalla.

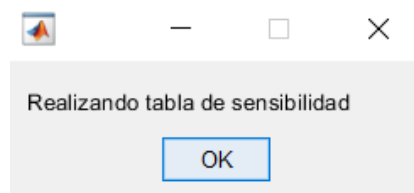


Figura 21: Cuadro de confirmación de la ejecución

Cuando se ha generado la tabla de sensibilidad, ésta se muestra en el panel gráfico para visualización por parte del usuario. Además, la función guarda la tabla generada en dos archivos, un archivo figura de Matlab (.fig) y otro en formato imagen *Portable Network Graphics* (.png). Los dos archivos se guardan con el título introducido por el usuario. Si ya existe un archivo con ese título se sobrescribirá automáticamente.

El botón **seleccionar tabla** abre el explorador de archivos y permite seleccionar archivos de tipo PNG, si el usuario selecciona uno, éste se mostrará en el panel gráfico sustituyendo al que hubiera anteriormente.

Gráficos Parámetros:

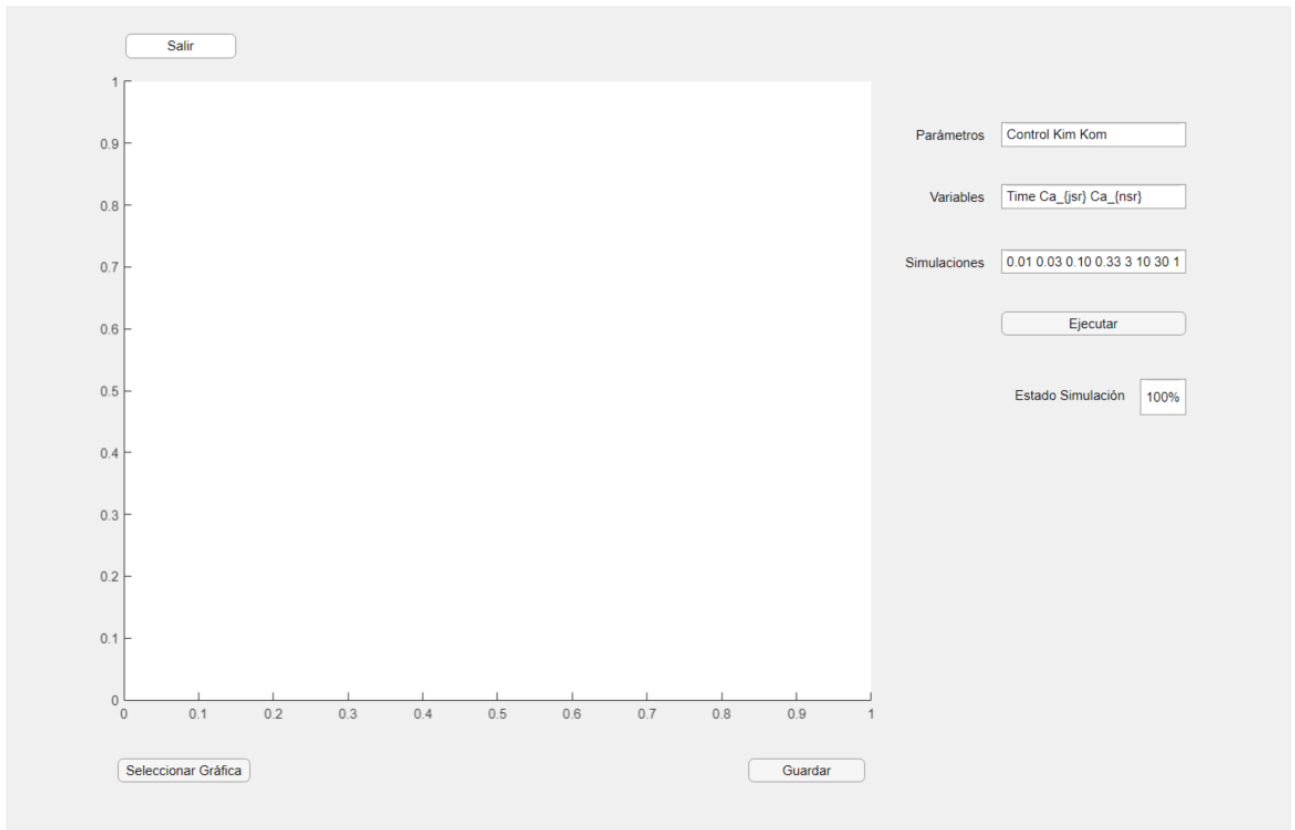


Figura 22: Ventana de la interfaz para realizar los gráficos de últimos pulsos por parámetros.

La ventana se compone de cuatro botones, cuatro campos de texto y un panel gráfico.

- **Salir, ejecutar, parámetros, variables y simulaciones:** Tienen la misma función que en la ventana explicada anteriormente.
- **Seleccionar gráfica:** Permite elegir archivos de tipo figura de Matlab, si se selecciona uno se mostrará en el panel gráfico.
- **Guardar:** Si hay alguna figura mostrada en el panel gráfico, permite guardar el archivo en formato de imagen PNG.
- **Estado simulación:** Muestra el progreso de la elaboración de las gráficas en porcentaje.

Para ejecutar la función, el usuario debe rellenar todos los campos de texto y presionar el botón **ejecutar**. Si algún campo se deja en blanco aparecerán mensajes similares a los de la figura 17. De igual modo, si todo es correcto se generará un mensaje como el de la figura 18.

Mientras se ejecuta la función y se generan todas las gráficas (una por cada parámetro y variable), el porcentaje del contador va subiendo. Cuando llega al 100%, el programa ha terminado y todas las gráficas se han guardado en formato figura de Matlab (.fig). Las gráficas se guardarán dentro de la estructura de carpetas que se explicó con la función

GraficosParametrosFn. Dada la cantidad de gráficas que se generan, al finalizar la ejecución no se muestra ninguna en el panel gráfico.

Al presionar el botón **seleccionar tabla** se abre el explorador de archivos y permite al usuario elegir archivos de tipo figura. Si se selecciona uno, se muestra en el panel para su visualización. En caso de que el usuario lo desee, presionando el botón **guardar**, podrá introducir un título y generar un archivo PNG con la figura que se muestra en la pantalla.

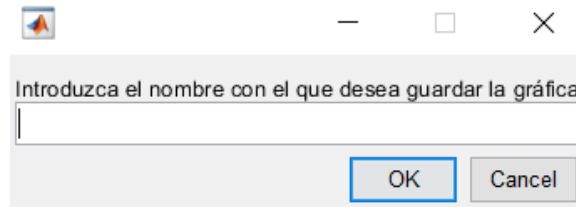


Figura 23: Ventana de introducción de título.

Gráficos comparativos:

La ventana en este caso es igual a la de la figura 22. Los botones, cuadros de texto y mensajes de error son similares a la interfaz anterior. Al presionar el botón **ejecutar**, se llama a la función GraficoComparativoFn que generará las gráficas de cambio de las variables en función de todos los parámetros elegidos. Al terminar la ejecución no se muestra ninguna gráfica en pantalla. Como en el caso anterior, el usuario deberá seleccionar la que desea visualizar.

Voltage Clamp:

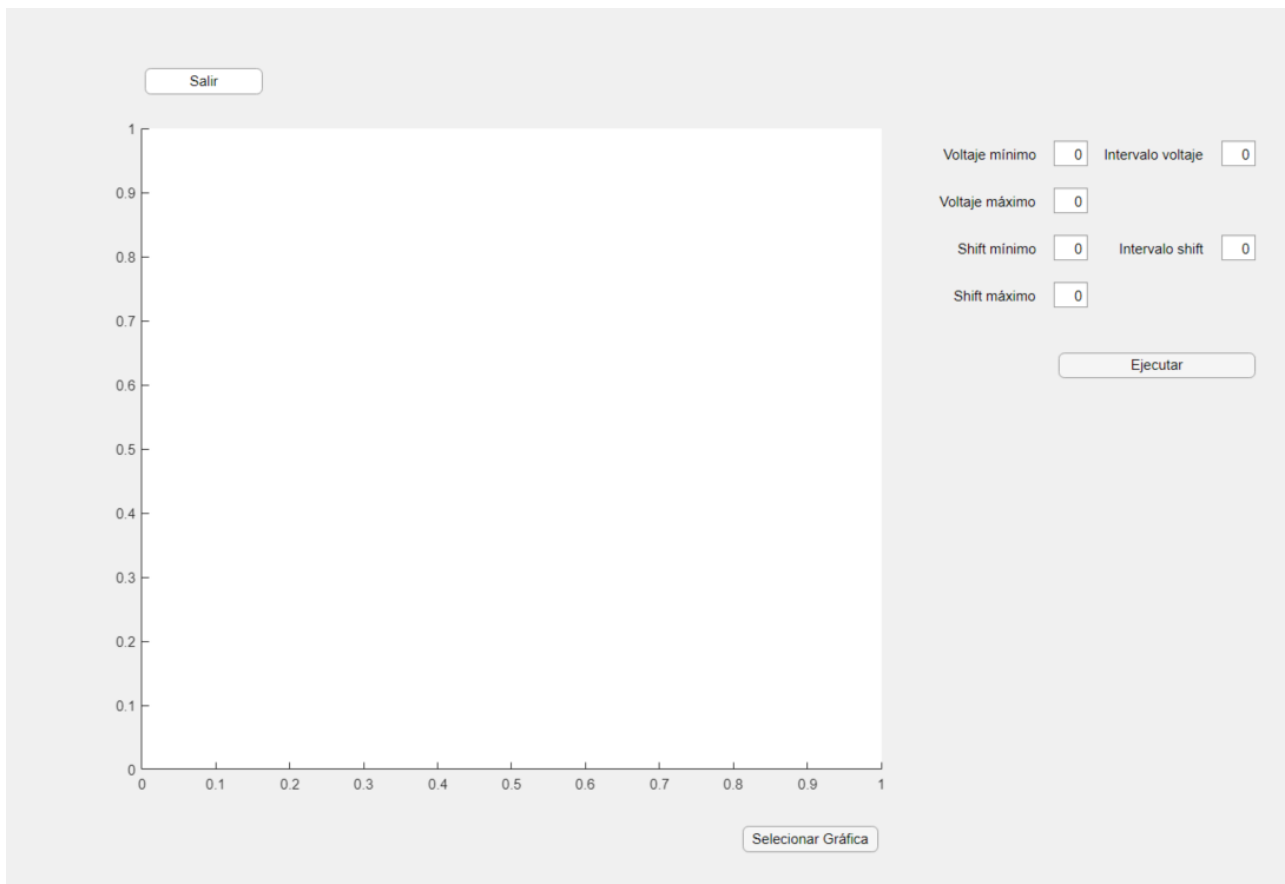


Figura 24: Ventana de la interfaz para la simulación del protocolo de voltage clamp.

La ventana consta de tres botones, seis campos numéricos y un panel gráfico.

- **Salir, seleccionar gráfica y ejecutar:** Funcionan igual que en los casos anteriores.
- **Voltaje mínimo:** Valor mínimo del rango de potenciales de membrana que se aplicarán en el protocolo.
- **Voltaje máximo:** Valor máximo del conjunto de valores de potencial de membrana que se aplicarán en el protocolo.
- **Intervalo voltaje:** Valor de los incrementos de potencial de membrana dentro del rango de interés. Se efectuará el protocolo para un rango de potenciales que va desde el mínimo al máximo en intervalos que se corresponden con este valor.
- **Shift mínimo:** Valor mínimo del rango de variaciones en la compuerta de activación de la corriente de calcio del modelo.
- **Shift máximo:** Valor máximo del rango de variaciones en la compuerta de calcio del modelo.
- **Intervalo shift:** Valor de los incrementos del potencial del *shift* que se aplicarán en el protocolo. Se simularán variaciones de la compuerta que van desde el valor mínimo al máximo en intervalos de este valor.

Para realizar el protocolo de *voltage_clamp* el usuario debe introducir los parámetros en los campos numéricos y presionar el botón **ejecutar**. Por defecto, el valor de los campos es cero por lo que es posible realizar el protocolo aplicando un potencial de membrana y un shift de cero voltios. Por este motivo, no se produce ningún error si no se modifica el valor por defecto de los mínimos y máximos. Sin embargo, el valor del intervalo debe ser distinto de cero, si se intenta ejecutar el programa con un valor de cero en ese campo se generará un mensaje de error. Todos los campos pueden contener valores negativos, pero si el intervalo es negativo, el máximo correspondiente deberá ser estrictamente menor que el mínimo, de lo contrario se generará un mensaje de error. Finalmente, en caso de que se escriba un valor no numérico en los campos se marcará en rojo ese campo y saltará un bocadillo de alerta.

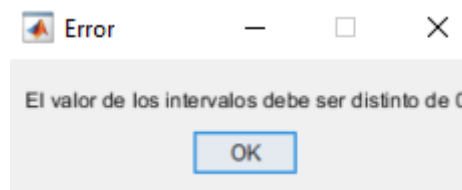


Figura 25: Mensaje de error en caso de introducir un cero en los intervalos.

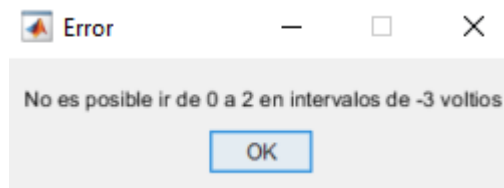


Figura 26: Mensaje de error en caso de introducir un valor negativo de intervalo y un valor superior de máximo que mínimo.

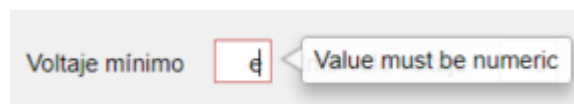


Figura 27: Alerta en caso de introducir un carácter no numérico en los campos.

Una vez introducidos correctamente los campos, el usuario presiona el botón **ejecutar** y la interfaz llama a la función *V_clamp*. Se simulará el protocolo y se generará una gráfica con las corrientes simuladas. Dicha gráfica se mostrará automáticamente en el panel gráfico. Con el botón **seleccionar gráfica**, se abrirá el explorador de archivos y el usuario podrá elegir que archivo de tipo figura desea visualizar. El programa guarda automáticamente la gráfica generada en formato figura de Matlab y PNG.

5. RESULTADOS

Las herramientas desarrolladas en este trabajo se han utilizado para evaluar el efecto que los cambios en determinados parámetros tienen sobre variables de la dinámica de calcio. Se han empleado los modelos celulares del nodo sino-auricular desarrollados por Severi et al. (2012, 2017). En particular, se ha utilizado el modelo de conejo desarrollado en 2012 y, para el análisis de sensibilidad, se ha utilizado también el de humano publicado por Fabbri et al. (2017). El esquema de los modelos se presenta en la figura 11 de la introducción.

Todas las simulaciones se han realizado con OpenCOR y una duración de 1000 segundos. El intervalo de grabación es de 0.001 segundos y como método de resolución de las ecuaciones diferenciales del modelo se ha usado CVODES. Los archivos CSV se han generado manualmente con la herramienta propia de OpenCOR.

En total se han considerado nueve variables para el estudio:

- **Concentraciones de calcio:** Valor máximo de la concentración de calcio por pulso en los diferentes compartimentos del modelo. Hay cuatro compartimentos: intracelular (Ca_i), sub-sarcolema (Ca_{sub}), unión del retículo sarcoplasmático (Ca_{jsr}) y red del retículo sarcoplasmático (Ca_{nsr}). Se mide en milimolar (mM).
- **Corriente de calcio de los canales tipo L (I_{CaL}):** Valor del pico máximo (al ser la corriente negativa este valor será negativo) de la corriente en cada pulso. Medido en nanoamperios (nA).
- **Potencial de membrana (V):** Pico máximo del potencial de membrana en cada pulso. Medido en milivoltios (mV).
- **Probabilidad de apertura (O):** Valor máximo de la probabilidad de apertura de los canales de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático. Adimensional.
- **Time to peak del calcio intracelular (TTP):** Tiempo que tarda la concentración de calcio intracelular en alcanzar el 90% de su valor máximo (por pulso) desde que se alcanza el 10% de dicho valor. Medido en milisegundos (ms).
- **Longitud de ciclo (BCL por sus siglas en inglés):** Tiempo que dura cada pulso, se mide desde el punto de máxima derivada de un pulso hasta el punto de máxima derivada del siguiente. Medido en milisegundos (ms).

Las dos últimas variables no se obtienen directamente de OpenCOR. Por ello, se calculan en Matlab a partir de la concentración intracelular de calcio y el potencial de membrana.

Un propósito de este trabajo es intentar reproducir los cambios experimentales observados en portadores de la mutación R420Q descrita anteriormente. Nos centramos en las alteraciones observadas en el nodo sino-auricular descritas por Wang et al. (2017). En dicho estudio, realizado en ratones portadores de la mutación, se presentan los principales cambios causados por la modificación genética:

- **Bradycardia:** Se observó una reducción de aproximadamente el 17.5% en el ritmo cardiaco, generando una bradicardia en los portadores de la mutación.

- **Pico máximo de la I_{CaL} :** La mutación produce una reducción del 41% en el pico máximo de la corriente entrante de calcio por los canales tipo L, dado que la corriente es negativa una reducción del pico implica valores menos negativos.
- **Tiempo de pico:** Se registró un aumento del 17% en el tiempo de pico de la concentración intracelular de calcio en presencia de la mutación.

Puesto que la mutación a estudiar afecta al canal RyR2, en primer lugar, se ha realizado un análisis de sensibilidad de los ratios de transición del modelo de Markov presentado en la figura 13.

5.1. ANÁLISIS SENSIBILIDAD RYR2

En el esquema de la figura 13 se observa el esquema del modelo propuesto por Stern et al. (1999) adoptado por Severi et al. (2012, 2017). Se trata del modelo de Markov más sencillo posible con cuatro velocidades de transición. Estudios experimentales de otras mutaciones del canal RyR2 revelan que los cambios experimentales se corresponden con una mayor probabilidad de apertura del canal que resulta en una ganancia de función (Fernández-Velasco et al., 2009). Por esta razón, analizaremos las velocidades del modelo considerando su efecto sobre el estado abierto. Los parámetros modificados son:

- K_0Ca : Parámetro relacionado con la velocidad de transición del estado cerrado al abierto, tanto si el canal se encuentra activo o inactivado.
- K_{om} : Velocidad de transición del estado abierto al cerrado, tanto activo como inactivo.
- K_{im} : Velocidad de transición del estado inactivado al activado, independientemente de que el canal se encuentre abierto o cerrado.
- K_iCa : Parámetro relacionado con la velocidad de transición del estado activo al inactivado, tanto si el canal se encuentra abierto o cerrado.

Para el estudio de sensibilidad se han considerado seis casuísticas en total, las cuatro velocidades individuales y la combinación de las agonistas. De esta forma, se generan otros dos parámetros:

- K_0Ca_Kim : Combinación de las velocidades de transición desde los estados cerrado y abierto-inactivado hacia el estado abierto.
- K_iCa_Kom : Combinación de las velocidades de transición desde el estado abierto hacia los estados cerrado y abierto-inactivado.

Para el análisis de sensibilidad se han realizado simulaciones multiplicando y dividiendo por 10 los parámetros. En el caso de los combinados se modifican los dos conformantes en la misma medida. Con estas dos simulaciones más la de control se elabora la tabla de sensibilidad haciendo uso de la primera herramienta descrita, **TablaSensibilidadFn**.

En cuanto a los modelos, se dispone de un modelo reciente de célula humana del nodo sino-auricular desarrollado por Severi et al. (2017). Este modelo deriva de uno previo de conejo del mismo grupo. Ambos tienen un esquema similar (figura 11) e incorporan los dos

relojes, el de calcio y el de membrana. Así pues, en primer lugar se realiza el análisis de sensibilidad de este modelo, obteniéndose la tabla siguiente:

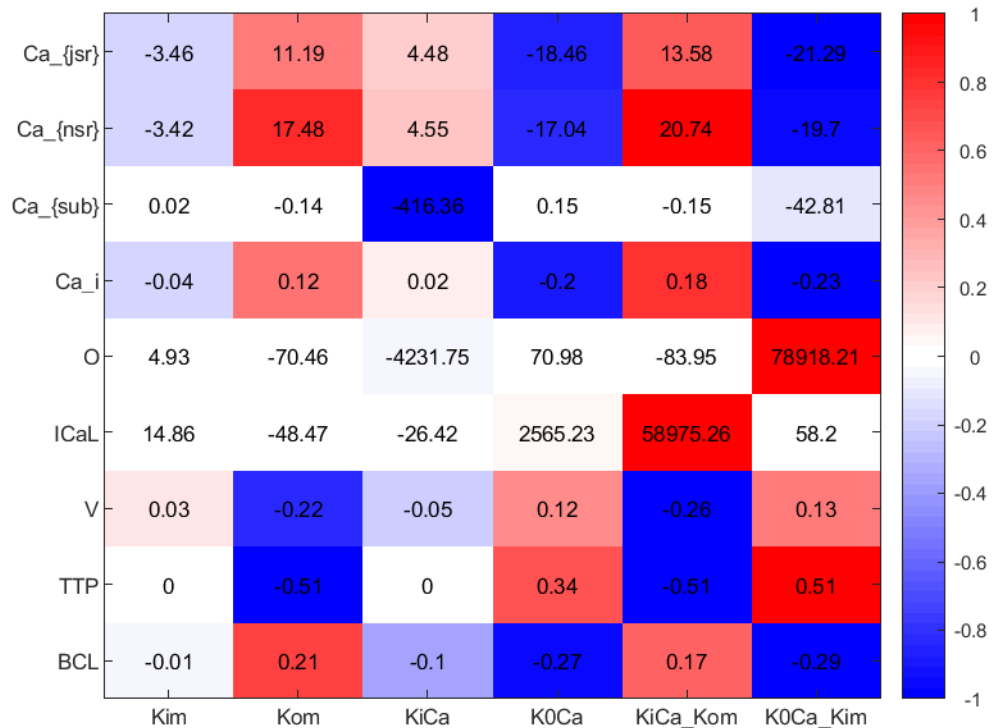


Figura 28: Tabla de sensibilidad del modelo del nodo sino-auricular de humano de Fabbri et al. (2017). La sensibilidad se ha calculado siguiendo las ecuaciones 12, 13 y 14, considerando la simulación multiplicando por 10 menos la dividiendo entre 10. El color azul indica que al aumentar el parámetro disminuye la variable mientras que el rojo indica lo contrario. Los números indican el valor de la sensibilidad, de forma que cuanto mayor sea su valor mayor será el cambio de la variable al aumentar el parámetro.

Con estas gráficas evaluamos la tendencia del modelo frente a cambios en los parámetros de interés. Observando la figura anterior vemos que no existe ningún parámetro con el cual se reproduzca la tendencia de los datos experimentales registrados en presencia de la mutación. No hay ninguna velocidad de transición o combinación de ellas cuya modificación reduzca el ritmo cardiaco (aumento del BCL, *basic cycle length*), aumente el tiempo de pico (TTP) y disminuya el pico máximo de la corriente I_{CaL} a la vez.

A continuación, consideramos el modelo de conejo del cual deriva el de humano. Realizamos el mismo análisis de sensibilidad obteniendo la siguiente tabla:

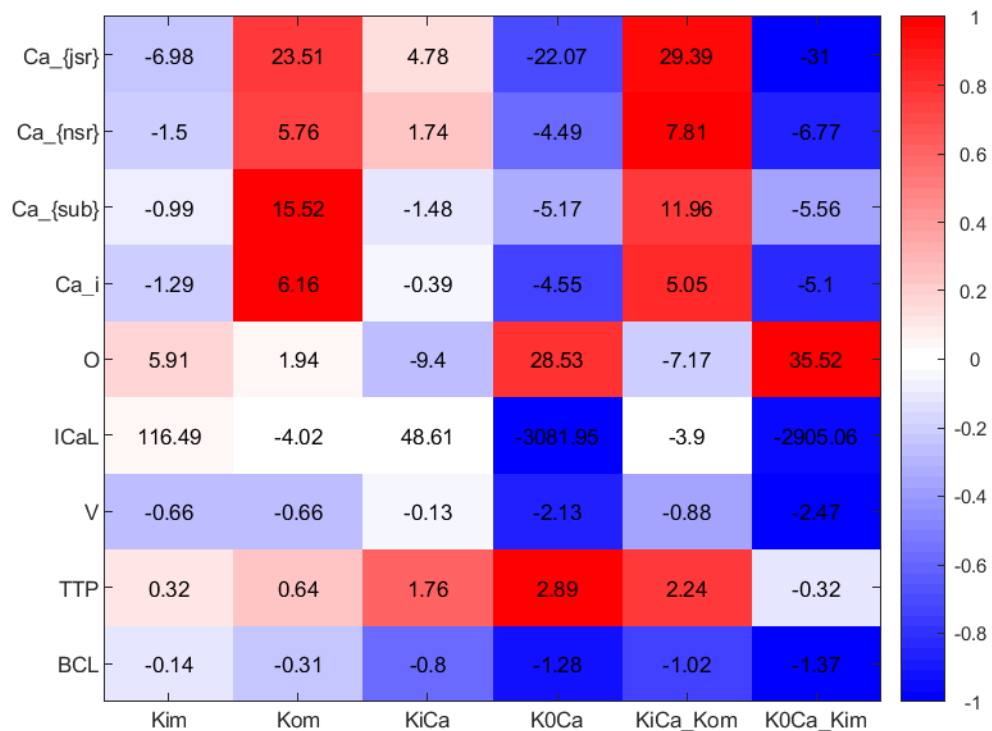


Figura 29: Tabla de sensibilidad para el modelo de célula del nodo sino-auricular de conejo desarrollado por Severi et al.(2012).

En este caso vemos como tampoco llegamos a reproducir todos los cambios experimentales al mismo tiempo. Sin embargo, se puede observar como el efecto que modificar los parámetros tiene sobre las variables de interés es mayor en este caso que en el modelo de humano. Los valores de sensibilidad son mayores en este caso y el número de celdas en blanco (poco efecto) es menor. A pesar de tratarse de un modelo celular de conejo, el mayor detalle que tiene al reproducir la dinámica del calcio celular (reloj de calcio de la figura 9 de la introducción) es de interés para este estudio. Por este motivo continuamos el estudio con este modelo, aun no siendo de la especie de interés.

5.2. ANÁLISIS MODELO MARKOV

Centrándonos en el modelo de conejo, se realizaron más simulaciones con el objetivo de intentar modelizar la tendencia observada en los datos experimentales. Para ello se consideraron las siguientes modificaciones por parámetro: multiplicar y dividir por 3, 10, 30 y 100. Los parámetros modificados son los mismos que en el análisis de sensibilidad.

En primer lugar se quiso estudiar la estabilidad de las simulaciones, puesto que las velocidades de transición del modelo se modificaban hasta en dos órdenes de magnitud. Para ello se hizo uso de la herramienta GraficosParametrosFn que representa los dos últimos pulsos de las simulaciones. Con ello se puede evaluar la morfología de las mismas además de observar la tendencia de las variables al modificar los parámetros. A

continuación se representan, a modo de ejemplo, algunas de las gráficas obtenidas para el parámetro combinado K_0Ca_Kim .

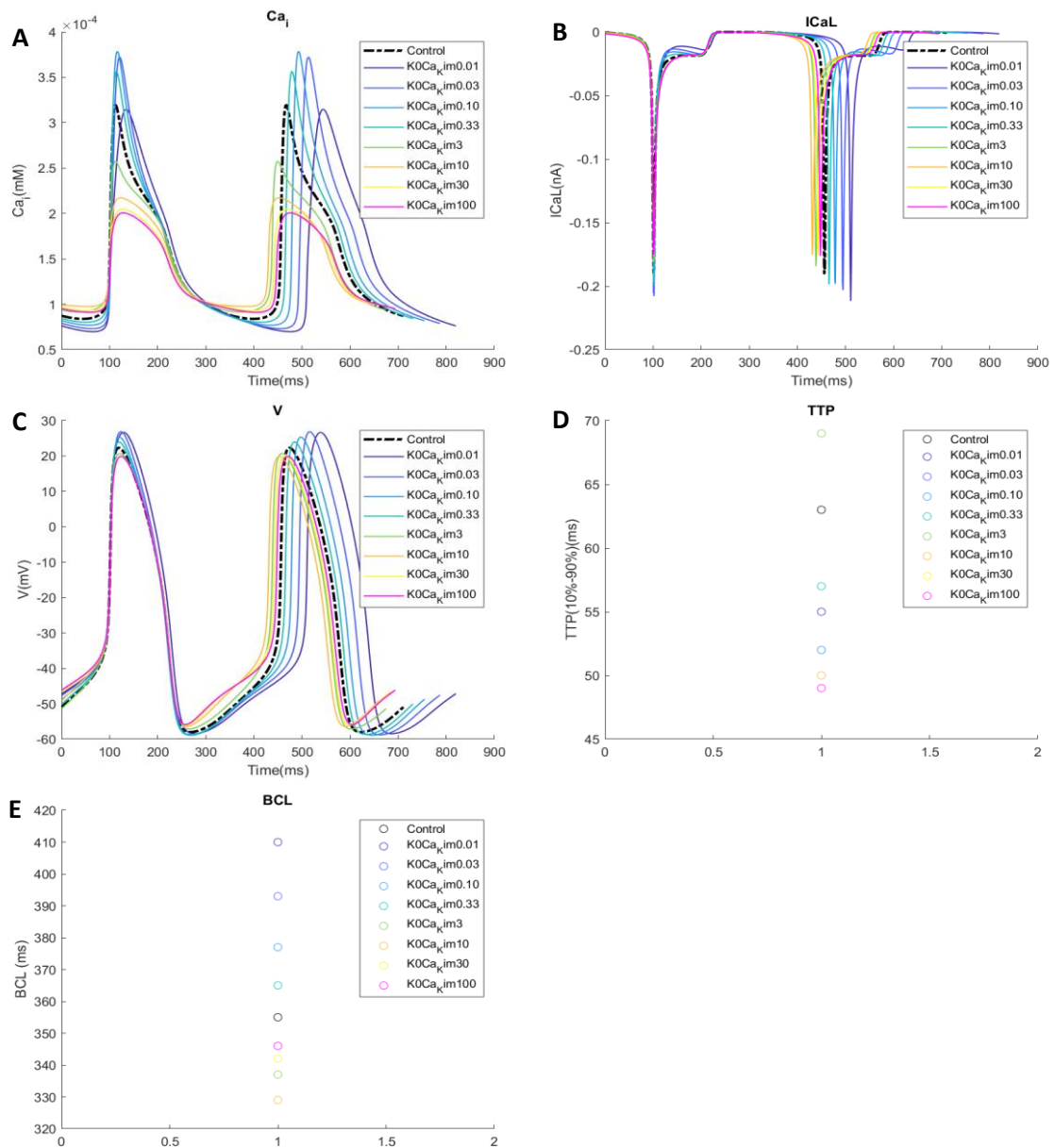


Figura 30: Resultados proporcionados por la herramienta GraficosParametrosFn al modificar el parámetro K_0Ca_Kim , se muestran todas las simulaciones realizadas. A. Concentración de calcio intracelular durante los dos últimos pulsos de la simulación. B. Evolución de la corriente de calcio de los canales tipo L durante los dos últimos pulsos de la simulación. C. Potencial de membrana durante los dos últimos pulsos de la simulación. D. Tiempo de pico de la concentración intracelular de calcio del último pulso. E. BCL, periodo del potencial de acción de la simulación.

Observando la figura anterior, podemos ver que las simulaciones son estables, es decir, los últimos pulsos tienen una morfología correcta y el modelo funciona de forma adecuada. Además, se aprecia que la tendencia que siguen las simulaciones se corresponde con las observadas en la tabla de sensibilidad (figura 29).

Además de las simulaciones realizadas al modificar K_0Ca_Kim (K_0Ca y Kim a la vez) mostradas en la figura 30, también se simularon las modificaciones del resto de parámetros. A partir de estas simulaciones se generaron gráficas similares a las de la figura 30 y se vio que todas las simulaciones eran estables.

Una vez comprobado esto, se elaboraron mediante la herramienta GraficoComparativoFn las gráficas que permiten visualizar todos los cambios en las variables al modificar los parámetros. Este tipo de gráficos se generaron para todas las variables del análisis de sensibilidad. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para las variables que se intentan ajustar a los datos experimentales:

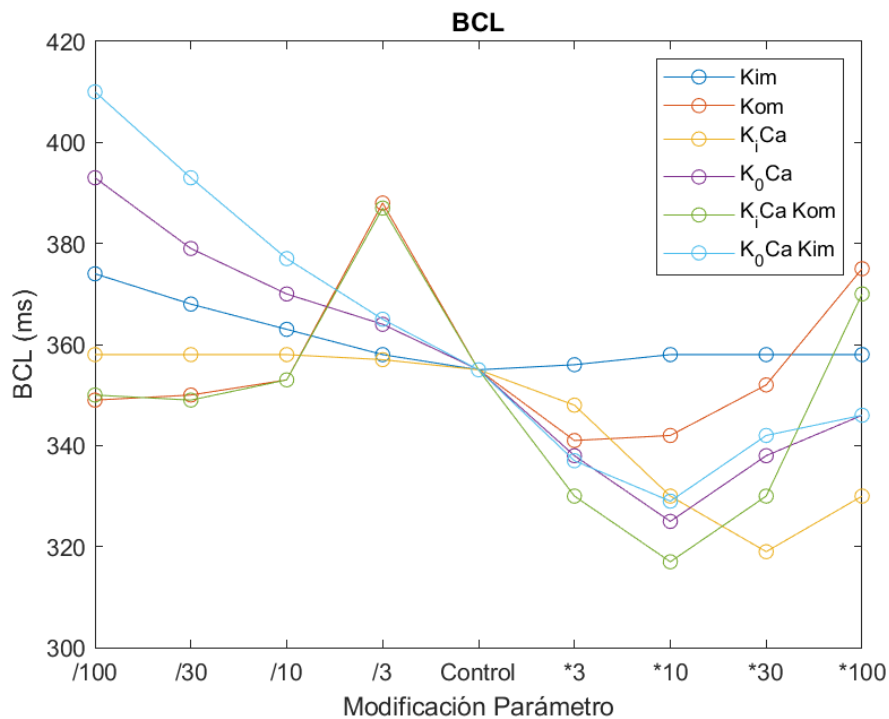


Figura 31: Evolución del BCL al modificar cada uno de los parámetros.

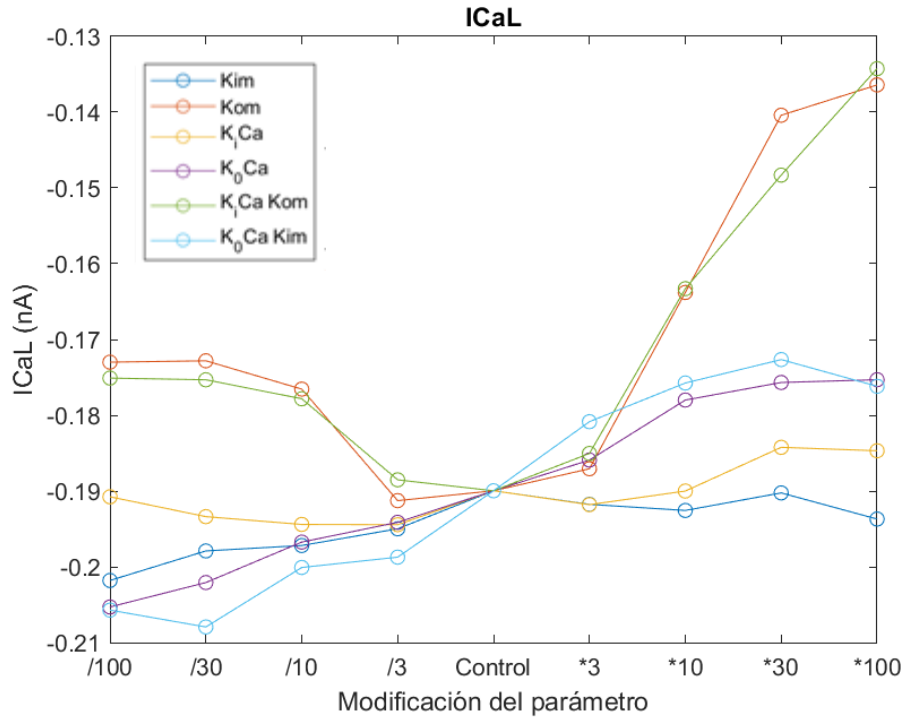


Figura 32: Evolución de la corriente de calcio tipo L al modificar cada uno de los parámetros.

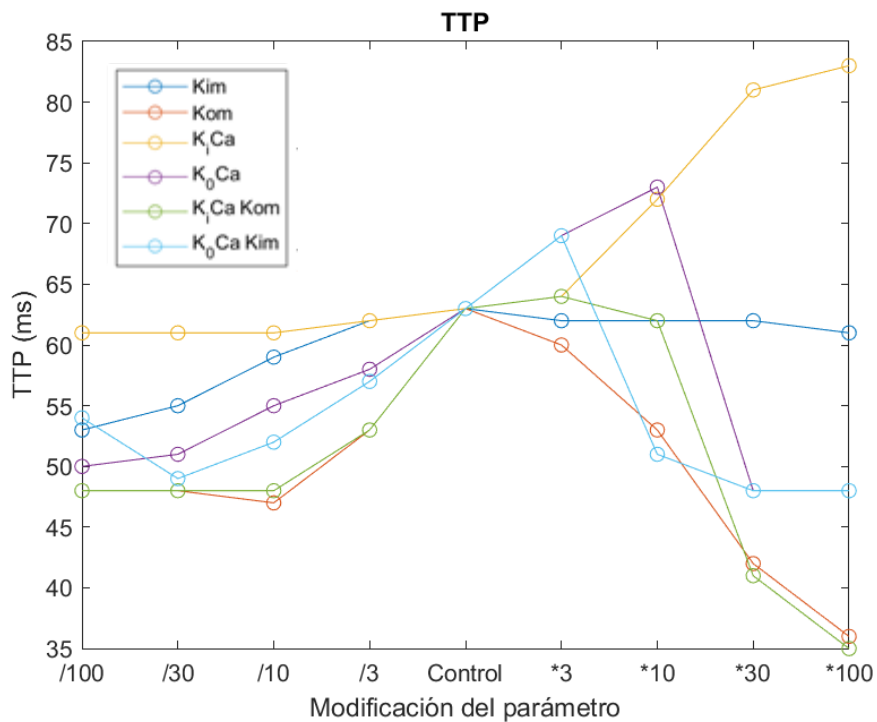


Figura 33: Evolución del tiempo de pico al modificar cada uno de los parámetros.

Observando las gráficas anteriores vemos que no es posible conseguir los tres cambios experimentales al mismo tiempo modificando solamente los parámetros del modelo de Markov. Es posible conseguir la tendencia deseada en la corriente de calcio y el tiempo de pico a la vez. Sin embargo, las modificaciones que consiguen esto disminuyen el BCL en lugar de aumentarlo. Estas simulaciones son:

- **Multiplicar K_0Ca por 10:** El tiempo de pico aumenta de 63 a 73 ms (15.87%). El pico de la corriente disminuye (en valor absoluto) de -0.190 a -0.178 nA (6.32%). El BCL disminuye de 355 a 325 ms (8.45%).
- **Multiplicar K_iCa por 100:** El tiempo de pico aumenta de 63 a 83 ms (31.74%). El pico de la corriente de calcio disminuye de -0.190 a -0.185 nA (2.63%). El BCL disminuye de 355 a 330 ms (7.04%).
- **Multiplicar K_0Ca_{Kim} por 3:** El tiempo de pico aumenta de 63 a 69 ms (9.52%). El pico de la corriente disminuye de -0.190 a -0.181 nA (4.73%). El BCL disminuye de 355 a 337 ms (5.07%).

En el primero de los casos se consigue un aumento del tiempo de pico similar a los obtenidos experimentalmente, 15.87% frente al 17% experimental. En cuanto al pico de la corriente de calcio, los cambios obtenidos modificando los parámetros del modelo de Markov son significativamente menores a los experimentales, máxima reducción del 6.32% frente al 41% experimental. Por último, el BCL no aumenta en ningún caso, la reducción mínima es del 5.07% frente al 17.5% de aumento en los datos experimentales.

Con los resultados del modelo de Markov obtenidos, se buscan otros parámetros que modificar en combinación con los anteriores para aproximarse más a los datos experimentales disponibles.

5.3. ANÁLISIS DEL DESPLAZAMIENTO DE LA COMPUERTA DE ACTIVACION DE I_{CaL}

En el artículo publicado por Fabbri et al. (2017) donde se presentaba el modelo celular del nodo sino-auricular de humano anteriormente mencionado, aparece una análisis de sensibilidad realizado por el grupo. Este análisis se centraba en variables relacionadas con el ritmo cardiaco y el control de la automaticidad del nodo. Atendiendo a este análisis, la única variable del reloj de membrana capaz de modificar el ritmo cardiaco de la forma que se busca en este estudio es un desplazamiento (*shift*) en el voltaje de la compuerta de activación (dL) del canal de calcio tipo L.

Dado que el modelo de humano deriva directamente del de conejo que estamos considerando, se busca modificar este parámetro en combinación con los antes expuestos para intentar ajustar los resultados. Para explicar las modificaciones que se van a realizar, a continuación, se presentan las ecuaciones que regulan el comportamiento de la compuerta de activación dL del canal de calcio tipo L:

$$\tau_{dL} = \frac{0.001}{\alpha_{dL} + \beta_{dL}} \quad (\text{Ec. 15})$$

$$\alpha_{dL} = \frac{-0.02839 \cdot (V+1.8)}{e^{\frac{-(V+41.8)}{2.5}} - 1} - \frac{0.0849 \cdot (V+6.8)}{e^{\frac{-(V+6.8)}{4.8}} - 1} \quad (\text{Ec. 16})$$

$$\beta_{dL} = \frac{0.01143 \cdot (V+6.8)}{e^{\frac{V+1.8}{2.5}} - 1} \quad (\text{Ec. 17})$$

$$dL_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\frac{-(V+16.45)}{4.337}}} \quad (\text{Ec. 18})$$

$$\frac{ddL}{dTime} = \frac{dL_{\infty} - dL}{\tau_{dL}} \quad (\text{Ec. 19})$$

La modificación que se va a realizar es añadir un desplazamiento, positivo o negativo, a las ecuaciones 16, 17 y 18 en todos los lugares donde aparece la variable V que se corresponde con el potencial de membrana. Para establecer un rango de trabajo para el desplazamiento se emplea la herramienta del protocolo de *Voltage clamp*. El protocolo seguido es el mismo utilizado por Wang et al. (2017) en el estudio de donde se obtienen los datos experimentales. El potencial de membrana se fijó en -10 mV. A continuación se presenta una gráfica con los resultados obtenidos:

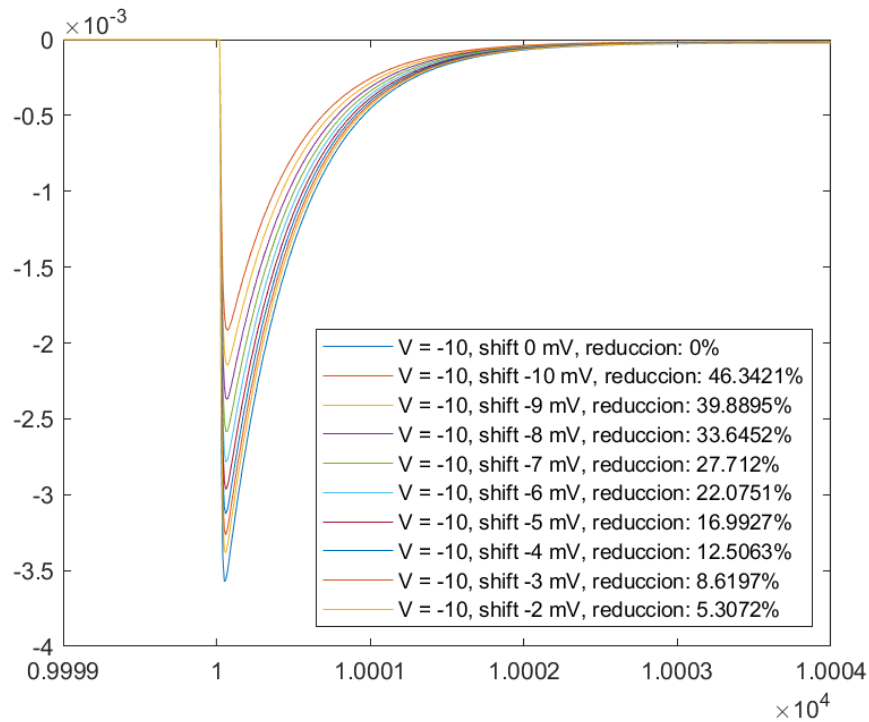


Figura 34: Resultados del protocolo de voltage clamp para la corriente de calcio tipo L del modelo de conejo.

El valor de reducción de la corriente de calcio observado experimentalmente es del 41%. Atendiendo a los resultados obtenidos, este valor se conseguiría restando un potencial de entre 10 y 9 mV a las ecuaciones 16, 17 y 18. Cuando se introduce este desplazamiento de potencial en el modelo completo la interacción con el resto de componentes hace que el modelo no dispare o lo haga de forma inestable. El desplazamiento máximo que se puede aplicar manteniendo la funcionalidad del modelo es de -5 mV donde se consigue una reducción del 8.62% en la corriente de calcio.

Teniendo esto en cuenta se realizan nuevas simulaciones, combinando un desplazamiento de la compuerta de activación de -5 mV con los parámetros del modelo de Markov que modificaban el tiempo de pico y la corriente de calcio siguiendo la tendencia deseada (K_0Ca , K_iCa y K_0Ca_Kim). Los parámetros se modifican de igual manera que en el apartado anterior. Sin embargo, al combinar las modificaciones de la compuerta dL y del modelo de Markov el modelo no es estable con -5 mV de desplazamiento. Es necesario reducirlo a -3 mV para conseguir estabilidad. A continuación se presentan los resultados de estas simulaciones:

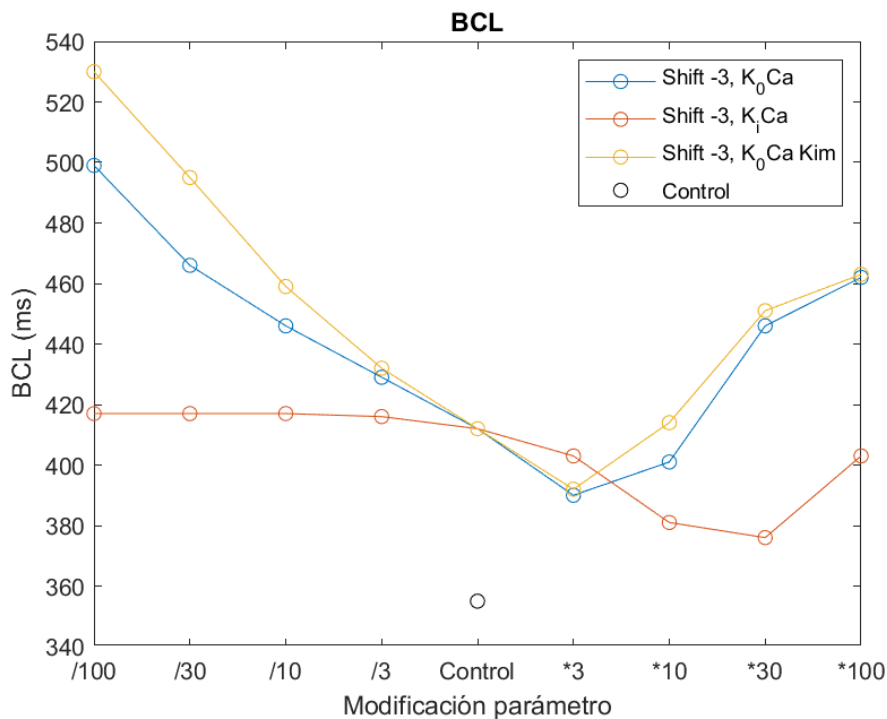


Figura 35: Evolución del BCL al aplicar un desplazamiento de -3 mV en la compuerta de activación de la $ICaL$ y modificar los parámetros del modelo de Markov del $RyR2$. El punto en negro representa el valor del BCL en control, sin alterar dL.

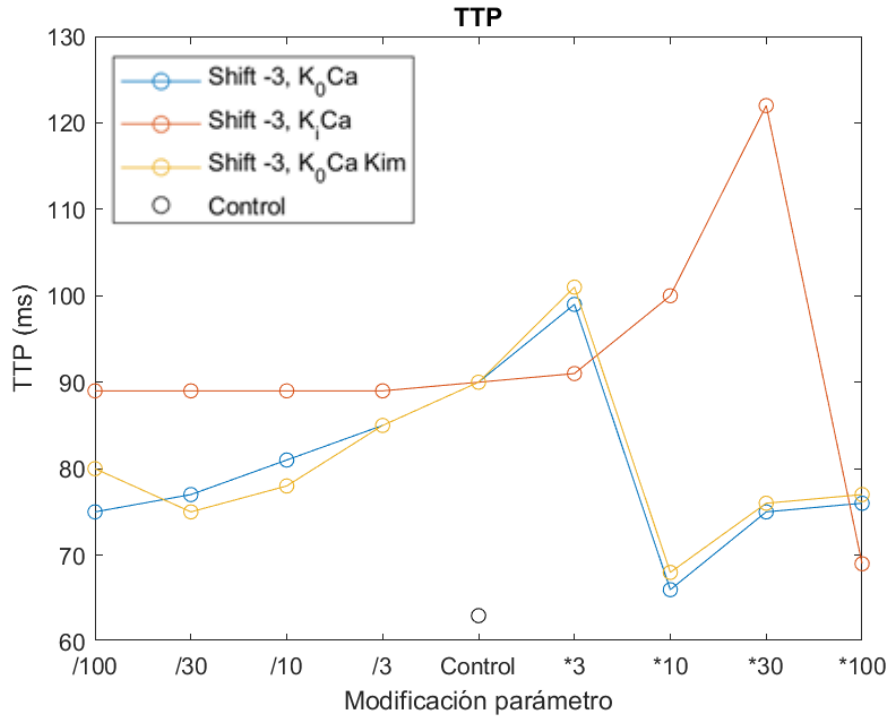


Figura 36: Evolución del tiempo de pico al aplicar un desplazamiento de -3 mV en la compuerta de activación de la $ICaL$ y modificar los parámetros del modelo de Markov del $RyR2$. El punto en negro representa el valor del tiempo de pico en control, sin alterar dL .

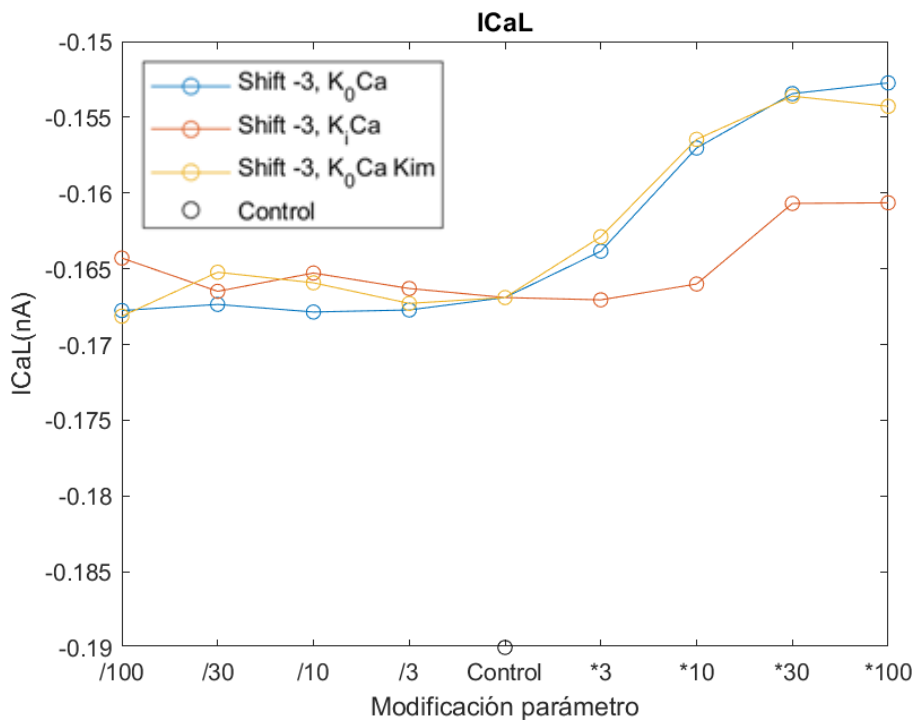


Figura 37: Evolución del pico máximo de la $ICaL$ al aplicar un desplazamiento de -3 mV en la compuerta de activación de la $ICaL$ y modificar los parámetros del modelo de Markov del $RyR2$. El punto en negro representa el valor del pico en control, sin alterar dL .

En las figuras anteriores se comparan los resultados de las simulaciones con dos puntos de control: el valor obtenido para la simulación donde sólo se ha desplazado -3 mV la compuerta dL sin alterar los ratios del modelo de Markov y el resultado de la simulación donde no se ha modificado ningún parámetro. Esta última se representa de forma aislada y en negro.

Se puede observar cómo, con la aplicación de un desplazamiento en la compuerta dL de -3 mV, se consigue la tendencia deseada en las tres variables: aumentar el BCL, aumentar el tiempo de pico y disminuir el pico de la I_{CaL} . Sin embargo, añadir las modificaciones de los parámetros del modelo de Markov permite ajustar mejor los resultados.

A continuación se presentan tablas que recogen los porcentajes de variación de las tres variables de interés obtenidos en las simulaciones anteriores:

K ₀ Ca								
Modificación parámetros	/100	/30	/10	/3	x3	x10	x30	x100
BCL (%)	40.56	31.27	25.63	20.85	9.86	12.96	25.63	30.14
TTP (%)	19.05	22.22	28.97	34.92	57.14	4.76	19.04	20.63
I _{CaL} (%)	-11.68	-11.89	-11.63	-11.74	-13.79	-13.37	-19.26	-19.63

Tabla 2: Porcentajes de variación del BCL, tiempo de pico y pico máximo de la corriente de calcio tipo L frente a cambios en K₀Ca.

K _i Ca								
Modificación parámetros	/100	/30	/10	/3	x3	x10	x30	x100
BCL (%)	17.46	17.46	17.46	17.18	13.52	7.32	5.91	13.52
TTP (%)	41.27	41.27	41.27	41.27	44.44	58.73	93.65	9.52
I _{CaL} (%)	-13.53	-12.37	-13	-12.47	-12.65	-12.63	-15.42	-15.47

Tabla 3: Porcentajes de variación del BCL, tiempo de pico y pico máximo de la corriente de calcio tipo L frente a cambios en K_iCa.

K ₀ Ca Kim								
Modificación parámetros	/100	/30	/10	/3	x3	x10	x30	x100
BCL (%)	49.30	39.44	29.30	21.69	10.42	16.62	27.04	30.42
TTP (%)	26.98	19.64	23.81	34.92	60.31	7.94	20.63	22.22
I _{CaL} (%)	-11.53	-13.05	-12.68	-11.95	-14.26	-17.63	-19.16	-18.79

Tabla 4: Porcentajes de variación del BCL, tiempo de pico y pico máximo de la corriente de calcio tipo L frente a cambios en K₀Ca_Kim

Con estas simulaciones se busca reproducir los cambios experimentales registrados en presencia de la mutación R420Q del RyR2 obtenidos por Wang et al. (2017), que son: 41% de reducción del pico máximo de la I_{CaL} , 17% de aumento del tiempo de pico y 17.5% de aumento del BCL. Atendiendo a los resultados obtenidos se puede observar que no es posible obtener el porcentaje de reducción de la corriente de calcio deseado. El máximo que se puede conseguir con estos cambios es aproximadamente del 19% frente al 41% observado experimentalmente. Por otro lado, el parámetro K_iCa eleva el tiempo de pico en porcentajes muy superiores a los experimentales. Finalmente, los parámetros K_oCa y el combinado K_oCa_Kim tienen un comportamiento muy similar, indicando que los cambios se deben principalmente al K_oCa , siendo el efecto de Kim prácticamente nulo.

Considerando lo anterior, la combinación que más se aproxima a los valores experimentales es el desplazamiento de -3 mV y multiplicar por 30 K_oCa . En ese caso, el tiempo de pico aumenta un 19.04%, valor similar al 17% experimental. El BCL (*basic cycle length*) aumenta un 25.63% frente al 17.5% experimental. Por último, la I_{CaL} disminuye un 19.26%, que es inferior al 41% experimental pero es la máxima reducción que se ha podido obtener. A continuación, se presentan la evolución de la concentración intracelular de calcio, I_{CaL} y potencial de membrana par el modelo de mutación elegido y control.

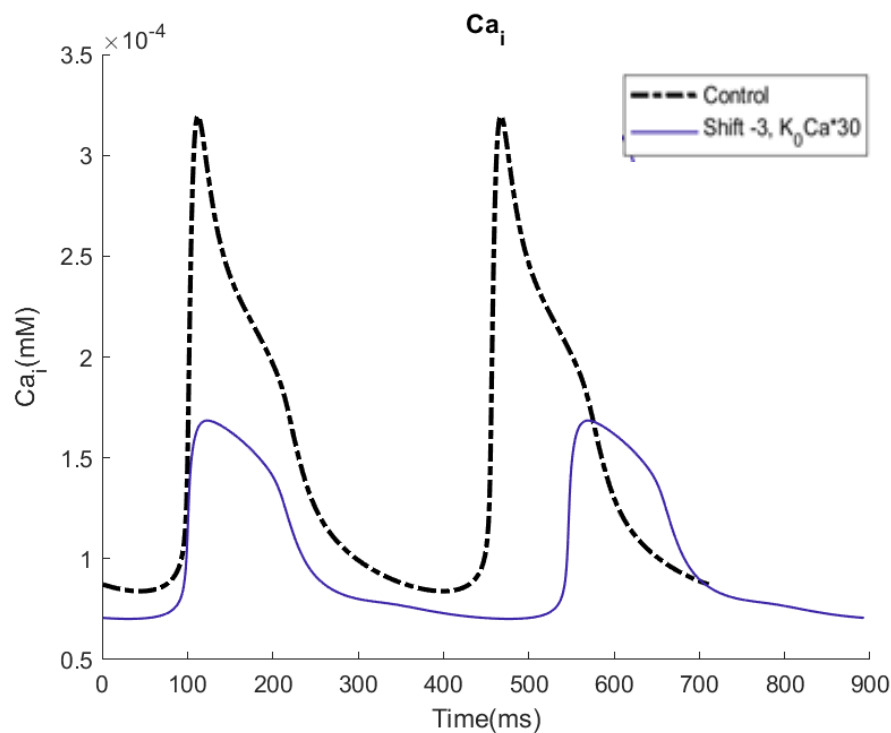


Figura 38: Evolución temporal de la concentración intracelular de calcio de los últimos pulsos de la simulación con un desplazamiento de la compuerta dL de -3 mV y multiplicando por 30 K_oCa (modelo de la mutación R420Q del RyR2), y en control.

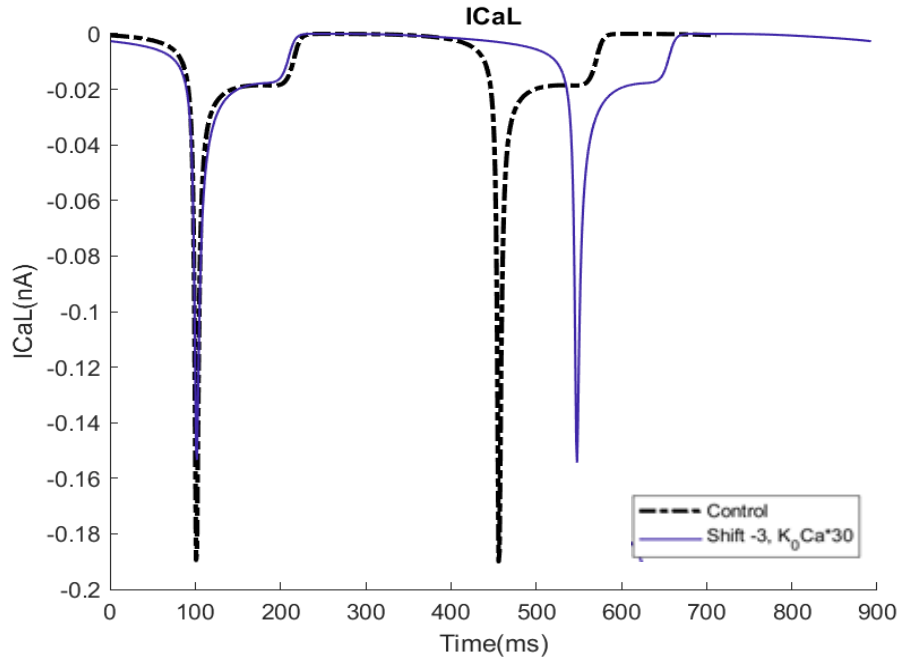


Figura 39: Evolución temporal de la I_{CaL} calcio de los últimos pulsos de la simulación con un desplazamiento de la compuerta dL de -3 mV y multiplicando por 30 K_{0Ca} (modelo de la mutación R420Q del RyR2), y en control.

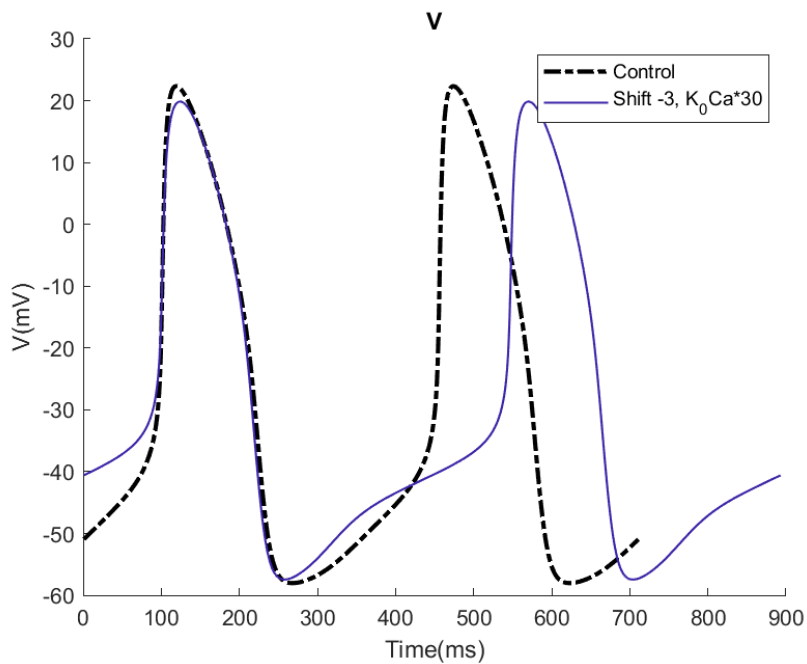


Figura 40: Evolución temporal del BCL de los últimos pulsos de la simulación con un desplazamiento de la compuerta dL de -3 mV y multiplicando por 30 K_{0Ca} (modelos de la mutación R420Q del RyR2), y en control.

Se puede observar como la morfología de la concentración intracelular de calcio es la más afectada, no solo aumenta el tiempo de pico, sino que la concentración máxima que se alcanza es menor. En cuanto a la corriente de calcio, la morfología se mantiene al aplicar los cambios, tan solo varía el pico máximo. Finalmente, el potencial de membrana mantiene su forma, el BCL aumenta porque la fase de equilibrio inestable (fase 4 de la figura 9 de la introducción) es más larga que en la simulación de control. Estos cambios se ajustan correctamente de forma cualitativa a los datos experimentales disponibles, por lo que se propone un modelo para la mutación R420Q del RyR2 que consiste en aplicar un desplazamiento de la compuerta de activación de I_{CaL} (dL) de -3 mV y multiplicar por 30 el parámetro K_0Ca , del cual depende la velocidad de transición del estado cerrado al abierto del RyR2.

6. CONCLUSIONES

El principal objetivo de este trabajo es desarrollar herramientas que permitieran analizar los efectos de alteraciones de la dinámica de calcio intracelular. Este objetivo se puede considerar cumplido, pues se han desarrollado las herramientas necesarias para tal fin. Además, se ha elaborado una sencilla interfaz gráfica para el manejo del *software* creado.

Se ha programado el cálculo de dos biomarcadores de interés no disponibles de forma directa al realizar simulaciones, el tiempo de pico de la concentración intracelular de calcio y el periodo del potencial de acción (BCL *basic cycle length*). Además se ha implementado el cálculo de sensibilidad siguiendo las ecuaciones de Romero et al. (2009) necesario para realizar los análisis posteriores.

Se han analizado los datos experimentales disponibles relacionados con una mutación cardiaca, la R420Q del canal de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (RyR2) estudiada por Wang et al. (2017). A partir de dichos datos se han obtenido las variaciones que dicha mutación produce en tres biomarcadores, aumento del BCL, aumento del tiempo de pico de la concentración intracelular de calcio y disminución del pico máximo de la corriente de calcio tipo L.

En relación a los modelos estudiados para ajustar los cambios experimentales, se seleccionaron dos, uno de conejo y otro de humano. Ambos tienen una formulación similar ya que el segundo deriva directamente del primero. En primer lugar, dado que la mutación afecta al canal RyR2, se ha realizado un análisis de sensibilidad de los efectos de modificar las velocidades de transición del modelo de Markov del canal. Con este primer análisis, se descarta el modelo de humano por presentar una sensibilidad menor que el de conejo.

Posteriormente, con el modelo de conejo, se realizaron más modificaciones en las velocidades de transición para intentar ajustar los datos experimentales. En este caso, haciendo uso de las herramientas, se comprobó previamente la estabilidad de las simulaciones. A continuación, se analizaron las variaciones sistemáticas de los biomarcadores para con el objetivo de reproducir los cambios experimentales. Se observó que no era posible conseguir todos los resultados deseados únicamente modificando el modelo de RyR2. Para continuar con el estudio se seleccionaron tres parámetros del modelo de Markov, K_0Ca , K_iCa y K_0Ca_Kim , que conseguían la tendencia adecuada en el tiempo de pico y la corriente de calcio.

Para reproducir los cambios experimentales en el BCL (*basic cycle length*), se recurre a un análisis de sensibilidad previo que mostraba como un desplazamiento en la compuerta de activación de la corriente de calcio tipo L (dL) permite regular el BCL. Combinando los efectos del desplazamiento de la compuerta con el de los tres parámetros del modelo de Markov mencionados anteriormente se logran reproducir las tendencias de los datos experimentales. Con un desplazamiento de -3 mV en la compuerta de activación de la corriente de calcio tipo L y multiplicando por 30 K_0Ca se consiguen porcentajes de variación del tiempo de pico y el BCL similares a los experimentales. En cuanto a la corriente de calcio, la reducción lograda es menor que la experimental, pero es la máxima obtenida para las simulaciones realizadas.

Estas herramientas podrán ser utilizadas posteriormente con distintos modelos computacionales para evaluar diferentes cambios modificando cualquier parámetro del modelo. Con esta herramienta, y disponiendo de datos experimentales, se podrán desarrollar otros modelos personalizados que se ajusten a las necesidades de cada caso clínico.

7. LÍNEAS FUTURAS

En base a lo expuesto en el presente trabajo, existe una serie de líneas futuras con las que mejorar la herramienta.

- Crear una librería de los principales modelos computacionales cardiacos disponibles en Matlab y C++. De esta forma se tendría acceso rápido a los modelos usados en el estado del arte y se podrían evaluar los efectos de las modificaciones de parámetros en cada uno de ellos.
- Modificar la interfaz y herramientas para variar parámetros y simular directamente desde ella. Con esto se reduciría el tiempo de análisis y aumentaría la comodidad de manejo de las herramientas, al no tener que realizar las simulaciones y exportarlas manualmente a archivos CSV.
- Análisis de los efectos sobre modelos de otras regiones cardiacas, por ejemplo los ventrículos. De esta forma se podrían estudiar patologías como arritmias potencialmente mortales.
- Expandir el modelo a mayores dimensiones como 1D y 2D las modificaciones que se han realizado en el modelo celular de modo que se puedan estudiar otras propiedades electrofisiológicas que dependan de la propagación. Con estos modelos podría estudiarse la generación de arritmias.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Drake et al., R. L. (2010). *Gray Anatomía para estudiantes* (2ª ed.). Barcelona: Elsevier.
- Ferrero Corral et al., J. M. (1994). Bioelectrónica. *Señales bioeléctricas*. Valencia: Servicio de Publicaciones UPV.
- Ferrero y de Loma-Osorio, J. M. (2016). Material de clase: Bioelectricidad. Valencia: Grado en Ingeniería Biomédica.
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Guyton & Hall tratado de fisiología médica* (12ª ed.). Barcelona: Elsevier.
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Bulletin of Mathematical Biology*, 117, 500–544. <https://doi.org/10.1007/BF02459568>
- Rudy, Y., & Silva, J. R. (2006). Computational biology in the study of cardiac ion channels and cell electrophysiology. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 39(1), 57. <https://doi.org/10.1017/S0033583506004227>
- Loewe, L. (2008) Genetic mutation. *Nature Education* 1(1):113
- Manfredi O, Maltsev VA, Lakatta EG. Modern concepts concerning the origin of the heartbeat. *Physiology* 2013;28:74–92.
- Montagud Balaguer, V. (2015). Arritmias. Recuperado el 15 de junio, 2018, from <http://www.fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/arritmias.html>
- Raisman, J., & Gonzalez, A. M. (2013). Hipertextos del área de biología. Recuperado el 2 de junio de 2018 de <http://www.biologia.edu.ar/>
- Wang, Y. (2017). RyR22R420Q catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation induces bradycardia by disturbing the coupled clock pacemaker mechanism. *JCI Insight*, 2(8).
- Domingo, D. (2014). *Rasgos no ventriculares, clínicos y funcionales de la mutación RyR22R420Q causante de taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica*.
- Fabbri, A. (2017). Computational analysis of the human sinus node action potential: model development and effects of mutations. *The Journal of Physiology*, 595(7), pp.2365-2396.
- Severi, S. (2012). An updated computational model of rabbit sinoatrial action potential to investigate the mechanisms of heart rate modulation. *The Journal of Physiology*, 590(18), pp.4483-4499.
- Stern, M. (1999). Local control models of cardiac excitation-contraction coupling. *The Rockefeller University Press*, 113, pp.469-489.

PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN

En el siguiente documento se recogen los costes asociados a la elaboración del trabajo antes descrito. Para ello se han considerado tres tipos de costes:

- Costes de mano de obra.
- Costes de *hardware*.
- Costes de *software*.

El coste del *hardware* y el *software* se corresponde con el precio de venta al público de los diferentes productos.

2. PRESUPUESTO DETALLADO

A continuación se desglosan los componentes de cada uno de los tipos de costes presentados anteriormente.

2.1. COSTE DE MANO DE OBRA

Comprenden los costes correspondientes al trabajo de las personas físicas implicadas en la elaboración del estudio. Dichas personas han sido:

- D^a Lucía Romero Pérez: Doctora Ingeniera Industrial especializada en bioelectricidad. Ha realizado las tareas de supervisión y corrección del trabajo.
- D. Fernando Escobar Roperro: Estudiante del Grado de Ingeniería Biomédica. Responsable de la realización de la herramienta *software* y análisis de los resultados.

En la siguiente tabla (tabla 5) se desglosan los costes de mano de obra. Los costes unitarios se han estimado atendiendo a la categoría del personal, siendo la de la doctora ingeniera superior a la del estudiante.

Tipo de mano de obra	Cantidad (horas)	Coste unitario (€/h)	Coste total (€)
Estudiante	300	15.00	4500
Doctora Ingeniera	30	25.00	750
SUBTOTAL			5250

Tabla 5: Desglose de los costes de mano de obra del trabajo.

El coste total de la mano de obra es de **cinco mil doscientos cincuenta euros** (5250 €)

2.2. COSTE DE HARDWARE

Se han utilizado dos ordenadores personales, uno de sobremesa y otro portátil, para realizar todo lo requerido por el trabajo. También se ha usado un disco duro externo para transporte y copia de seguridad de los archivos del proyecto. En la tabla 6 se recogen los costes desglosados:

Descripción	Cantidad	Coste (€) sin IVA	Vida útil (meses)	Tiempo de uso (meses)	Coste imputable (€) sin IVA
Sobremesa HP ENVY	1	1074.37	72	5	74.61
Portátil HP OMEN	1	849.99	60	5	70.83
Disco duro Toshiba 500 Gb	1	40	96	5	2.08
SUBTOTAL					147.52

Tabla 6: Desglose de los costes de hardware del trabajo.

El coste imputable de la tabla se ha calculado teniendo en cuenta las amortizaciones de los productos empleados según la fórmula:

$$\text{Coste imputable} = \frac{\text{Tiempo de uso} \cdot \text{Coste}}{\text{Vida útil}} \quad (\text{Ec. 1})$$

El coste total del *hardware* es de **ciento cuarenta y siete euros con cincuenta y dos céntimos** (147.52 €)

2.3. COSTE DE SOFTWARE

Para la realización del trabajo se han utilizado los siguientes programas:

- Windows 10 (Microsoft Corporation, Redmond (WA), EEUU): Sistema operativo de los ordenadores utilizados. En el precio del equipo se incluye la licencia de este *software*.
- Matlab 2018Ra (TheMathWorks Inc., Natick (MA), EEUU): Programa utilizado para desarrollar la interfaz gráfica y analizar los resultados obtenidos.
- OpenCOR: Programa de acceso libre utilizado para realizar las simulaciones con el modelo celular empleado.
- Microsoft Office 365 (Microsoft Corporation, Redmond (WA), EEUU): Suite ofimática empleada para redactar los documentos de la memoria.

Descripción	Cantidad	Coste (€) sin IVA	Duración licencia (meses)	Tiempo de uso (meses)	Coste imputable (€) sin IVA
Windows 10	1	0	De por vida	5	0
Matlab R2018a	1	800	12	5	333.33
OpenCOR	1	0	De por vida	5	0
Microsoft Office 365	1	57.02	12	5	23.76
SUBTOTAL					357.09

Tabla 7: Desglose de los costes de software del trabajo.

Para el coste imputable se ha usado la ecuación 1 sustituyendo la vida útil por la duración de la licencia.

El coste total del *software* es de **trescientos cincuenta y siete euros con nueve céntimos** (357.09 €).

3. PRESUPUESTO FINAL

El presupuesto total del trabajo se obtiene sumando los costes de todos los componentes del proyecto para formar el coste de ejecución material. Sobre ese coste se aplica un 16% en concepto de gastos generales. Tanto al coste de ejecución material como a los gastos generales se les aplica el impuesto sobre el valor añadido (IVA) del 21%. Finalmente, sobre el coste de ejecución material se aplica un 6% de beneficio industrial que se añadirá a lo anterior para obtener el presupuesto total del trabajo.

Descripción	Coste imputable sin IVA (€)	Coste con IVA (€)
Coste ejecución material	5754.61	6963.08
Gastos generales	920.74	1114.10
Beneficio industrial	345.27	345.27
TOTAL	7020.62	8422.45

Tabla 8: Coste total del trabajo

El presupuesto total del proyecto es de **ocho mil cuatrocientos veintidós euros con cuarenta y cinco céntimos** (8422.45 €)