



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE MASTER EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

MODELADO Y SIMULACIÓN DE MUTACIONES CAUSANTES DE LA TAQUICARDIA VENTRICULAR POLIMÓRFICA CATECOLAMINÉRGICA

AUTOR: FERNANDO ESCOBAR ROPERO

TUTOR: LUCÍA ROMERO PÉREZ

Curso Académico: 2018-19

*Quisiera dedicar este Trabajo
Final de Máster 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, una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en países desarrollados son las arritmias cardiacas. Por este motivo su prevención y tratamiento son uno de los principales desafíos de los sistemas de salud. Las mutaciones genéticas, cuyo estudio se ha extendido en los últimos años, tienen gran importancia en la producción de estas arritmias.

El objetivo de este trabajo final de máster es modelizar la mutación RyR2^{R4497C} del canal de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (RyR2) y la mutación del tipo CASQ2(-/-) de la proteína calsequestrina. Para la modelización de la mutación del RyR2 se ha utilizado una herramienta de ajuste automático de parámetros. El modelo matemático celular empleado ha sido el de cardiomiocito ventricular desarrollado por Grandi y colaboradores (2010) con las modificaciones introducidas por Moreno y colaboradores (2013), que incorpora un modelo de Markov del canal RyR. Para la mutación CASQ2(-/-) nos hemos basado en el modelo desarrollado por Yang y colaboradores (2015) y lo hemos adaptado para incluirla en el modelo matemático utilizado en este estudio. Para el estudio poblacional se han modificado las principales corrientes de membrana en un rango de $\pm 100\%$ de su valor en control siguiendo una distribución uniforme. Para evaluar la importancia de las corrientes modificadas en la población se ha realizado una correlación entre dichas corrientes y los biomarcadores estudiados.

El modelo de la mutación RyR2^{R4497C} reproduce los biomarcadores para la mutación, es decir, un pico máximo de calcio intracelular de 4.63 y 5.53 mM a 2Hz con y sin beta estimulación respectivamente y 3.70 y 4.37 mM a 3Hz con y sin beta estimulación. Un tiempo de pico del calcio intracelular de 22.70 y 25.70 ms a 2Hz con y sin beta estimulación y 29.90 y 31.60 ms a 3Hz con y sin beta estimulación. La adaptación la mutación CASQ2(-/-) reproduce las alteraciones electrofisiológicas observadas, esto es la aparición de actividad eléctrica ectópica entre los pulsos de la simulación y de actividad espontánea al finalizar la estimulación. En el estudio poblacional se han obtenido 628 modelos válidos cuya duración del potencial de acción en control se encuentra dentro de los rangos fisiológicos experimentales. Al introducir la mutación RyR2^{R4497C} en la población se produce actividad eléctrica espontánea en 102 y 76 modelos a 2 y 3Hz respectivamente, en ambos casos con beta estimulación. En el caso de la mutación de la calsequestrina esta cantidad asciende a 42 modelos a 2Hz sin beta estimulación, 513 a 2Hz con estimulación, 199 a 3Hz sin beta estimulación y 456 a 3Hz con estimulación. La bomba de sodio-potasio y la componente rápida de la corriente diferida de potasio son las variables que presentan valores mayores de correlación y por lo tanto las que más afectan a los biomarcadores.

En conclusión, se han modelizado y simulado las mutaciones RyR2^{R4497C} y CASQ2(-/-) causantes de la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica. Se reproducen los efectos observados experimentalmente para ambas mutaciones. El estudio poblacional realizado sobre el modelo en control y los modelos de las dos mutaciones muestran que la bomba de sodio-potasio y la componente rápida de la corriente diferida de potasio son las más relevantes a la hora de modificar los biomarcadores estudiados.

Palabras clave: Mutaciones cardiacas, modelos computacionales, RyR2^{R4497C}, calsequestrina, población de modelos

ABSTRACT

Nowadays, cardiac arrhythmias are one of the most important causes of mortality and morbidity in developed countries. For this reason, their prevention and treatment are among the main challenges for the health services. Genetic mutations, which study has seen an increase in recent years, do play an important role in the appearance of such arrhythmias.

The objective of this end of master project is to model the RyR2^{R4497C} mutation of the sarcoplasmic reticulum calcium release channel (RyR2) and the CASQ2(-/-) type mutation of the protein calsequestrin. In order to model the RyR2 mutation an automatic optimization tool has been used. The mathematical cellular model that has been used is the one developed by Grandi et al. (2010) with the modifications introduced by Moreno et al. (2013), this model includes a Markov formulation for the RyR2 channel. For the CASQ2(-/-) mutation we have adapted an existing model developed by Yang et al. (2015) and include it in the mathematical model used in this study. For the population analysis we have modified the main membrane currents in a range of $\pm 100\%$ of its nominal value according to a uniform distribution. To evaluate the importance of the modified currents in the population a correlation analysis has been carried out between these currents and the studied biomarkers.

The model of the RyR2^{R4497C} mutation reproduces the biomarkers observed for the mutation, that is, a maximum intracellular calcium peak of 4.63 and 5.53 mM at 2Hz with and without beta stimulation respectively and 3.70 and 4.37 mM at 3Hz with and without beta stimulation. An intracellular calcium time to peak of 22.70 and 25.70 ms at 2Hz with and without beta stimulation and 29.90 and 31.60 ms at 3Hz with and without stimulation. The adaptation of the CASQ2(-/-) mutation reproduces the electrophysiological alterations observed experimentally, that is the appearance of ectopic electrical activity between pulses of the simulations and spontaneous activity once the stimulation ceases. In the population study 628 models have been obtained, these models have been validated using experimental physiological data. Introducing the RyR2^{R4497C} mutation in the population causes 102 and 76 models to have spontaneous activity at 2 and 3Hz respectively, in all cases with the use of beta stimulation. In the case of the CASQ2(-/-) mutation the amount of models increases to 42 models at 2Hz without beta stimulation, 513 at 2Hz with beta stimulation, 199 at 3Hz without beta stimulation and 456 at 3Hz with beta stimulation. The sodium-potassium pump and the fast component of the delayed potassium current are the variables which show higher values of correlation.

In conclusion, the RyR2^{R4497C} and CASQ2(-/-) mutations responsible of the appearance of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia have been modelled. Experimentally observed effects have been reproduced for both mutations. Populations study shows that the sodium-potassium pump and the fast component of the delayed potassium current are the more relevant for the alterations of biomarkers.

Key words: Genetic mutations, computational models, RyR2^{R4497C}, calsequestrin, population of models.

RESUM

Hui dia, una de les causes més importants de morbiditat i mortalitat en països desenvolupats són les arrítmies cardíques. Per aquest motiu la seua prevenció i tractament són un dels principals desafiaments dels sistemes de salut. Les mutacions genètiques, l'estudi de les quals s'ha estés en els últims anys, tenen gran importància en la producció d'aquestes arrítmies.

L'objectiu d'aquest treball final de màster és modelitzar la mutació RyR2^{R4497C} del canal d'alliberament de calci del reticle sarcoplasmàtic (RyR2) i la mutació del tipus CASQ2(-/-) de la proteïna calsequestrina. Per a la modelització de la mutació del RyR2 s'ha utilitzat una eina d'ajust automàtic de paràmetres. El model matemàtic cel·lular empleat ha sigut el de cardiomiocito ventricular desenvolupat per Grandi i col·laboradors (2010) amb les modificacions introduïdes per Moreno i col·laboradors (2013), que incorpora un model de Markov del canal RyR. Per a la mutació CASQ2(-/-) ens hem basat en el model desenvolupat per Yang i col·laboradors (2015) i l'hem adaptat per a incloure-la en el model matemàtic utilitzat en aquest estudi. Per a l'estudi poblacional s'han modificat els principals corrents de membrana en un rang de $\pm 100\%$ del seu valor en control seguint una distribució uniforme. Per a avaluar la importància dels corrents modificats en la població s'ha realitzat una correlació entre aquests corrents i els biomarcadores estudiats.

El model de la mutació RyR2^{R4497C} reproduïx els biomarcadors per a la mutació, és a dir, un pic màxim de calci intracel·lular de 4.63 i 5.53 mM a 2Hz amb i sense beta estimulació respectivament i 3.70 i 4.37 mM a 3Hz amb i sense beta estimulació. Un temps de pic del calci intracel·lular de 22.70 i 25.70 ms a 2Hz amb i sense beta estimulació i 29.90 i 31.60 ms a 3Hz amb i sense beta estimulació. L'adaptació la mutació CASQ2(-/-) reproduïx les alteracions electrofisiològiques observades, això és l'aparició d'activitat elèctrica ectòpica entre els polsos de la simulació i d'activitat espontània en finalitzar l'estimulació. En l'estudi poblacional s'han obtingut 628 models vàlids la duració dels quals del potencial d'acció en control es troba dins dels rangs fisiològics experimentals. En introduir la mutació RyR2^{R4497C} en la població es produeix activitat elèctrica espontània en 102 i 76 models a 2 i 3Hz respectivament, en tots dos casos amb beta estimulació. En el cas de la mutació de la calsequestrina aquesta quantitat ascendeix a 42 models a 2Hz sense beta estimulació, 513 a 2Hz amb estimulació, 199 a 3Hz sense beta estimulació i 456 a 3Hz amb estimulació. La bomba de sodi-potassi i la component ràpida del corrent diferit de potassi són les variables que presenten valors majors de correlació i per tant les que més afecten els biomarcadors.

En conclusió, s'han modelitzat i simulat les mutacions RyR2^{R4497C} i CASQ2(-/-) causants de la taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica. Es reproduïxen els efectes observats experimentalment per a totes dues mutacions. L'estudi poblacional realitzat sobre el model en control i els models de les dues mutacions mostren que la bomba de sodi-potassi i la component ràpida del corrent diferit de potassi són les més rellevants a l'hora de modificar els biomarcadors estudiats.

Paraules clau: Mutacions cardíques, models computacionals, RyR2^{R4497C}, calsequestrina, població de models

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	16
3.7	MODELADO BIOELÉCTRICO	17
3.8	MODELOS DE MARKOV	20
3.9	POBLACIÓN DE MODELOS	22
3.10	ALGORITMO NELDER-MEAD	22
4	MATERIAL Y MÉTODOS	25
4.1	MODELO	25
4.2	AJUSTE DE LAS MUTACIONES	26
4.2.1	RyR2 ^{R4497C}	27
4.2.2	CALSEQUESTRINA:	31
4.3	ANÁLISIS DE POBLACIÓN	32
5	RESULTADOS	35
5.1	AJUSTE MUTACIÓN RyR2 ^{R4497C}	35
5.2	AJUSTE MUTACIÓN CASQ2(-/-)	41
5.3	POBLACIÓN DE MODELOS	42
5.4	CORRELACIÓN Y REGRESIÓN LOGÍSTICA	46
6	CONCLUSIONES	53
7	LÍNEAS FUTURAS	55
8	PUBLICACIONES	57
9	BIBLIOGRAFÍA	59

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1	INTRODUCCIÓN.....	65
2	PRESUPUESTO DETALLADO.....	65
2.1	COSTE DE MANO DE OBRA.....	65
2.2	COSTE DE HARDWARE.....	66
2.3	COSTE DE SOFTWARE.....	66
3	PRESUPUESTO FINAL.....	67

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
<i>Figura 5: Sistema de conducción cardíaco. Tomado de Costanzo (2011).</i>	<i>9</i>
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-Orsorio (2016).12	
Figura 9: Representación del potencial de acción ventricular y las principales corrientes que lo conforman. Tomado de Itaca.	13
Figura 10: Circuito equivalente de una célula. Tomado de Ferrero y de Loma-Orsorio (2016)...	18
Figura 11: Modelo celular de cardiomiocito ventricular. Tomado de Soltis et al. (2010).....	19
Figura 12: Modelo de Markov de un canal iónico con cuatro estados. Tomado de Rudy & Silva (2006).	21
Figura 13: Modelo de Markov del canal RyR2 utilizado en el modelo. Tomado de Stern et al. (1999).	22
Figura 14: Transitorio de calcio normalizado y ajuste de la exponencial realizado para una simulación ejemplo.	28
Figura 15: Transitorio de calcio intracelular. Las líneas negras indican los puntos entre los que se mide el tiempo de pico.	28
Figura 16: Resultados experimentales. En azul el control y en rojo la mutación Las líneas continuas indican que no se aplicó beta estimulación mientras que las discontinuas que sí se hizo. A: Pico de calcio intracelular. B: Tiempo de pico del calcio intracelular. C: Constante de recuperación del calcio intracelular	29
Figura 17: Protocolo de estimulación seguido para la mutación del RyR.	30
Figura 18: Arriba: potencial de membrana de la simulación, se puede observar una despolarización completa una vez se ha dejado de estimular. Abajo: Transitorio de calcio, se puede observar cómo se produce una liberación de calcio que provoca el potencial.	31
Figura 19: Simulación del potencial de membrana en presencia de la mutación de la calsequestrina a 1Hz y con beta estimulación. Las flechas negras representan potenciales de acción estimulados mientras que las rojas son potenciales de acción espontáneos. Tomada de Yang et al. (2015).....	32
Figura 20: Protocolo de estimulación seguido en el ajuste de la mutación de la calsequestrina.	32
Figura 21: Ejemplo de potencial de acción, las barras verticales negras muestran los puntos entre los que se calcula la duración del potencial al 90% de repolarización.....	34

Figura 22: Comparación de los biomarcadores obtenidos en control. En gris los experimentales y en negro los del modelo. Las líneas continuas indican que no se aplicó beta estimulación mientras que las discontinuas que sí se hizo. A: Pico de calcio intracelular. B: Tiempo de pico del calcio intracelular. C: Constante de recuperación del calcio intracelular	37
Figura 23: Comparación de los biomarcadores obtenidos con la mutación. En gris los experimentales y en negro los del modelo. Las líneas continuas indican que no se aplicó beta estimulación mientras que las discontinuas que sí se hizo. A: Pico de calcio intracelular. B: Tiempo de pico del calcio intracelular. C: Constante de recuperación del calcio intracelular ...	38
Figura 24: Resultados simulados. En azul el control y en rojo la mutación Las líneas continuas indican que no se aplicó beta estimulación mientras que las discontinuas que sí se hizo. A: Pico de calcio intracelular. B: Tiempo de pico del calcio intracelular.....	40
Figura 25: Evolución del potencial de membrana (arriba) y del calcio intracelular (abajo) en estado estacionario a 1Hz y durante el periodo posterior sin estimulación al anular la concentración de calsequestrina. Los puntos negros señalan los potenciales de acción resultantes de estimulación eléctrica.	41
Figura 26: Evolución del potencial de membrana (arriba) y del calcio intracelular (abajo) en estado estacionario a 1Hz y durante el periodo posterior sin estimulación al reducir a la mitad la concentración inicial de la calsequestrina y su derivada. Los puntos negros señalan los pulsos estimulados.....	42
Figura 27: Últimos potenciales de membrana para la población de modelos en control.	43
Figura 28: Histogramas del APD ₉₀ para la población en control en cada una de las condiciones estudiadas con los 628 modelos. Las líneas rojas señalan los límites del rango fisiológico, la verde la media experimental y la morada la media de las simulaciones.....	43
Figura 29: Histogramas del APD ₉₀ para la población con la mutación del RyR2 ^{R4497C} en cada una de las condiciones estudiadas con los 628 modelos. Las líneas rojas señalan los límites del rango fisiológico, la verde la media experimental y la morada la media de las simulaciones. ..	44
Figura 30: Número de modelos de la población con la mutación RyR2 ^{R4497C} que presentan o no actividad eléctrica espontánea (AEE) en cada una de las condiciones	45
Figura 31: Histogramas del APD ₉₀ para la población con la mutación de la calsequestrina en cada una de las condiciones estudiadas con los 628 modelos. Las líneas rojas señalan los límites del rango fisiológico, la verde la media experimental y la morada la media de las simulaciones.....	45
Figura 32: Número de modelos de la población con la mutación CASQ2(-/-) que presentan o no actividad eléctrica espontánea (AEE) en cada una de las condiciones	46
Figura 33: Matrices de correlación normalizada en control a 2Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).	47
Figura 34: Matriz de correlación normalizada en control a 3Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).....	48
Figura 35: Matriz de correlación normalizada con la mutación RyR2 ^{R4497C} a 2Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).....	49
Figura 36: Matriz de correlación normalizada con la mutación RyR2 ^{R4497C} a 3Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).....	49
Figura 37: Matriz de coeficientes de la regresión logística para la mutación RyR2 ^{R4497C}	50
Figura 38: Matriz de correlación normalizada con la mutación CASQ2(-/-) a 2Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).....	51

Figura 39: Matriz de correlación normalizada con la mutación CASQ2(-/-) a 3Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).....	51
Figura 40: Matriz de coeficientes de la regresión logística para la mutación CASQ2(-/-).....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Porcentajes experimentales de variación de las células con mutación con respecto a las células control.....	35
Tabla 2: Biomarcadores simulados en control.....	35
<i>Tabla 3: Desglose de los costes de mano de obra del trabajo.</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 4: Desglose de los costes de hardware del trabajo.</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 5: Desglose de los costes de software del trabajo.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 6: Coste total del trabajo.....</i>	<i>67</i>

MEMORIA

1. MOTIVACIÓN

Los avances tecnológicos de los últimos años han permitido obtener un mayor conocimiento de los genes y sus alteraciones. En particular, las mutaciones genéticas cardíacas pueden llevar asociadas problemas relacionados con la aparición de arritmias potencialmente mortales. Estas arritmias son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados, por lo que su prevención y tratamiento son un desafío para los sistemas de salud.

Los modelos matemáticos computacionales han demostrado ser una herramienta muy útil para estudiar los efectos de las diferentes mutaciones sobre la electrofisiología celular. Sobre un modelo se pueden realizar las modificaciones necesarias para intentar reproducir los efectos de una mutación. Esto resulta mucho más sencillo que recurrir a técnicas experimentales para lograr el mismo objetivo.

En este trabajo final de máster se han modelizado dos mutaciones de la dinámica del calcio relacionadas con la aparición de la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica. Por un lado, la mutación RyR2^{R4497C} del canal de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático, para la cual se ha utilizado una herramienta de ajuste automático y, por otro, la mutación del tipo CASQ2(-/-) de la proteína tampón calsequestrina, para la cual se ha adaptado un modelo ya existente. Finalmente, se ha realizado un estudio poblacional introduciendo las dos mutaciones en una población de modelos, generado a partir de un modelo de miocito ventricular de humano promedio en el que se han modificado las conductancias de las principales corrientes de membrana. La utilización de una población de modelos permite contemplar los efectos de la variabilidad natural existente en los seres vivos, y su efecto sobre las diferentes mutaciones.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es modelizar las mutaciones RyR2^{R4497C} y CASQ2(-/-) responsables de la aparición de la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica, y observar sus efectos en una población de modelos.

Para ello, se utilizarán los datos experimentales disponibles para la mutación RyR2^{R4497C} en la literatura científica, haciendo uso de una herramienta de ajuste automático de parámetros, y un modelo existente de la mutación CASQ2(-/-) que se adaptará al modelo de miocito ventricular de humano utilizado en este estudio.

Los objetivos secundarios necesarios para desarrollar el trabajo son:

1. Modelizar la mutación RyR2^{R4497C} del canal RyR usando un modelo de miocito ventricular de humano.
2. Adaptar el modelo existente de la mutación del tipo CASQ2(-/-) de la calsequestrina a un modelo de miocito ventricular de humano.
3. Generar una población de modelos de cardiomiocitos ventriculares que reproduzca la variabilidad natural presente en los seres humanos.
4. Estudiar el efecto de la mutación RyR2^{R4497C} del canal RyR y de la mutación del tipo CASQ2(-/-) de la calsequestrina en la generación de actividad eléctrica espontánea utilizando una población de modelos de cardiomiocitos ventriculares humanos.
5. Estudiar los efectos de las principales corrientes de la membrana celular sobre los biomarcadores celulares relacionados con las mutaciones consideradas en este estudio.

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.

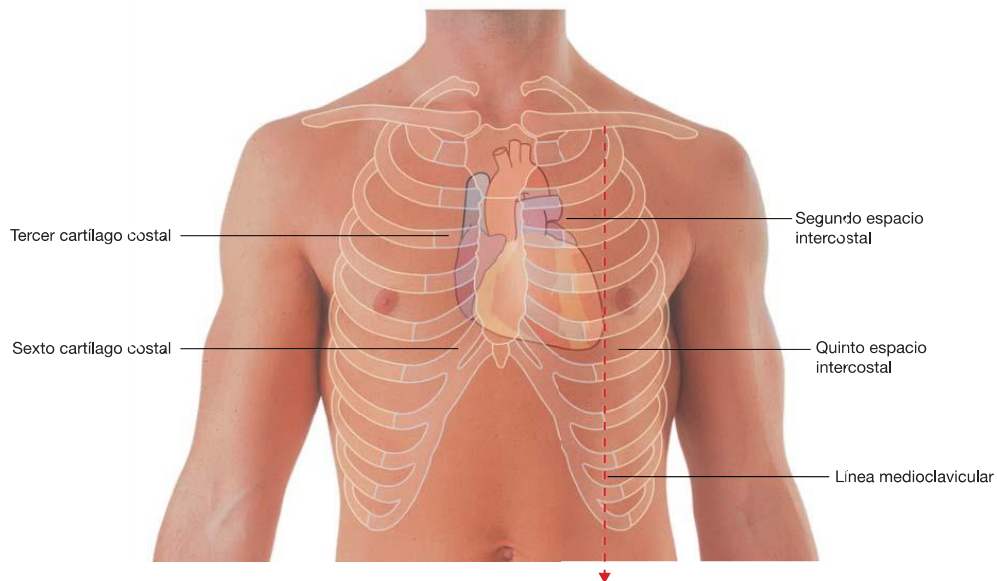


Figura 1: Localización del corazón en la caja torácica. Tomada de Drake et al. (2010).

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.

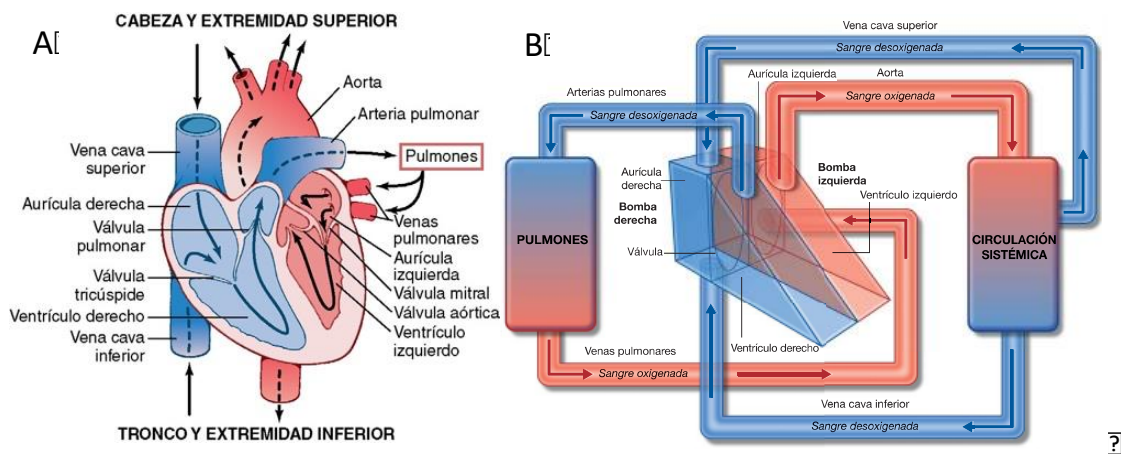


Figura 2: A. Estructura interna del corazón con las cavidades, vasos y válvulas. B. Representación esquemática de los circuitos circulatorios. Tomado de Drake et al. (2010).

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).

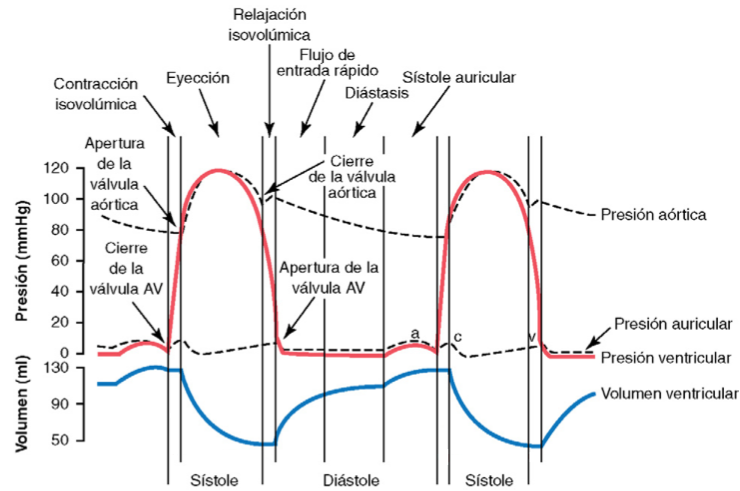


Figura 3: Representación de los cambios de presión y volumen que tienen lugar en las diferentes estructuras cardiacas durante el ciclo cardíaco. Modificado de Hall & Guyton (2011).

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).

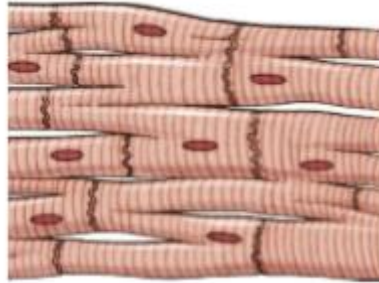


Figura 4: Esquema de la interconexión de los cardiomiocitos. Tomado de Hall & Guyton (2011).

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 de la aurícula derecha a la izquierda a través de la rama de Bachman, 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.

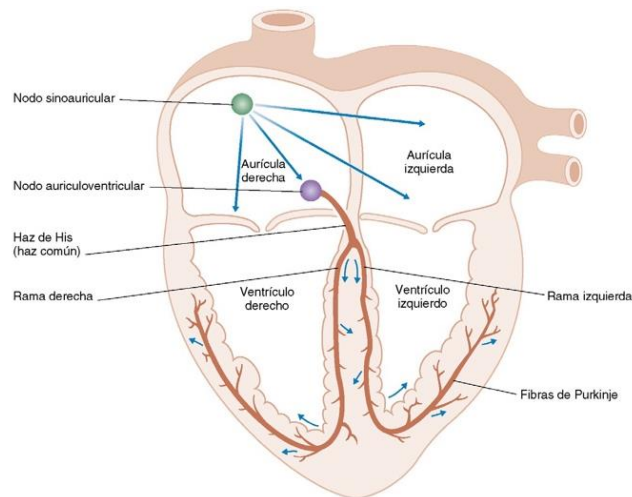


Figura 5: Sistema de conducción cardíaco. Tomado de Costanzo (2011).

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).

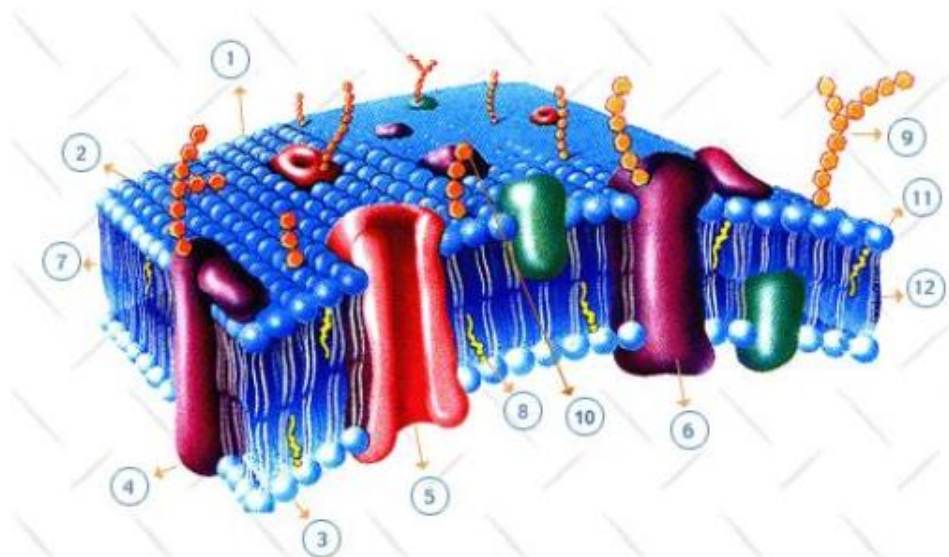


Figura 6: Estructura de la membrana celular, bicapa lipídica, proteínas integradas y canales. Tomado de Raisman & González (2013).

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.

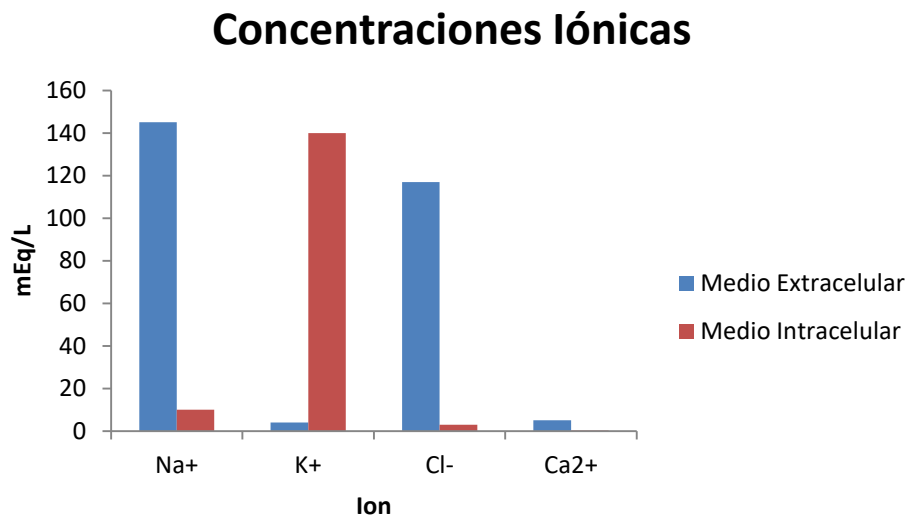


Figura 7: Concentraciones de los iones más abundantes en los medios intra y extracelulares.

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⁺.

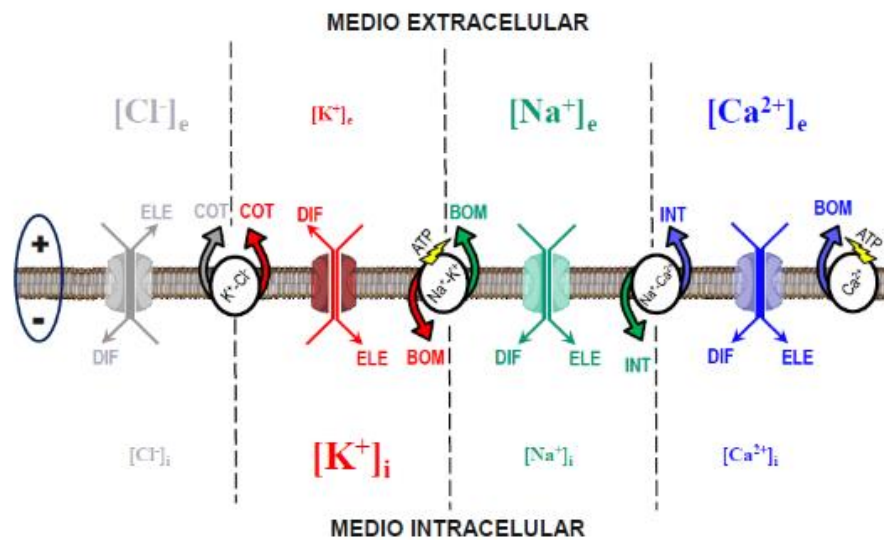


Figura 8: Esquema del movimiento de los principales iones entre el medio intra y extracelular cuando el potencial de membrana es negativo. Tomado de Ferrero y de Loma-Osorio (2016).

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.

El potencial de acción es la medida de la diferencia de potencial entre el medio intracelular y el extracelular. 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 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.

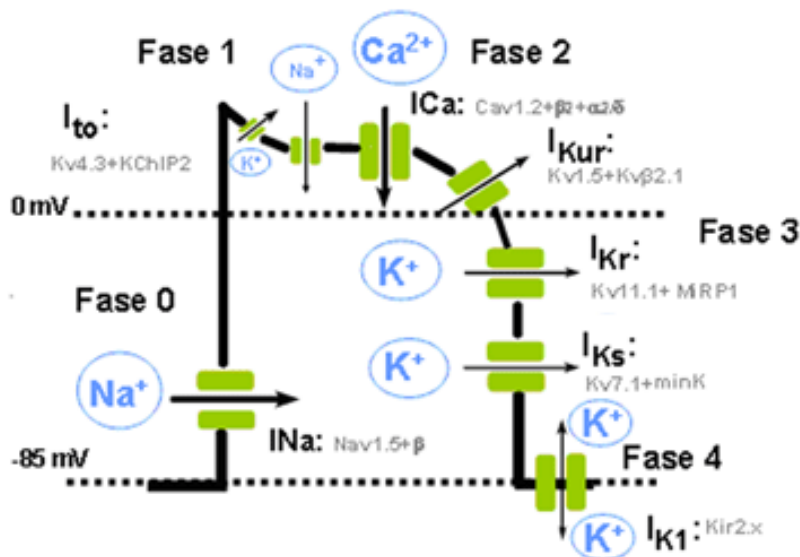


Figura 9: Representación del potencial de acción ventricular y las principales corrientes que lo conforman. Tomado de Itaca.

Como se observa en la figura anterior podemos distinguir varias fases en el potencial de acción del nodo. A continuación, se detallarán estas fases:

- Fase 0: En esta fase ocurre la despolarización. Se produce una rápida inversión del potencial de membrana, que pasa a ser positivo. La principal corriente que interviene en esta fase es la corriente de sodio (I_{Na}). Cuando, ante la llegada de una corriente de excitación, el potencial de membrana se eleva hasta alcanzar un determinado umbral los canales sodio se abren bruscamente y se produce la entrada de iones Na^+ . Aunque la corriente de sodio es la más importante, hacia el final de esta fase se activa también la corriente entrante de calcio tipo L (I_{CaL}).
- Fase 1: Repolarización temprana. Se activa la corriente saliente de potasio (I_{to}) que provoca una pequeña repolarización de la membrana.

- Fase 2: Meseta. El potencial se mantiene prácticamente constante. Este equilibrio se debe a tres corrientes: en primer lugar, continúa la corriente de calcio tipo L que comenzó en la fase 0. En segundo lugar, están activas dos corrientes salientes de potasio, una rápida (I_{kr}) y otra lenta (I_{ks}). Estas corrientes se compensan dando lugar a la constancia del potencial de membrana, que continúa siendo positivo.
- Fase 3: Repolarización. El potencial de membrana recupera su valor de reposo negativo. La corriente de calcio tipo L se inactiva mientras que la de potasio continúa, por lo que se rompe el equilibrio anteriormente mencionado. Al final de esta etapa se activa otra corriente de potasio (I_{kl}).
- Fase 4: Reposo. El potencial de membrana permanece constante en un valor de reposo diastólico. Este valor es similar al de equilibrio del potasio, ya que son estos canales los que permanecen abiertos a valores negativos del potencial de membrana.

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).

A continuación se presentan las principales arritmias:

Arritmias supraventriculares:

- Bradicardia sinusal: El ritmo del nodo sinusal estimula a una frecuencia inferior a 60 latidos por minuto.
- Taquicardia sinusal: El ritmo del nodo sinusal es superior a 100 latidos por minuto.
- Paro sinusal: El nodo sinusal deja de estimular.
- Flutter auricular: Ritmo rápido y uniforme de las aurículas, se genera por la recirculación de un impulso eléctrico.
- Fibrilación auricular: Ritmo rápido e irregular producido por una actividad eléctrica caótica.

Arritmias ventriculares:

- Taquicardia ventricular: Ritmo rápido generado en los propios ventrículos.
- Flutter ventricular: Taquicardia ventricular muy rápida, si no se detiene puede desencadenar una fibrilación ventricular.
- Fibrilación ventricular: Se trata de la arritmia más grave, capaz de causar la muerte en minutos. Se produce un ritmo caótico en los ventrículos sin latido efectivo.
- Extrasístoles: Latido prematuro que se genera en los ventrículos y se adelanta al estímulo que viene desde las aurículas.

Trastornos de la conducción:

- Bloqueos aurículo-ventriculares: Dificultad en la transmisión del impulso desde el nodo aurículo-ventricular al haz de His. Se clasifican en tres grados:
 - Primer grado: Todos los estímulos son transmitidos, aunque lo hacen con retraso.
 - Segundo grado: Algunos estímulos son bloqueados mientras que otros consiguen pasar con o sin retraso.
 - Tercer grado: Todos los estímulos son bloqueados.
- Bloqueos de rama: Se produce un bloqueo de una de las ramas del haz de His, de forma que la contracción de los ventrículos no es sincrona.

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.

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 las mutaciones causantes de la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT), una arritmia genética susceptible de causar muerte súbita bajo condiciones de estrés. Estas mutaciones se clasifican en dos grandes grupos (Yang et al. 2015):

- **Mutaciones de la calsequestrina:** La calsequestrina (CASQ) es una proteína presente en el retículo sarcoplasmático de las células. Su función es actuar como tampón de calcio, reteniendo los iones dentro del retículo, cada molécula es capaz de unir entre 18 y 50 iones. Dado que la concentración de iones de calcio en el retículo es muy superior a la del citosol estos tenderían a salir del retículo si no estuvieran ligados a la proteína. La contracción muscular se produce cuando los iones se separan de la proteína y salen al citosol en los episodios de liberación de calcio inducida por calcio. Existen dos tipos de calsequestrina, la 1 (CASQ1) presente en los músculos esqueléticos rápidos y la 2 (CASQ2) presente en las células cardiacas y músculos esqueléticos lentos. (Wang et al. 1998)

Las mutaciones que se producen en el gen que codifica la calsequestrina causan un malfuncionamiento de la misma, impidiendo que los iones se unan a la proteína. Esto

provoca salidas espontáneas de calcio al citosol, lo que puede desencadenar actividad eléctrica en la célula y generar episodios arrítmicos. En este estudio se considera una mutación del tipo CASQ2(-/-) caracterizada por la ausencia de función de la proteína.

- Mutaciones del receptor de rianodina: El receptor de rianodina (RyR2) es una proteína que conforma el canal de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático. El calcio que entra en la célula a través de los canales tipo L se une a este receptor provocando la salida de calcio al citosol desde el retículo (Bround et al. 2013). Las mutaciones en el gen RyR2 que codifica esta proteína causan un malfuncionamiento del mismo con diferentes consecuencias. El efecto más común es un aumento de la sensibilidad del canal al calcio citosólico, lo que provoca liberaciones espontáneas de calcio que pueden desencadenar episodios arrítmicos. Aunque se han descubierto más de 70 mutaciones de este gen, este estudio se centra en la primera mutación que se identificó, la mutación RyR2^{R4497C}.

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.

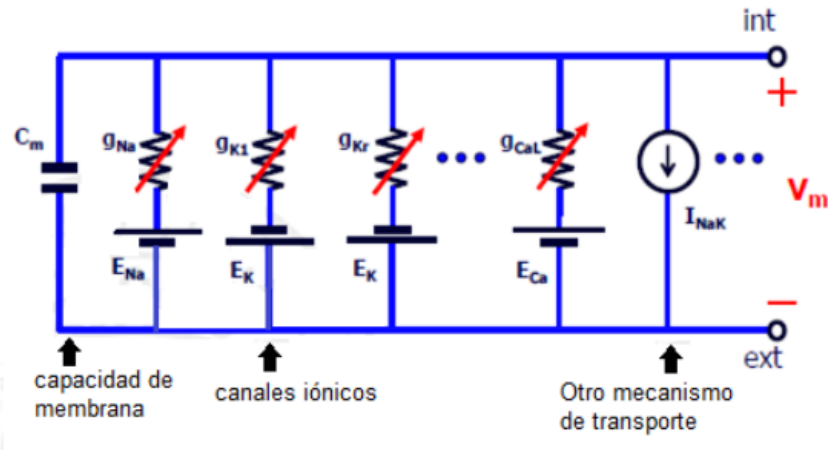


Figura 10: Circuito equivalente de una célula. Tomado de Ferrero y de Loma-Osorio (2016).

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-Osorio, 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 Soltis (2010):

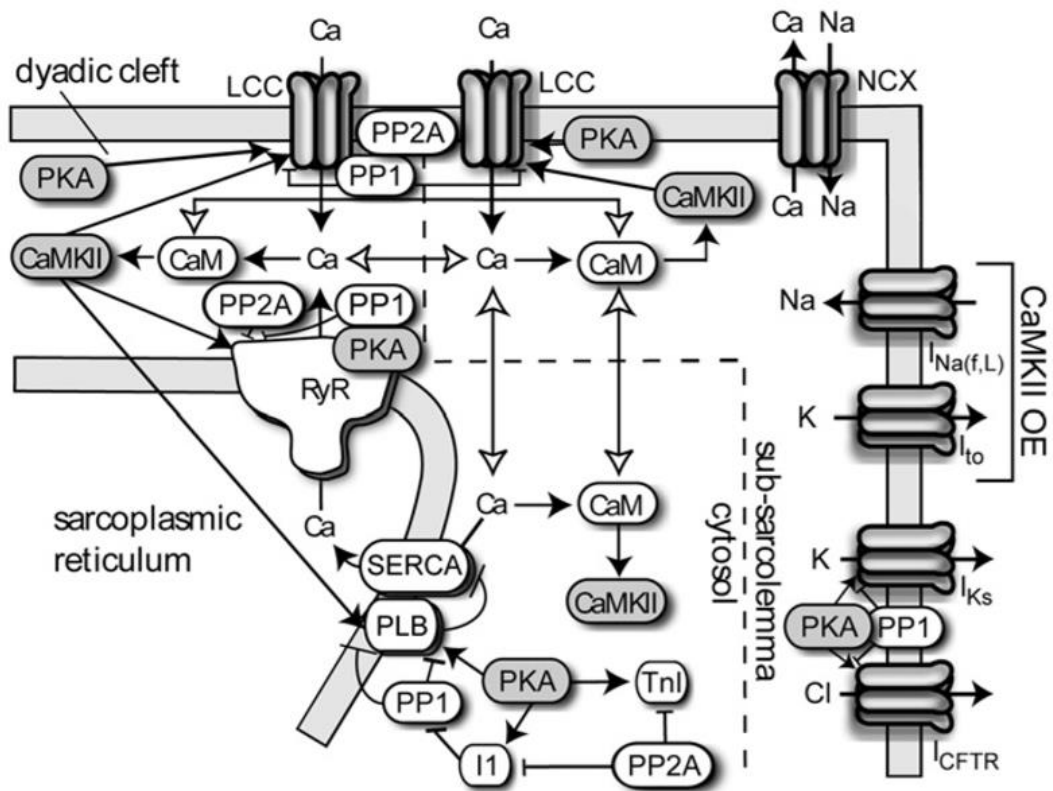


Figura 11: Modelo celular de cardiomiocito ventricular. Tomado de Soltis et al. (2010)

El modelo formula con detalle las principales corrientes iónicas celulares, así como la dinámica de calcio, incorporando ecuaciones para el canal de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y la calsequestrina. Es por esto que ha sido seleccionado para realizar este trabajo.

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

- Espacio intracelular: dividido en citosol (Cytosol), espacio sub-sarcolémico (sub-Sarcolemma) y el espacio diádico (Dyadic cleft), siendo este último al cual se libera el calcio del retículo sarcoplasmático. Existen ecuaciones de difusión que comunican los tres compartimentos.
- Retículo sarcoplasmático: Un único compartimento en contacto con los espacios antes descrito, el calcio sale a través del RyR al espacio diádico y se introduce en el retículo desde el citosol a través de la bomba SERCA.

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.

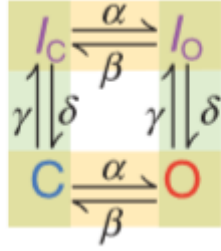


Figura 12: Modelo de Markov de un canal iónico con cuatro estados. Tomado de Rudy & Silva (2006).

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 RyR2^{R4497C} 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.

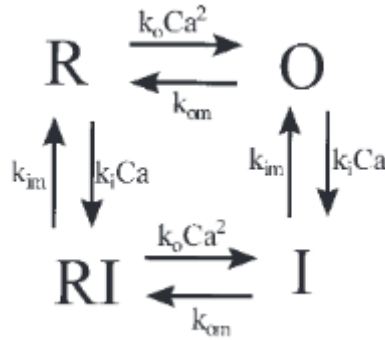


Figura 13: Modelo de Markov del canal RyR2 utilizado en el modelo. Tomado de Stern et al. (1999).

3.9 POBLACIÓN DE MODELOS

La variabilidad biológica existe a todos los niveles en los seres vivos. En particular, centrándonos en los potenciales de acción humanos, no todos presentan morfologías idénticas, aunque sean fisiológicamente funcionales. Esta variabilidad se puede deber a numerosas causas como los ritmos circadianos, exposición a hormonas, fármacos o enfermedades. Estos factores modifican la expresión del ARN mensajero, que codifica las proteínas que conforman los canales iónicos responsables de la morfología del potencial de acción (Britton et al 2013, 2017).

Cuando se realizan experimentos, los resultados se suelen promediar, esto reduce el error experimental, pero elimina la variabilidad natural que existe. Tener en cuenta esta variabilidad biológica es interesante para entender los efectos que diferentes tratamientos y terapias tendrán sobre una población de individuos.

En este estudio se ha construido un modelo poblacional para cada las mutaciones estudiadas. Con esto se busca analizar cómo las diferencias en las corrientes iónicas afectan a dichas mutaciones. Esto puede resultar útil para estudios posteriores donde se busque terapia farmacológica para aplicar a pacientes que padecen dichas alteraciones genéticas.

3.10 ALGORITMO NELDER-MEAD

Para realizar el ajuste de la mutación del receptor de rianodina se ha empleado un algoritmo de ajuste de parámetros para reproducir los datos experimentales de la mutación. El algoritmo utilizado es el simplex de Nelder-Mead (Nelder & Mead 1965).

El algoritmo desarrollado por John Nelder y Roger Mead pretende minimizar una función escalar no lineal utilizando únicamente valores de la función, no de la derivada. En cada iteración se selecciona un simplex de $n+1$ puntos que forman los vértices y valores de la función asociados, donde n es la dimensión del espacio.

Es un método iterativo donde inicialmente se eligen $n+1$ puntos que forman el simplex inicial. A partir de ahí, se evalúa una función objetivo y se seleccionan otros puntos que

optimicen mejor el objetivo, conformando un nuevo simplex mejor que el anterior. Esto continúa hasta que se consigue el resultado que mejor ajusta la función.

Para el correcto funcionamiento del algoritmo se deben definir cuatro parámetros:

- Coeficiente de expansión: χ
- Coeficiente de reflexión: ρ
- Coeficiente de contracción: γ
- Coeficiente de reducción: σ

Estos valores deben satisfacer las siguientes condiciones:

$$\rho > 0; \chi > 1; 0 < \gamma < 1; 0 < \sigma < 1 \quad (\text{Ec. 7})$$

Los valores más utilizados en la práctica son:

$$\rho = 1; \chi = 2; \gamma = \frac{1}{2}; \sigma = \frac{1}{2} \quad (\text{Ec. 8})$$

El algoritmo comienza en la iteración K con un simplex inicial llamado Δ_k formado por $n+1$ vértices que son puntos de \mathbb{R}^n . Al principio se ordenan esos vértices de la siguiente manera:

$$x_1, x_2, \dots, x_{n+1} \quad (\text{Ec. 9})$$

De forma que se cumple:

$$f_1 \leq f_2 \leq \dots \leq f_{n+1} \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde f representa el valor de la función objetivo para cada vértice x . Dado que buscamos minimizar la función, el punto x_1 será el mejor punto y x_{n+1} el peor. Cada iteración generará un nuevo simplex diferente al anterior que deberá ser evaluado. Existen diferentes casos en la evaluación:

- Reflexión: Se calcula el punto de reflexión como:

$$x_r = \bar{x} + \rho \cdot (\bar{x} - x_{n+1}) = (1 + \rho) \cdot \bar{x} - \rho \cdot x_{n+1} \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde \bar{x} es el centroide de los n mejores puntos de la iteración actual.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{Ec. 12})$$

A continuación se evalúa $f_r = f(x_r)$, si resulta que $f_1 \leq f_r \leq f_n$ se acepta el punto reflejado y se termina la iteración. Si por el contrario no sucede esto existen dos caminos a seguir.

- Expansión: Cuando tras la reflexión se da que $f_r < f_1$ se calcula el punto de expansión con el objetivo de mejorar el punto:

$$x_e = \bar{x} + \chi \cdot (x_r - \bar{x}) = \bar{x} + \rho \cdot \chi \cdot (\bar{x} - x_{n+1}) = (1 + \rho \cdot \chi) \cdot \bar{x} - \rho \cdot \chi \cdot x_{n+1} \quad (\text{Ec. 13})$$

Se evalúa ahora $f_e = f(x_e)$ y si se da que $f_e < f_r$ se acepta el punto de expansión. Si se da el caso contrario se acepta el punto de reflexión anterior. En cualquier caso, se termina la iteración.

- Contracción: Si tras la reflexión se obtiene que $f_r > f_n$ se realiza una contracción entre el centroide y el mejor punto entre x_r y x_{n+1} . Esta contracción puede ser hacia dentro o hacia fuera.

- Hacia fuera: Ocurre cuando $f_n \leq f_r < f_{n+1}$

$$x_c = \bar{x} + \gamma \cdot (x_r - \bar{x}) = \bar{x} + \rho \cdot \gamma \cdot (\bar{x} - x_{n+1}) = (1 + \rho \cdot \gamma) \cdot \bar{x} - \rho \cdot \gamma \cdot x_{n+1} \quad (\text{Ec. 14})$$

Si en la evaluación $f_c < f_r$ se acepta la contracción y se termina la iteración. Si no se pasa al paso de reducción.

- Hacia dentro: Ocurre cuando $f_r \geq f_{n+1}$

$$x_{cc} = \bar{x} - \gamma \cdot (\bar{x} - x_{n+1}) = (1 - \gamma) \cdot \bar{x} + \gamma \cdot x_{n+1} \quad (\text{Ec. 15})$$

Si en la evaluación $f_{cc} < f_{n+1}$ se acepta la contracción y se termina la iteración. Si no se pasa al paso de reducción.

- Reducción: Se evalúa la función en los puntos:

$$y_i = x_1 + \sigma \cdot (x_i - x_1) \quad \text{con } i = 2, \dots, n + 1 \quad (\text{Ec. 16})$$

Los vértices de la próxima iteración serán x_i, y_2, \dots, y_{n+1}

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MODELO

Para este trabajo se ha seleccionado el modelo de cardiomiocito ventricular humano desarrollado por Grandi y colaboradores (Grandi et al. 2010) con las modificaciones realizadas por Moreno y colaboradores (Moreno et al. 2013). Este modelo se basa en el de ventrículo de conejo elaborado por Soltis y colaboradores (Soltis et al. 2010), adaptando las conductancias de las corrientes iónicas y ciertos parámetros para reflejar la fisiología humana. La modificación introducida por Moreno consiste en un modelo de Markov para las corrientes de calcio. El modelo se ha programado en C++ y se ha utilizado el entorno de desarrollo Eclipse Neon (The Eclipse Foundation). En la figura 11 aparece un esquema del modelo

Como se ha mencionado en la introducción, el modelo presenta cuatro compartimentos intracelulares. Tres citosólicos (espacio diádico, subsarcolemma y citosol) comunicados entre sí por ecuaciones de difusión. Finalmente, hay un cuarto espacio que representa el retículo sarcoplasmático y que se comunica con los anteriores mediante dos corrientes, la de salida de calcio a través del canal de liberación RyR (J_{rel}) y la entrante de calcio a través de la bomba SERCA (J_{SERCA})

El modelo contempla las principales corrientes de membrana presentes en la célula y que serán de interés para realizar el análisis poblacional para el estudio de las mutaciones. A continuación se van a presentar los detalles de la formulación del canal RyR y la calsequestrina, ya que son los dos componentes afectados por las mutaciones de interés.

- **RyR2:**

El modelo presenta un modelo de Markov para el canal RyR2, en la figura 13 está representado el modelo. Como se puede observar, el modelo presenta cuatro estados. El estado abierto (O), el cerrado (R) y sus correspondientes estados inactivados (I y RI respectivamente). A su vez presenta cuatro velocidades de transición entre estados, siendo éstas simétricas con respecto al cambio que se produce, es decir, la velocidad para pasar a estado abierto (K_0Ca) es igual esté el canal activo o inactivo.

Las ecuaciones que representan este modelo de Markov son las siguientes:

$$\dot{R} = (K_{im} \cdot RI - K_iCa \cdot Ca_i \cdot R) - (K_0Ca \cdot Ca_i \cdot R - K_{om} \cdot O) \quad (\text{Ec. 17})$$

$$\dot{O} = (K_0Ca \cdot Ca_i \cdot R - K_{om} \cdot O) - (K_iCa \cdot Ca_i \cdot O - K_{im} \cdot I) \quad (\text{Ec. 18})$$

$$\dot{I} = (K_iCa \cdot Ca_i \cdot O - K_{im} \cdot I) - (K_{om} \cdot I - K_0Ca \cdot Ca_i \cdot RI) \quad (\text{Ec. 19})$$

$$RI = 1 - R - O - I \quad (\text{Ec. 20})$$

$$J_{rel} = K \cdot O \cdot (Ca_{SR} - Ca_i) \quad (\text{Ec. 21})$$

Donde Ca_i representa el calcio del compartimento al que se libera el calcio del retículo sarcoplasmático, que en nuestro modelo se corresponde con el espacio diádico y Ca_{SR} representa el calcio dentro del retículo.

- **Calsequestrina:**

Al tratarse la calsequestrina de una proteína que actúa como tampón, en el modelo aparece formulado mediante una concentración y una ecuación que refleja la derivada temporal de la misma. A continuación se presentan las ecuaciones presentes en el modelo:

$$[Csqn]_{inicial} = 2.7 \text{ mM} \quad (\text{Ec. 22})$$

$$\frac{dCsqn}{dt} = K_{on} \cdot Ca_i \cdot ([Csqn]_{inicial} - [Csqn]) - K_{off} \cdot [Csqn] \quad (\text{Ec. 23})$$

Donde $[Csqn]$ representa la concentración de calsequestrina en el momento y K_{on} y K_{off} son velocidades de transición dadas por el modelo.

4.2 AJUSTE DE LAS MUTACIONES

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) se caracteriza por causar episodios arrítmicos bajo condiciones de estrés o esfuerzo. Estos episodios pueden ser de elevada gravedad llegando a causar episodios de muerte súbita. Una característica de los pacientes que padecen esta patología es que en condiciones de reposo no presentan síntomas, teniendo un electrocardiograma completamente normal (Domingo et al. 2014).

Por el contrario, cuando el paciente se ve sometido a alguna situación de estrés aparecen despolarizaciones tardías (DADs por sus siglas en inglés, *Delayed After Depolarizations*), que pueden llegar a desencadenar actividad eléctrica y latidos fuera de ritmo que desencadenen la arritmia.

Esta situación de esfuerzo o estrés se puede reproducir en los modelos combinando dos factores. Por un lado, aumentando la frecuencia de estimulación, lo cual imita el comportamiento natural del corazón. Por otro lado, ante estas condiciones se produce lo que se denomina estimulación beta-adrenérgica. Esto consiste en una serie de reacciones químicas relacionadas con el sistema nervioso simpático (SNS), responsable del síndrome de lucha y huida. El SNS libera epinefrina que se une a los receptores beta-adrenérgicos preparando a las células para el esfuerzo o estrés. (El-Armouche et al. 2009)

En nuestro modelo podemos alterar la frecuencia de estimulación y está preparado para realizar las simulaciones bajo condiciones de estimulación beta-adrenérgica. Dado que en situaciones de reposo los pacientes no presentan alteraciones debidas a la mutación, para este estudio no se han realizado simulaciones con frecuencia de 1Hz (60 latidos por minuto).

De esta forma, se han considerado cuatro situaciones para el estudio a frecuencias de estimulación elevadas. Por un lado usando una frecuencia alta de 2Hz (120 latidos por minuto) sin beta estimulación y con beta estimulación. Por otro lado utilizando una frecuencia muy alta

de 3Hz (180 latidos por minuto) con y sin beta estimulación. En estas situaciones es posible reproducir efectos arrítmicos en las simulaciones.

A continuación se describen los métodos utilizados para mimetizar cada una de las mutaciones:

4.2.1 RyR2^{R4497C}:

Para el ajuste de la mutación RyR2^{R4497C} se han utilizado los datos experimentales registrados por Fernández-Velasco et al. (2009). En su estudio, observaron cómo a frecuencias muy altas se producían DADs y actividad eléctrica espontánea al dejar de estimular las células. Además comprobaron que la beta estimulación agravaba los efectos de la mutación a altas frecuencias. Observaron que estas situaciones arritmogénicas solo se producían en cardiomiocitos con la mutación. Por el contrario, las células control no presentaron actividad anómala a ninguna frecuencia ni bajo estimulación beta-adrenérgica. El estudio se realizó con cardiomiocitos transfectados de ratón sobre la mutación RyR2^{R4496C}, la equivalente a la RyR2^{R4497C} en ratones.

Además de la presencia de actividad eléctrica y DADs en el estudio registraron diferentes medidas sobre los transitorios de calcio intracelular, ya que la mutación afecta principalmente a la dinámica de este ión. Consideraron cuatro biomarcadores para ver el efecto de la mutación sobre las células: pico máximo, constante de recuperación, tiempo de pico del calcio intracelular, además del porcentaje de contracción de las células.

Para reproducir la mutación se han obtenido las mismas medidas calculadas por Fernández-Velasco, excepto el porcentaje de contracción, ya que el modelo es exclusivamente eléctrico y no es posible medir la contracción. En el estudio original no se facilitan datos sobre la forma en la que se obtuvieron la constante de recuperación y el tiempo de pico. Por este motivo nos hemos basado en otros estudios para el cálculo de los mismos (Mora et al. 2017). El cálculo de parámetros se ha realizado utilizando Matlab (The Mathworks Inc, Natick (MA), EEUU). A continuación se describe la forma de obtener cada uno de los parámetros:

- **Pico de calcio (pico):** Se obtiene el último transitorio de calcio estimulado de la simulación y se calcula su máximo.
- **Constante de recuperación (tau, τ):** Se obtiene el último transitorio de calcio estimulado y se selecciona la parte de bajada del transitorio, es decir, desde el pico hasta el final del pulso. Se añade un segundo extra de la simulación sin estimular y se normalizan los datos para mejorar el ajuste. Finalmente, este conjunto de datos se ajusta a una exponencial mediante la función *fit* de Matlab con parámetro de entrada *exp1*, la constante de recuperación será la inversa de la constante de la exponencial.

En la siguiente figura se puede observar un ejemplo del ajuste exponencial obtenido para una simulación a 2Hz sin beta estimulación. Se puede ver como a función ajusta adecuadamente el transitorio de calcio.

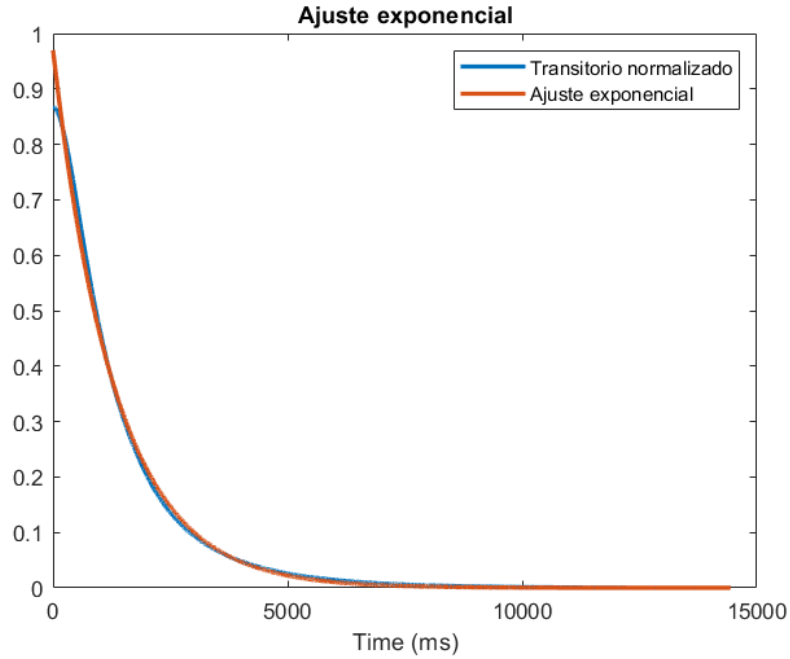


Figura 14: Transitorio de calcio normalizado y ajuste de la exponencial realizado para una simulación ejemplo.

- **Tiempo de pico (TTP, *time to peak*):** El tiempo de pico se calcula entre los puntos a los que se alcanza el 10 y 90% de la amplitud máxima del transitorio de calcio. En la siguiente figura se puede observar un ejemplo de transitorio de calcio y la forma de medir el tiempo de pico sobre el mismo.

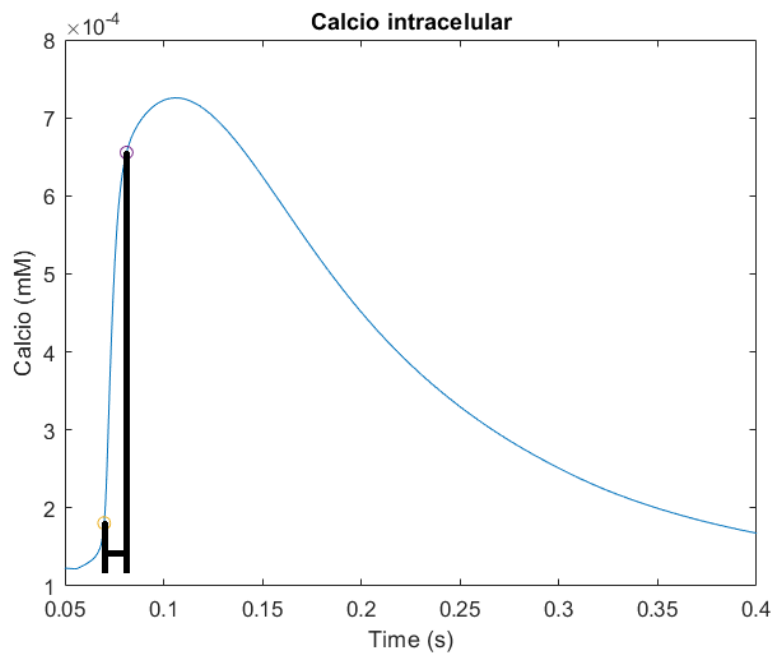


Figura 15: Transitorio de calcio intracelular. Las líneas negras indican los puntos entre los que se mide el tiempo de pico.

En la siguiente imagen se resumen los datos experimentales obtenidos por para la mutación RyR2^{R4497C}:

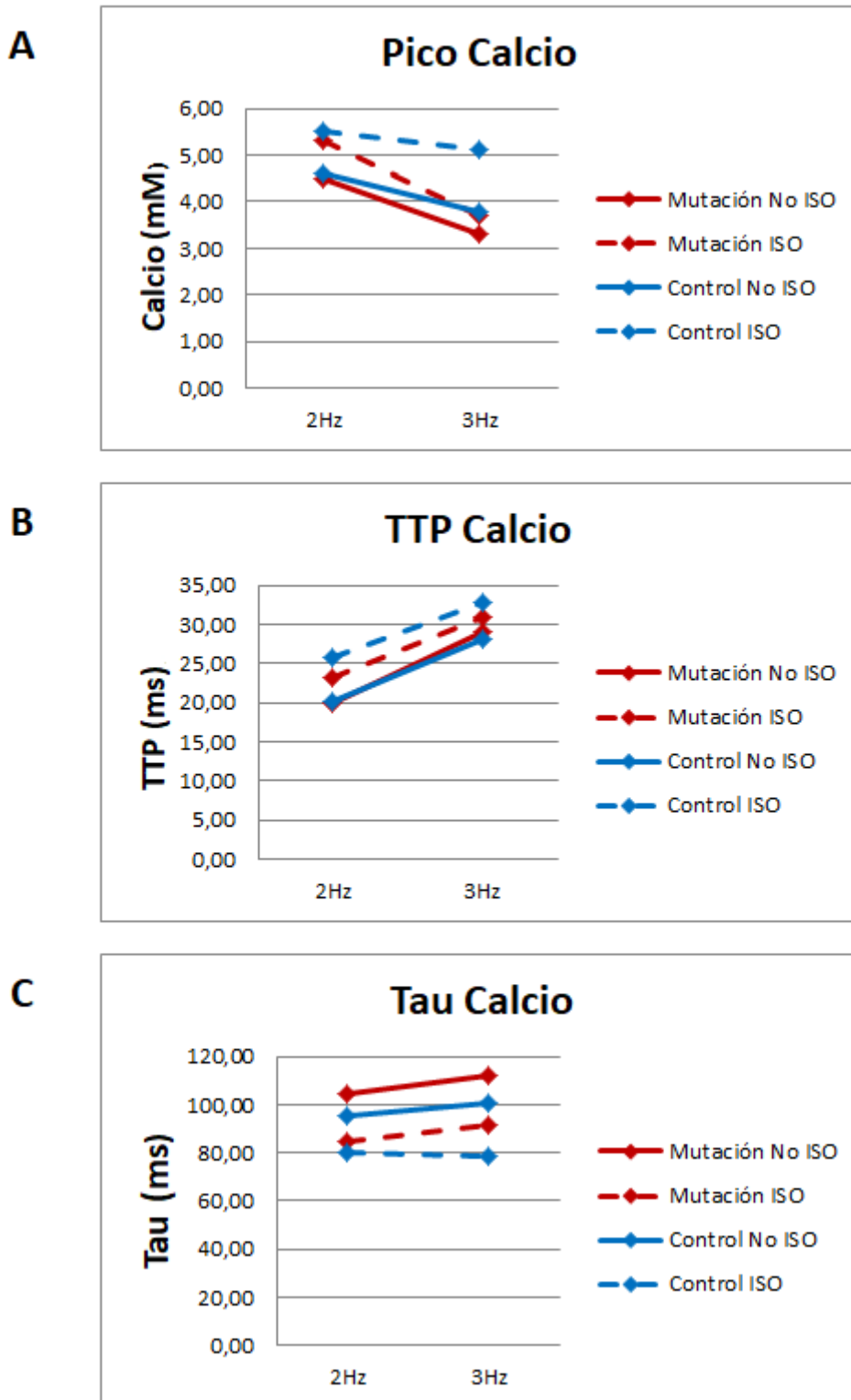


Figura 16: Resultados experimentales. En azul el control y en rojo la mutación Las líneas continuas indican que no se aplicó beta estimulación mientras que las discontinuas que sí se hizo. A: Pico de calcio intracelular. B: Tiempo de pico del calcio intracelular. C: Constante de recuperación del calcio intracelular

Donde ISO representa que se ha utilizado beta estimulación, Tau representa la constante de recuperación de la concentración intracelular de calcio y TTP (*time to peak*) el tiempo de pico de la concentración del calcio intracelular.

En la figura 16 se puede observar que a 2Hz no existen diferencias entre los cardiomiocitos sanos y los portadores de la mutación, tanto en condiciones basales como con beta estimulación. Además el ISO produce un aumento del pico máximo de calcio, una disminución de la constante de recuperación y un aumento del tiempo de pico.

El estudio realizado por Fernández-Velasco concluye que la mutación produce un aumento de la sensibilidad del canal RyR al calcio intracelular. Este aumento de sensibilidad es similar al efecto que provoca la cafeína a nivel celular (Rojo-Ruiz et al. 2018). Para simularlo, estudios previos multiplican por un determinado factor la velocidad de transición al estado abierto de los modelos de Markov del canal RyR (Ramay et al. 2010).

En nuestro estudio hemos simulado el aumento de sensibilidad introduciendo un factor multiplicativo en el parámetro K_0Ca del modelo de Markov presentado en la figura 13. Para realizar las simulaciones se ha seguido el siguiente protocolo, representado en la figura 16:

- 5 minutos estimulando con cada una de las cuatro casos escogidos (3 y 2Hz con y sin ISO) para llegar al estado estacionario en control. Se guardan las condiciones iniciales.
- 30 segundos estimulando en cada una de las condiciones estudiadas y aplicando el factor multiplicativo del parámetro K_0Ca para llegar al estado estacionario de nuevo. Se utilizan las condiciones iniciales generadas anteriormente.
- 10 segundos sin estimular para observar si se produce alguna actividad eléctrica espontánea.

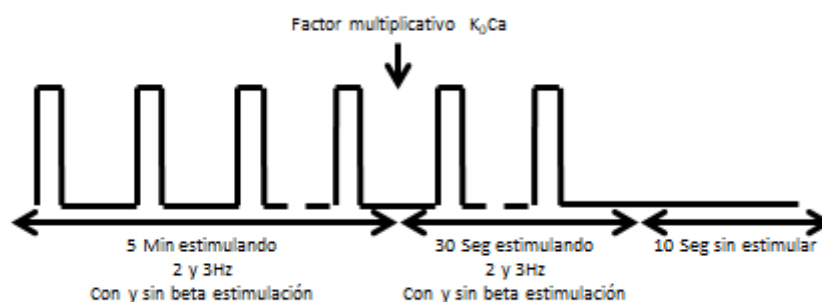


Figura 17: Protocolo de estimulación seguido para la mutación del RyR.

Finalmente, para ajustar el factor multiplicativo que reproduzca la mutación se ha empleado una herramienta de ajuste automático. Esta herramienta hace uso del algoritmo Nelder-Meads presentado en la introducción para minimizar una función de error (Moreno et al. (2013 y 2016).

Para calcular la función de error se han utilizado los parámetros explicados anteriormente. El error se obtiene como la diferencia entre los valores objetivo y aquellos obtenidos

experimentalmente elevada al cuadrado. Además se suman todos los errores de los cuatro casos (2 y 3Hz con y sin ISO) para obtener un único valor de error que será el que se minimice.

La función de ajuste automático permite introducir un límite inferior y superior para buscar el parámetro óptimo dentro de ese rango. Dado que una de las condiciones observadas experimentalmente es la aparición de DADs al dejar de estimular cuando se utiliza una alta frecuencia y beta estimulación, se introduce un límite inferior de 10. Este límite se selecciona porque es el valor mínimo por el que se debe multiplicar el parámetro K_0Ca para obtener una DAD a 3Hz con beta estimulación al dejar de estimular. Por debajo de este valor no se obtiene actividad eléctrica anómala. A continuación se muestran los resultados la simulación a 3Hz con beta estimulación y utilizando un factor multiplicativo de 10:

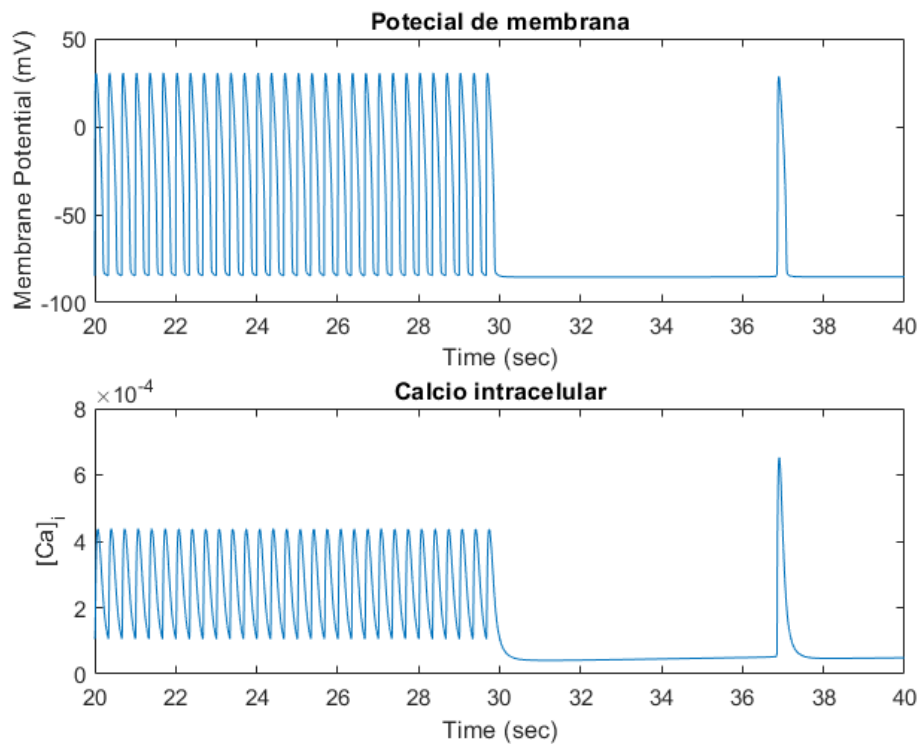


Figura 18: Arriba: potencial de membrana de la simulación, se puede observar una despolarización completa una vez se ha dejado de estimular. Abajo: Transitorio de calcio, se puede observar cómo se produce una liberación de calcio que provoca el potencial.

4.2.2 CALSEQUESTRINA:

Para modelizar la mutación de la calsequestrina se ha tomado como referencia el estudio realizado por Yang et al. (2015). En dicho estudio para reproducir la mutación asignan el valor 0 tanto a la concentración como a la derivada de la calsequestrina. Demuestran que la mutación provoca que se produzcan activaciones espontáneas una vez se ha parado la estimulación. No proporcionan datos sobre los transitorios de calcio en los potenciales de acción no espontáneos. A continuación se muestra una gráfica del trabajo de Yang et al. (2015) donde se muestra el efecto de la mutación:

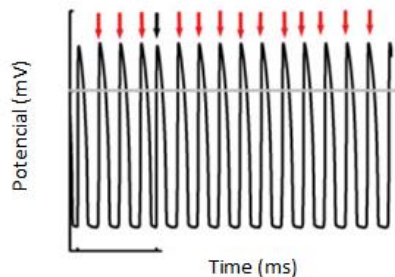


Figura 19: Simulación del potencial de membrana en presencia de la mutación de la calsequestrina a 1Hz y con beta estimulación. Las flechas negras representan potenciales de acción estimulados mientras que las rojas son potenciales de acción espontáneos. Tomada de Yang et al. (2015)

En nuestro trabajo introducimos un factor multiplicativo en la concentración inicial y derivada de la calsequestrina con el objetivo de reproducir la gráfica anteriormente mostrada.

El protocolo de simulación seguido es similar al del trabajo de referencia:

- 10 minutos sin estimular guardando los estados finales.
- 5 minutos estimulando en cada caso (2 y 3Hz con y sin beta estimulación) utilizando como condiciones iniciales los estados obtenidos en el paso previo. Se guardan los estados finales.
- 2 minutos estimulando utilizando como condiciones iniciales las anteriores y aplicando el factor multiplicativo de la mutación.

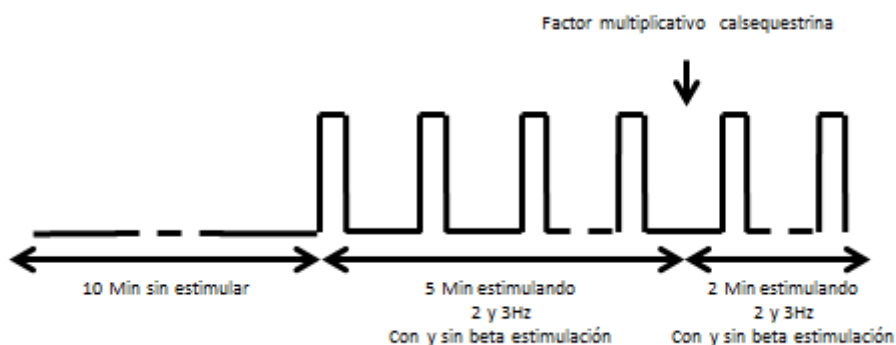


Figura 20: Protocolo de estimulación seguido en el ajuste de la mutación de la calsequestrina.

4.3 ANÁLISIS DE POBLACIÓN

El estudio poblacional se ha realizado basándose en los realizados por Britton et al. (2013 y 2017). En base a estos trabajos, se han seleccionado una serie de corrientes iónicas y se ha multiplicado su conductancia para simular la variabilidad natural presente en los individuos. Las corrientes escogidas han sido las mismas que en el trabajo de referencia: corrientes de sodio (I_{Na}), de calcio (I_{CaL}), corrientes de potasio (I_{to} , I_{Kr} , I_{K1} e I_{Ks}), la bomba sodio-potasio (I_{NaK}) y el intercambiador sodio-calcio (I_{NCX}). Cabe destacar que en el trabajo original de Britton y colaboradores (2013, 2017) modifican la corriente de sodio lenta y la rápida, pero el modelo

utilizado en este trabajo posee un modelo de Markov que contempla únicamente una formulación para ambas componentes.

Las conductancias se han modificado de forma aleatoria multiplicándolas por un factor que oscila entre 0 y 2, lo que representaría una variación de $\pm 100\%$ en el valor de la conductancia, siguiendo lo realizado por Britton y colaboradores (2013, 2017). Para generar estos factores se ha utilizado la función *lhsdesign* de Matlab que genera una distribución uniforme de valores entre 0 y 1 con el número de repeticiones que se le indique. Posteriormente para que la distribución esté en el rango de 0 a 2 se aplica la siguiente transformación.

$$\frac{Max_{nuevo} - Min_{nuevo}}{Max_{viejo} - Min_{viejo}} \cdot (distribución - Max_{viejo}) + Max_{nuevo} \quad (Ec. 24)$$

Donde Max_{nuevo} representa el máximo deseado después de la transformación, Min_{nuevo} el mínimo deseado, Max_{viejo} el máximo de la distribución original y Min_{viejo} el mínimo antes de la transformación. En nuestro caso la ecuación sustituyendo los valores quedaría de la siguiente manera:

$$\frac{2-0}{1-0} \cdot (distribución - 1) + 2 \quad (Ec. 25)$$

Para el estudio poblacional se han generado 1000 modelos, cada uno con una combinación diferente de factores multiplicativos de las conductancias. Con cada uno de esos modelos se han realizado simulaciones en cada una de las condiciones consideradas para el estudio de las mutaciones (2 y 3Hz con y sin beta estimulación). Las simulaciones tienen una duración de 40 segundos, en los primeros 30 segundos se aplica una estimulación a la frecuencia deseada y en los último 10 no se aplica estimulación, dejando ese tiempo para la posible aparición de actividad eléctrica espontánea.

El análisis poblacional se ha aplicado tanto al modelo de ventrículo en control como a los modelos desarrollados para las dos mutaciones estudiadas, en todos los casos siguiendo los protocolos explicados anteriormente. Para cada una de las simulaciones se han calculado los parámetros descritos al describir la mutación del RyR, es decir, pico máximo de calcio, constante de recuperación y tiempo de pico del calcio intracelular. Además, se han calculado dos nuevos parámetros de interés, la duración del último potencial de acción medido al 90% de repolarización (APD_{90}) y una variable binaria que indica si ha aparecido actividad eléctrica espontánea en la simulación. En la siguiente figura se muestra un ejemplo de cálculo del APD_{90}

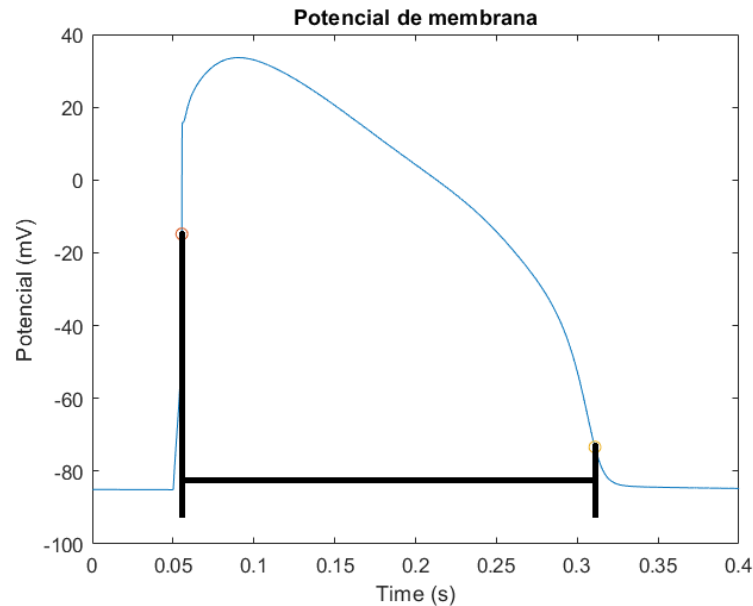


Figura 21: Ejemplo de potencial de acción, las barras verticales negras muestran los puntos entre los que se calcula la duración del potencial al 90% de repolarización

Los valores de APD_{90} obtenidos para los modelos en control se han utilizado para validar los distintos modelos, seleccionando aquellos cuyos resultados estuvieran dentro del rango fisiológico. Para establecer este rango se han utilizado los datos experimentales de potencial de acción cardiaco de O'Hara y colaboradores (2011) con un intervalo de confianza del 95%. Los valores son los siguientes:

- 2Hz: 45.68-424.32 ms
- 3Hz: 24.68-403.32 ms

El estudio de O'Hara (O'Hara y colaboradores. 2011) no se realizó en presencia de beta estimulación. Por lo que, debido a la ausencia de datos, en este trabajo se ha decidido considerar dichos límites también para las simulaciones con dicha estimulación. Por lo tanto, se contemplan cuatro condiciones que debe de cumplir un modelo para ser considerado válido. De los 1000 modelos desarrollados inicialmente, únicamente 628 modelos cumplen estos requisitos. Estos 628 son los que se han utilizado posteriormente para generar la población de los modelos de las mutaciones.

Tras realizar los tres conjuntos de poblaciones (control, mutación del RyR y mutación de la calsequestrina) se ha elaborado una correlación entre los factores multiplicativos de las conductancias y los cuatro de los cinco parámetros medidos sobre las simulaciones. Con esta correlación se pretende analizar que corrientes tiene un mayor efecto sobre los modelos y si ese efecto se ve alterado por las distintas mutaciones. Para la correlación se ha utilizado la función *partialcorri* de Matlab. Para el quinto parámetro, al tratarse de una variable binaria, se ha realizado una regresión logística y obtenido los coeficientes de la misma para valorar la importancia de las distintas conductancias. La regresión logística se ha realizado utilizando la herramienta BigML.

5 RESULTADOS

5.1 AJUSTE MUTACIÓN RyR2^{R4497C}

El ajuste de la mutación se ha realizado considerando los datos experimentales obtenidos por Fernández-Velasco reflejados en la tabla 1. Dado que el estudio de referencia se hizo en células de ratón, para nuestro ajuste se han utilizado los porcentajes experimentales de variación entre las células con mutación y las células control en cada una de las cuatro condiciones. El valor de estos porcentajes aparece en la siguiente tabla:

	2Hz No ISO (%)	2Hz ISO (%)	3Hz No ISO (%)	3Hz ISO (%)
Pico calcio	-2.17	-3.64	-13.16	-27.45
TTP	-1.00	-10.12	3.20	-5.20
τ	9.31	5.76	11.22	17.14

Tabla 1: Porcentajes experimentales de variación de las células con mutación con respecto a las células control.

En primer se obtienen los valores de los biomarcadores de nuestro modelo en control en las cuatro situaciones estudiadas aplicando el protocolo que aparece en la figura 16. Esos valores se usarán para calcular los porcentajes que se compararan con los experimentales para ajustar la mutación. En la siguiente tabla se recogen los resultados en control:

		Pico (ms)	τ (ms)	TTP (ms)
2 Hz	Base	7.25	132.39	12.20
	ISO	12.75	104.83	27.00
3 Hz	Base	5.78	136.93	18.10
	ISO	10.71	105.50	24.60

Tabla 2: Biomarcadores simulados en control.

Comparando los valores simulados con los experimentales recogidos en la tabla 1, podemos ver que el pico de calcio simulado es mayor. Además, el tiempo de pico simulado es menor en ausencia de beta estimulación y similar en su presencia. Finalmente, las mayores diferencias se encuentran en la constante de recuperación, siendo ésta significativamente mayor en las simulaciones. Estas diferencias en los valores pueden deberse al hecho de que el modelo es de ventrículo humano y los datos experimentales se realizaron sobre cardiomiocitos de ratón. Además, en el estudio experimental no se detalla el cálculo de los biomarcadores, por lo que puede existir diferencia en la forma en la que se han obtenido.

En cuanto el efecto de la beta estimulación sobre el modelo, la tendencia es similar a la obtenida experimentalmente. Este fenómeno produce un aumento del pico de calcio, disminuye la constante de recuperación y aumenta el tiempo de pico. Sin embargo, estas variaciones son mayores en el modelo.

Una vez obtenidos los valores en control, se ha utilizado la herramienta de ajuste automático para encontrar el factor multiplicativo del parámetro K_0Ca que mejor reproduce la mutación. La herramienta se configura con un límite inferior de 10, valor mínimo en el cual se

consigue actividad eléctrica espontánea, sin límite superior y con una tolerancia de 10^{-6} . Como valor inicial de búsqueda del parámetro se utiliza 30.

En cada iteración se simulan las cuatro situaciones consideradas, siguiendo el protocolo de la figura 16 y multiplicando en parámetro K_0Ca por un valor determinado. Para la primera iteración este valor es 30. En cada una de las situaciones se obtienen los tres biomarcadores explicados anteriormente y se calculan los porcentajes de variación con respecto a los valores control de la tabla 3. El error se calcula como la suma de las diferencias al cuadrado entre los porcentajes obtenidos y los deseados (recogidos en la tabla 2). La herramienta evalúa el error y, si no se cumple ningún criterio de parada, selecciona un nuevo factor multiplicativo y comienza otra iteración simulando las cuatro situaciones.

La herramienta de ajuste devuelve un factor multiplicativo de 10 para ajustar la mutación, sin embargo el valor de error obtenido es muy elevado. Esto se debe a que 10 es el límite inferior y la herramienta no puede seleccionar valores menores, por lo que devuelve ese resultado. Este límite se fijó porque por debajo de él no se obtiene actividad eléctrica espontánea simulada.

Debido al alto error obtenido, se decide realizar un nuevo ajuste utilizando como límite inferior un valor de 1. Este límite se establece porque el factor multiplicativo tiene que ser mayor que 1 para que reproduzca el aumento de sensibilidad característico de la mutación. En este caso la función devuelve un valor de 1.223 con un error dentro de los límites de tolerancia. Aunque este resultado mimetiza mejor los porcentajes experimentales, esto se debe a que estos son pequeños. Por lo tanto, aplicar un factor multiplicativo pequeño provoca que las simulaciones sean similares a las de control y hace que los porcentajes obtenidos sean también pequeños, reduciendo el error obtenido por la herramienta.

Sin embargo utilizando el factor multiplicativo de 1.223 no es posible generar actividad eléctrica espontánea al dejar de estimular a altas frecuencias con beta estimulación. Dado que ésta es una de las principales características de la mutación obtenidas en el estudio experimental de Fernández-Velasco y colaboradores (2009), se decide descartar el factor y utilizar el primer ajuste con un valor de 10. A continuación se presenta una comparativa entre los biomarcadores experimentales y los simulados, tanto en control como con la mutación ajustada.

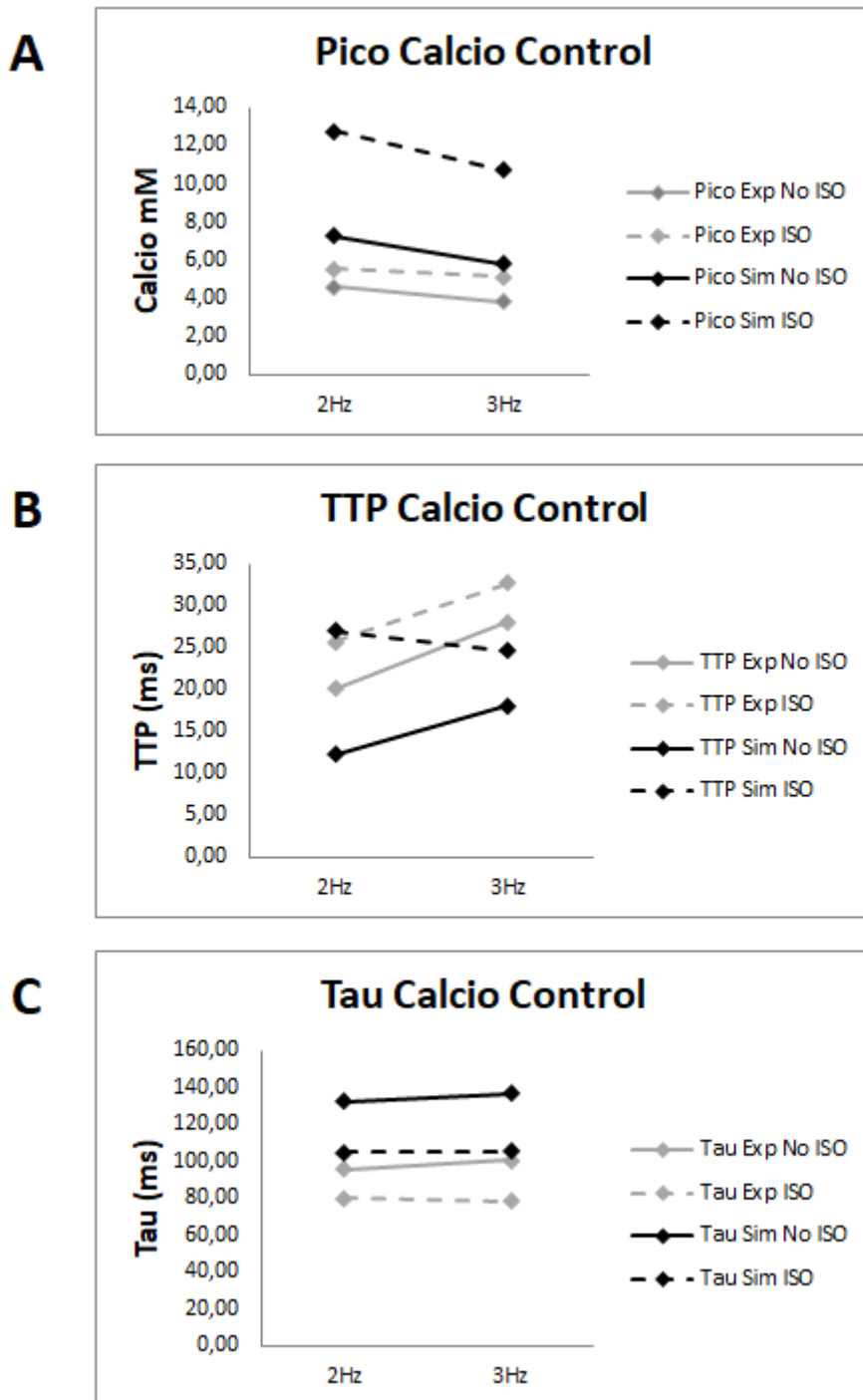


Figura 22: Comparación de los biomarcadores obtenidos en control. En gris los experimentales y en negro los del modelo. Las líneas continuas indican que no se aplicó beta estimulación mientras que las discontinuas que sí se hizo. A: Pico de calcio intracelular. B: Tiempo de pico del calcio intracelular. C: Constante de recuperación del calcio intracelular

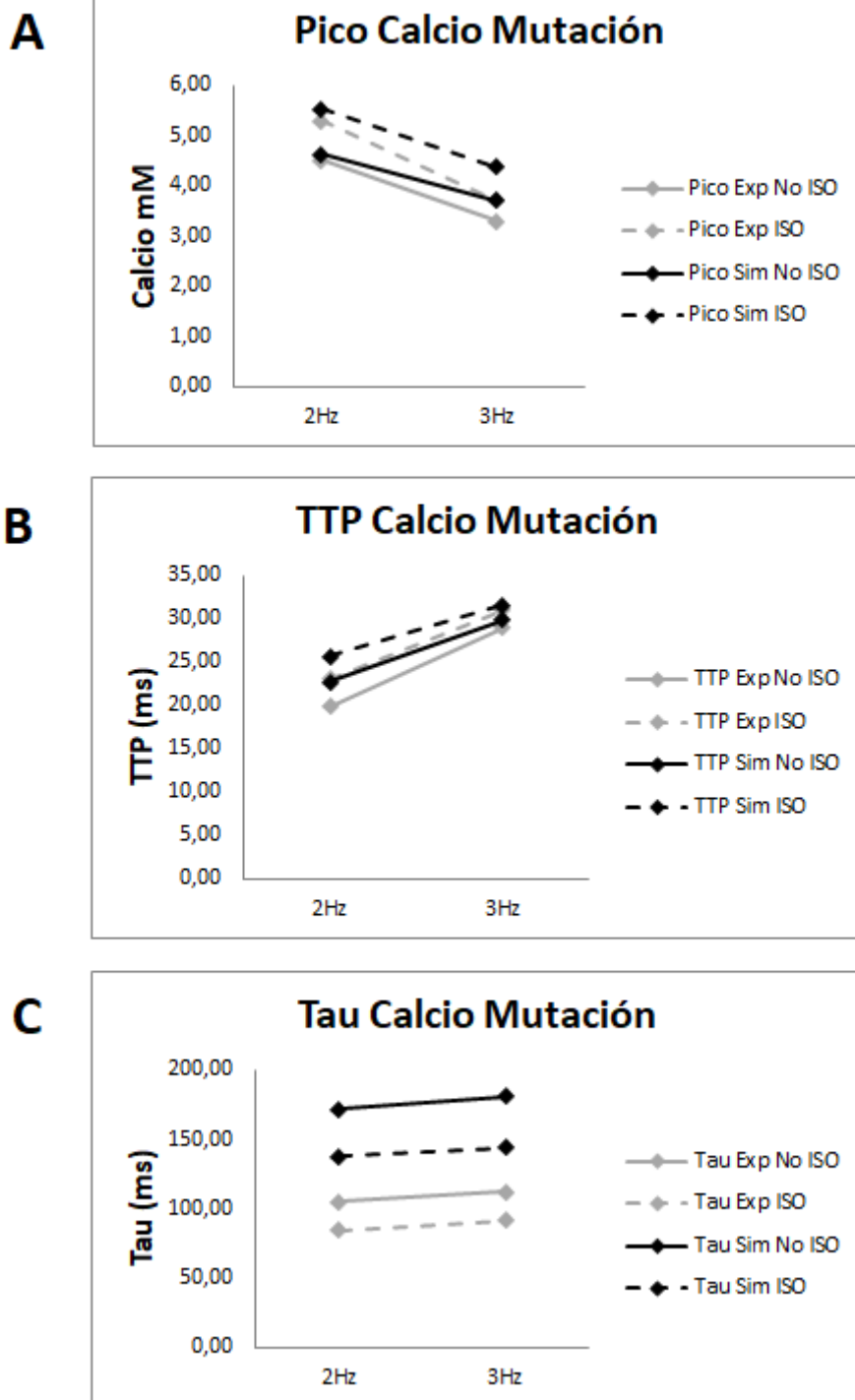


Figura 23: Comparación de los biomarcadores obtenidos con la mutación. En gris los experimentales y en negro los del modelo. Las líneas continuas indican que no se aplicó beta estimulación mientras que las discontinuas que sí se hizo. A: Pico de calcio intracelular. B: Tiempo de pico del calcio intracelular. C: Constante de recuperación del calcio intracelular

En las figuras 22 y 23 podemos ver que en control existen diferencias entre los biomarcadores, tanto a 2 y 3Hz como con y sin beta estimulación. Además se puede observar que en las simulaciones a 2Hz sí que hay variación en los biomarcadores al introducir la mutación (figura 24), mientras que experimentalmente no se observan grandes diferencias (figura 16).

Por el contrario, cabe destacar que los valores de pico de calcio y tiempo de pico observados en la mutación experimental y en las simulaciones en las que el parámetro K_0Ca se ha multiplicado por 10 son similares. Esto no es así para la constante de recuperación, pero como ya se ha mencionado, no se disponía de información sobre la forma en la que se calculó experimentalmente. En este estudio se ha utilizado la función mencionada en los métodos, pero los resultados obtenidos pueden ser diferentes debido a discrepancias en el cálculo.

Debido a la similitud de estos resultados e independientemente de que las células estudiadas no sean de la misma especie, se decide realizar un nuevo ajuste automático. En este caso no se busca reproducir los porcentajes experimentales sino los valores de los biomarcadores experimentales para la mutación. De esta forma el error se calcula como la suma de las diferencias al cuadrado entre el biomarcador de mutación simulado y el experimental, a 2 y 3Hz con y sin beta estimulación.

Con este nuevo ajuste la herramienta también devuelve como resultado un valor de 10 para multiplicar el parámetro K_0Ca por ser este el valor inferior. Sin embargo, en valor de error es significativamente inferior al obtenido anteriormente. De nuevo se decide realizar un ajuste en estas condiciones pero con límite inferior 1. En este caso la herramienta sigue devolviendo 10 como valor óptimo.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decide seleccionar como modelo de mutación aquel en el que se multiplica por 10 el parámetro K_0Ca . En la siguiente figura se recogen todos los biomarcadores obtenidos con el modelo, tanto en control como para la mutación.

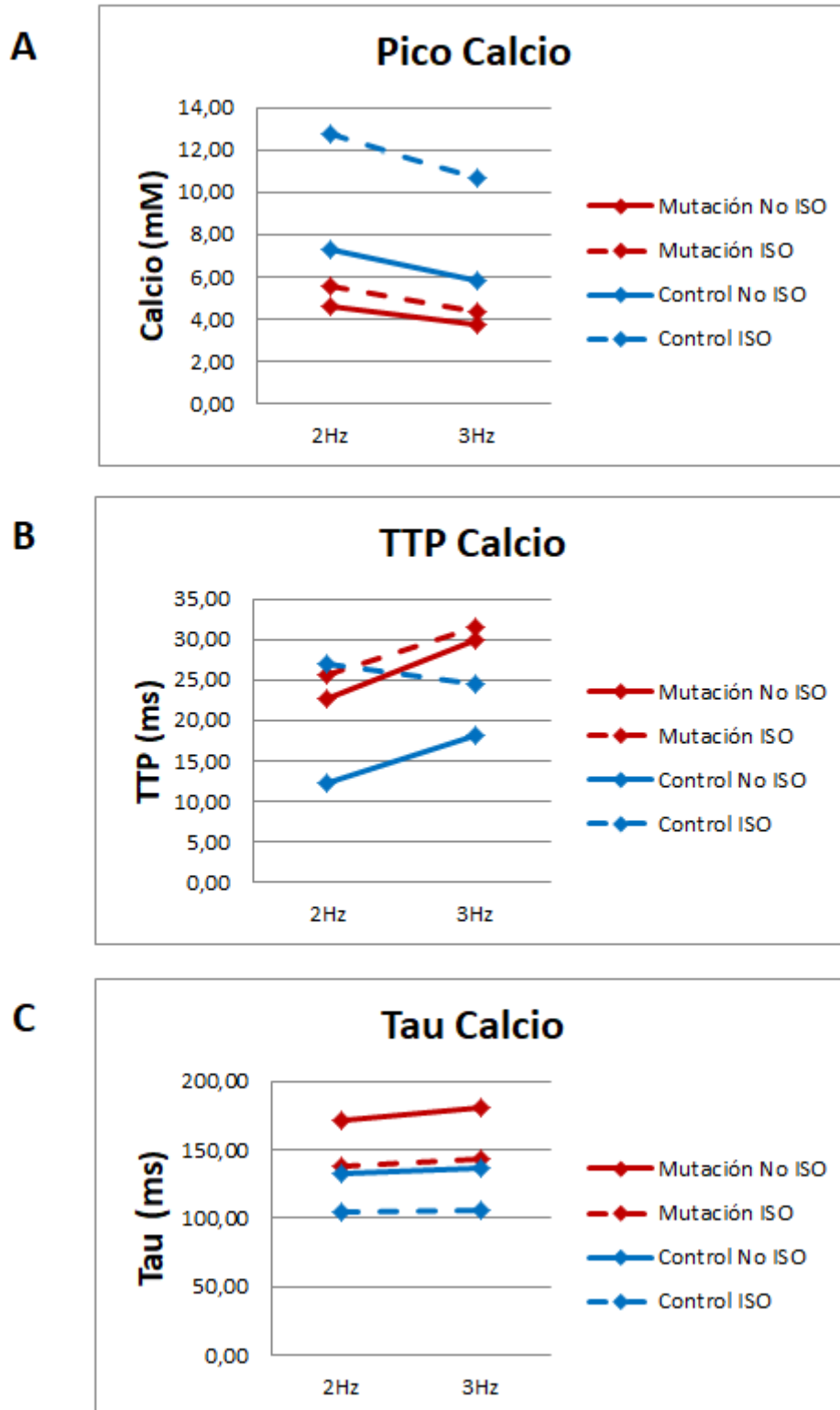


Figura 24: Resultados simulados. En azul el control y en rojo la mutación. Las líneas continuas indican que no se aplicó beta estimulación mientras que las discontinuas que sí se hizo. A: Pico de calcio intracelular. B: Tiempo de pico del calcio intracelular.

5.2 AJUSTE MUTACIÓN CASQ2(-/-)

La modelización de esta mutación se realiza fijando a 0 la concentración inicial de calsequestrina y su derivada (Ec. 22 y 23), tal y como puede encontrarse en la literatura [Yang et al. XXX]. En estas condiciones se realiza una simulación a 1Hz aplicando beta estimulación siguiendo el protocolo descrito en la figura 19. El objetivo es reproducir lo observado en la figura 18. En la siguiente imagen se muestran los resultados de potencial de membrana y calcio intracelular obtenidos con el modelo multiplicando por 0 las ecuaciones de la calsequestrina:

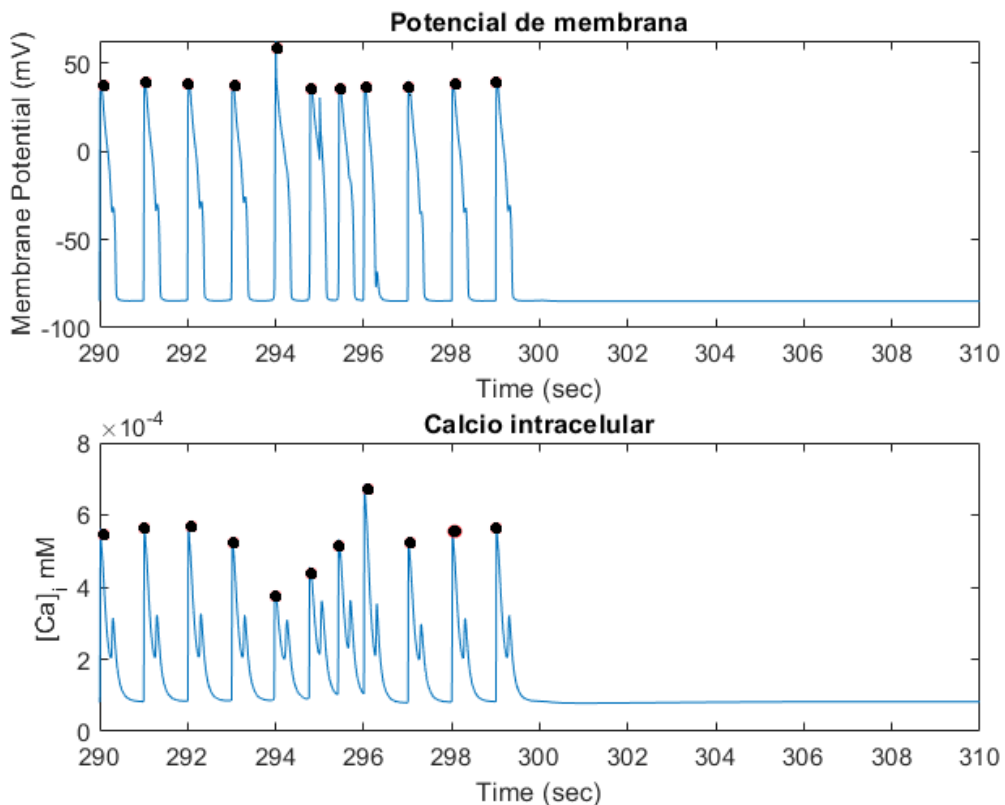


Figura 25: Evolución del potencial de membrana (arriba) y del calcio intracelular (abajo) en estado estacionario a 1Hz y durante el periodo posterior sin estimulación al anular la concentración de calsequestrina. Los puntos negros señalan los potenciales de acción resultantes de estimulación eléctrica.

En la gráfica del potencial se puede observar que después de cada pulso aparece una pequeña despolarización temprana (EAD). Asimismo, se produce una liberación de calcio que es la responsable de la EAD observada en el potencial. Sin embargo, los resultados obtenidos no se corresponden con los deseados. En efecto, Yang y sus colaboradores obtienen potenciales de acción espontáneos entre los estimulados y tras el cese de la estimulación. Esto podría deberse a que los modelos utilizados en ambos estudios son diferentes, Yang y colaboradores utilizaban el modelo de cardiomiocito de conejo de Soltis y Saucerman (2010).

La no consecución de los resultados puede deberse a que fijar a 0 las dos ecuaciones tiene un efecto excesivo sobre el modelo. Por este motivo, se decide realizar una nueva simulación reduciendo en un 50% el valor de la concentración inicial y de la derivada de la calsequestrina. En la siguiente figura se presentan los resultados:

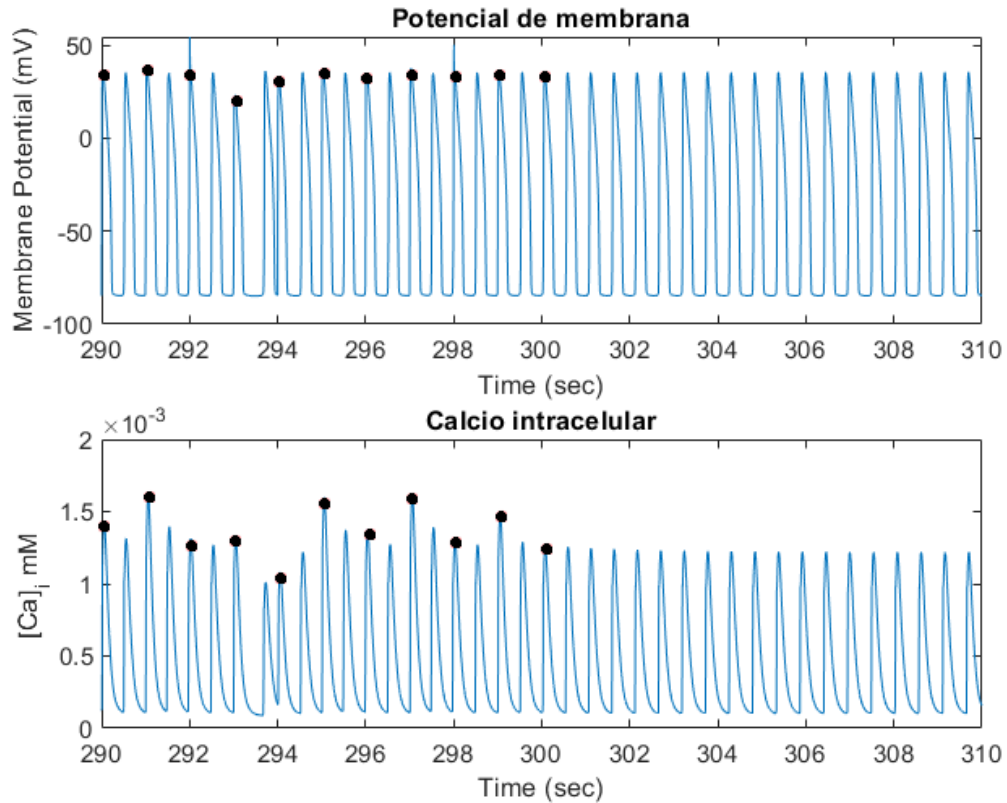


Figura 26: Evolución del potencial de membrana (arriba) y del calcio intracelular (abajo) en estado estacionario a 1Hz y durante el periodo posterior sin estimulación al reducir a la mitad la concentración inicial de la calsequestrina y su derivada. Los puntos negros señalan los pulsos estimulados.

En la Figura 26 Se observa que aparecen pulsos espontáneos entre los estimulados y se produce actividad espontánea al cesar la estimulación y, tal y como se observa experimentalmente.

Teniendo en cuenta estos resultados se selecciona como modelo de la mutación de la calsequestrina el que resulta de reducir un 50% la concentración inicial y su derivada de la calsequestrina.

5.3 POBLACIÓN DE MODELOS

Como se ha explicado anteriormente para el estudio de la población de modelos se obtuvieron 628 cuya duración del potencial de acción en control se encontraba dentro de los valores fisiológicos (figura 27). Con esos 628 modelos se han realizado las poblaciones introduciendo las mutaciones del canal RyR y de la calsequestrina.

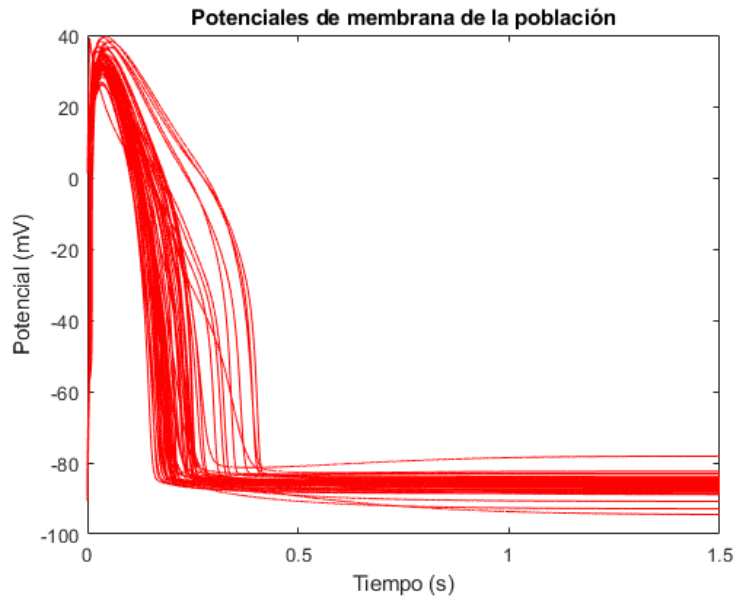


Figura 27: Últimos potenciales de membrana para la población de modelos en control.

Para cada una de las poblaciones de modelos, es decir, en control y con cada una de las dos mutaciones y en cada una de las condiciones estudiadas (2 y 3Hz con y sin beta estimulación) se han obtenido los histogramas del APD_{90} y se ha estudiado la generación de actividad eléctrica espontánea susceptible de producir efectos arrítmicos. A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada población.

- **Control**

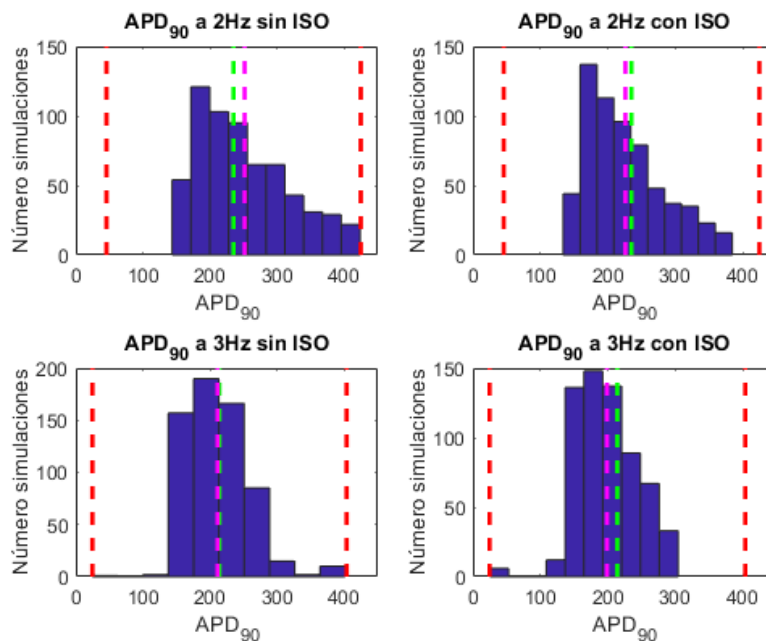


Figura 28: Histogramas del APD_{90} para la población en control en cada una de las condiciones estudiadas con los 628 modelos. Las líneas rojas señalan los límites del rango fisiológico, la verde la media experimental y la morada la media de las simulaciones.

En la figura 28 se puede observar como la mayoría de los potenciales de acción tienen una duración cercana al valor medio del rango fisiológico. Por otro lado, alterar las conductancias de las corrientes tiende a producir una prolongación del potencial, provocando que la distribución se encuentre truncada por la izquierda. Además se aprecia que a 2Hz la duración del potencial de acción alcanza valores superiores, esto se debe al fenómeno de restitución. Cuanto menor es la frecuencia de estimulación, hay más tiempo entre pulsos y el potencial se alarga. Las medias experimentales y de las simulaciones son similares en todos los casos.

En cuanto al efecto de la beta estimulación, se puede observar se produce un pequeño desplazamiento de la media hacia la izquierda.

Finalmente, en esta población no se produjo actividad eléctrica espontánea en ninguno de los modelos bajo ninguna de las condiciones.

- **Mutación RyR2^{R4497C}**

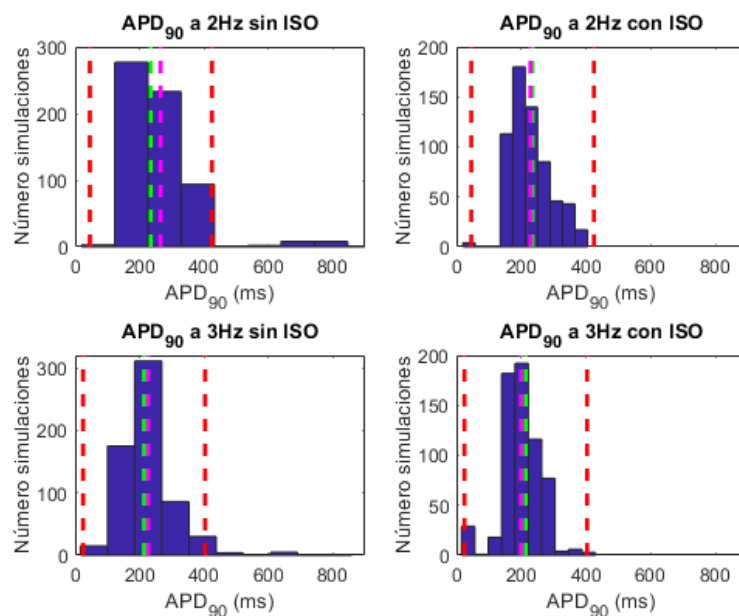


Figura 29: Histogramas del APD₉₀ para la población con la mutación del RyR2^{R4497C} en cada una de las condiciones estudiadas con los 628 modelos. Las líneas rojas señalan los límites del rango fisiológico, la verde la media experimental y la morada la media de las simulaciones.

En la figura 29 se observa que al introducir la mutación del canal de liberación de calcio, algunos modelos que se encontraban dentro del rango fisiológico en control se salen de dicho rango, en concreto esto sucede en 62 de los 628 modelos. Esto se produce con mayor frecuencia cuando no se aplica beta estimulación. Además, la mayoría de los modelos que salen del rango lo hacen por un aumento de la duración del potencial de acción. De nuevo las medias experimentales y simuladas son similares en todos los casos.

En lo referente a la beta estimulación, no produce grandes diferencias sobre la distribución de la población.

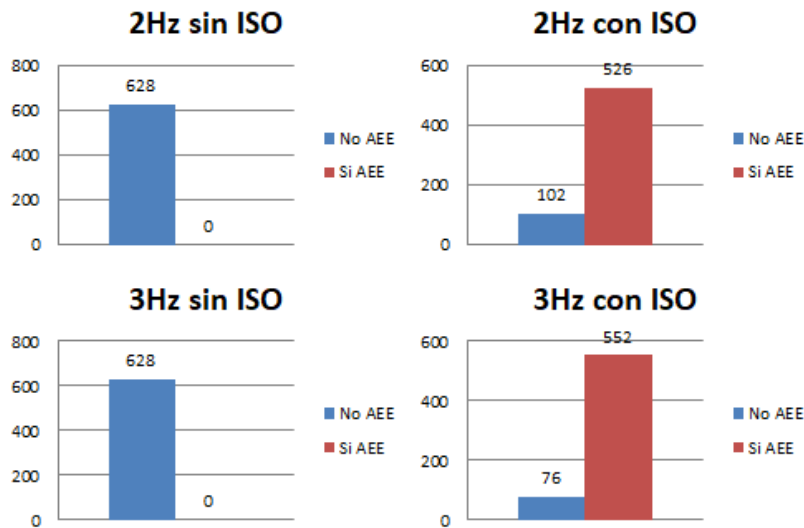


Figura 30: Número de modelos de la población con la mutación RyR2^{R4497C} que presentan o no actividad eléctrica espontánea (AEE) en cada una de las condiciones

Finalmente, en cuanto a la presencia de actividad eléctrica espontánea (figura 30), sin aplicar beta estimulación no se produce en ningún modelo, tal y como ocurría en control. Sin embargo, al aplicar beta estimulación se produce actividad espontánea en un.

- **Mutación de la calsequestrina**

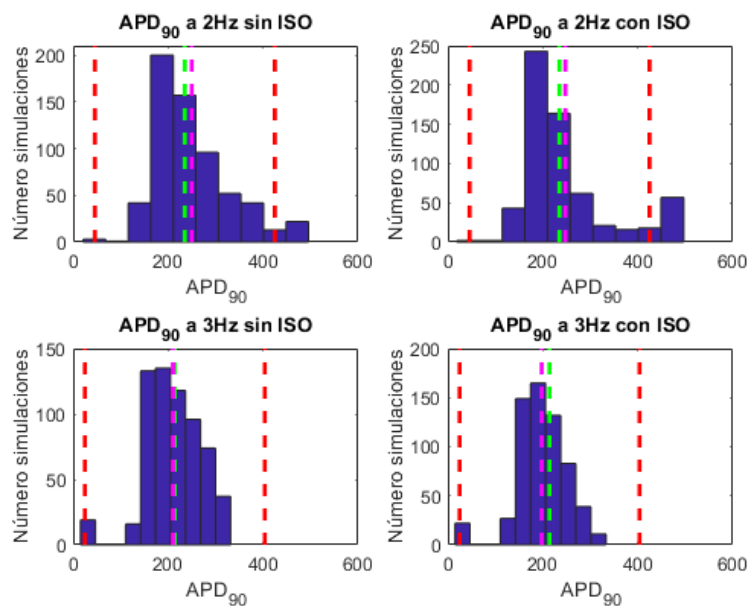


Figura 31: Histogramas del APD₉₀ para la población con la mutación de la calsequestrina en cada una de las condiciones estudiadas con los 628 modelos. Las líneas rojas señalan los límites del rango fisiológico, la verde la media experimental y la morada la media de las simulaciones.

En este caso también sucede que varios modelos se salen del rango fisiológico en control en alguna de las condiciones (figura 31). Esto ocurre con más frecuencia que en la mutación del RyR, resultando en 121 de 628 modelos cuyos potenciales salen del rango. Es a 2Hz donde se

produce una mayor desviación de los modelos y, de nuevo, la mayoría escapan del rango por un aumento de la duración del potencial de acción. A 3Hz no hay ningún caso cuyo APD₉₀ sea excesivamente elevado. Los valores medios continúan siendo similares.

En cuanto a la beta estimulación, en este caso produce un desplazamiento hacia la izquierda de los valores medios de duración del potencial. Esto ocurre tanto a 2 como a 3Hz.

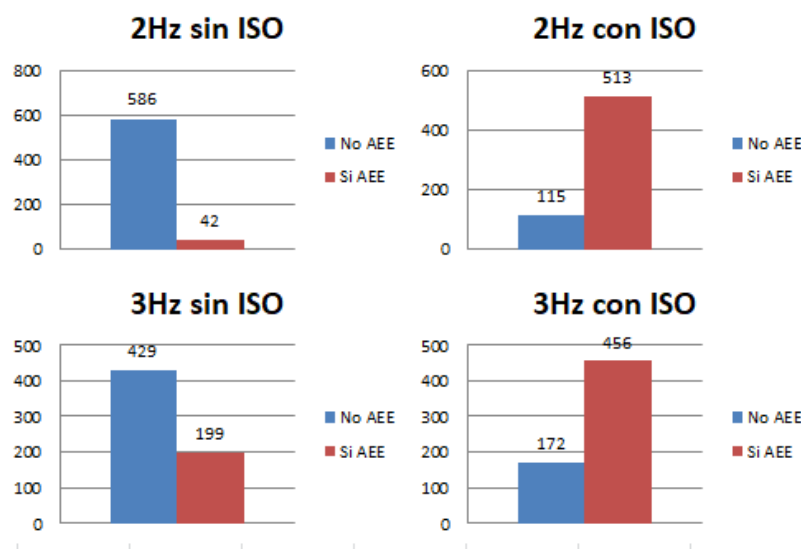


Figura 32: Número de modelos de la población con la mutación CASQ2(-/-) que presentan o no actividad eléctrica espontánea (AEE) en cada una de las condiciones

Por último, en cuanto a la presencia de actividad eléctrica espontánea (figura 32). Esta mutación es la única que provoca AEE en las cuatro condiciones estudiadas, incluso sin la aplicación de beta estimulación. Este resultado concuerda con el hecho de que esta mutación producía actividad eléctrica espontánea incluso sin necesidad de altas frecuencias (figura 26). Además, el total de modelos que presentan actividad espontánea es muy superior al de la otra mutación.

5.4 CORRELACIÓN Y REGRESIÓN LOGÍSTICA

Como se ha mencionado en los métodos, para valorar el efecto de cada conductancia y ver en cada biomarcador, se ha realizado una correlación entre los valores de las conductancias en cada uno de los 628 modelos y las medidas obtenidas para el pico de calcio, tiempo de pico, constante de recuperación y APD₉₀ en cada uno de esos modelos.

En el caso del quinto biomarcador que determina la presencia o no de actividad eléctrica espontánea, se trata de una variable categórica codificada como 0 en caso de no producirse dicha actividad o como 1 en caso de producirse. Por este motivo no se puede utilizar la correlación. Así pues, se decide realizar una regresión logística de modo que la conductancia con mayor coeficiente en la regresión será la que más afecte a la aparición de este tipo de actividad. Para la población en control y sin aplicar beta estimulación en la población de la mutación RyR2^{R4497C} no se ha realizado regresión, ya que no se genera actividad espontánea.

Las figuras 33, 34, 35, 36, 38 y 39 representan las matrices de correlación normalizadas con respecto al valor máximo de cada biomarcador. El color rojo representa un valor positivo de correlación y el color azul uno negativo, esto significa que la sensibilidad del biomarcador con respecto a dicha variable es positiva o negativa respectivamente. Una sensibilidad positiva implica que al aumentar la variable aumenta el valor del biomarcador y una negativa lo contrario. Las figuras 37 y 40 representan los coeficientes de la regresión logística normalizados con respecto al valor máximo en cada condición en la que se produce actividad eléctrica espontánea (figuras 31 y 32). Destacar que el signo de los coeficientes se obtiene con respecto a predecir que no se produzca esta actividad. Los colores representan los mismo que en las correlaciones. A continuación se presentan las gráficas obtenidas para la población en control y las poblaciones mutadas en cada una de las condiciones:

- **Control:**

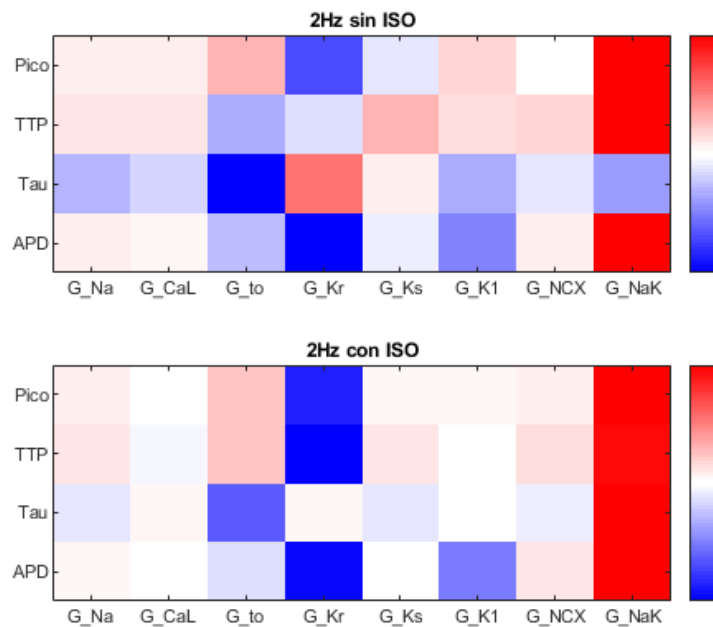


Figura 33: Matrices de correlación normalizada en control a 2Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).

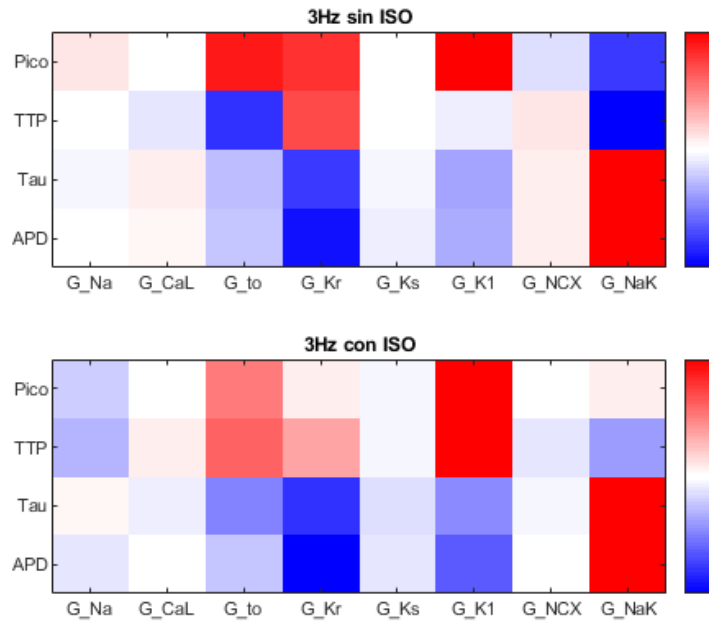


Figura 34: Matriz de correlación normalizada en control a 3Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).

En la figura 34 se puede observar que a 2Hz la actividad máxima de la bomba sodio-potasio (G_NaK) y la conductancia de la componente rápida de la corriente diferida de potasio (G_Kr) presentan las mayores correlaciones con todos los biomarcadores estudiados con independencia de aplicar o no beta estimulación. En el caso de la bomba, la sensibilidad es positiva y la más alta en todos los casos independientemente de la aplicación de beta estimulación, excepto en la constante de recuperación con beta estimulación, en este caso la conductancia de la corriente transitoria de salida de potasio (G_to) es la que tiene mayor correlación. La corriente de potasio presenta una sensibilidad muy elevada pero negativa con la mayoría de biomarcadores.

En cuanto a los resultados a 3Hz (figura 35), la bomba de sodio-potasio continúa siendo una de las variables más importantes, si bien su sensibilidad se vuelve negativa para el pico de calcio y el tiempo de pico sin beta estimulación. La componente rápida de la corriente diferida de potasio también se mantiene como una de las más relevantes. Finalmente, a diferencia de lo que sucede a 2Hz, la corriente rectificadora inversa de potasio (G_K1) es la que más afecta al pico de calcio independientemente de la beta estimulación y al tiempo de pico cuando se aplica dicha estimulación. La beta estimulación no provoca cambios significativos en la importancia de las corrientes.

- **Mutación RyR2^{R4497C}:**

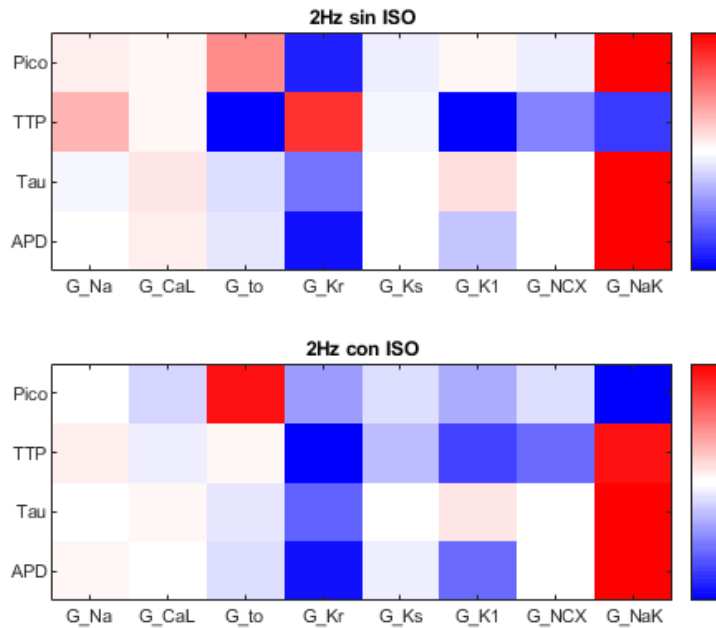


Figura 35: Matriz de correlación normalizada con la mutación RyR2^{R4497C} a 2Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).

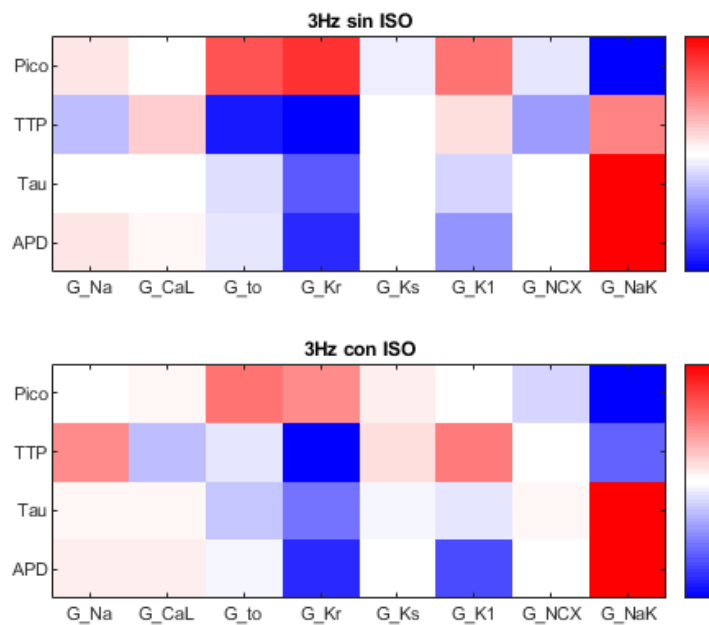


Figura 36: Matriz de correlación normalizada con la mutación RyR2^{R4497C} a 3Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).

Los resultados obtenidos con la mutación RyR2^{R4497C} son similares a los de control. A 2Hz las mayores correlaciones se obtienen para la bomba sodio-potasio y la componente rápida de la

corriente diferida de potasio, esta última es todavía más relevante en el caso de la mutación. Los signos de las sensibilidades también se mantienen para la mayoría de los biomarcadores, positiva para la bomba y negativa para la corriente. La sensibilidad de la bomba sodio-potasio se invierte para el tiempo de pico sin beta estimulación y el pico con beta estimulación. También cabe destacar la corriente transitoria de salida de potasio (G_to) que tiene especial importancia en el tiempo de pico sin beta estimulación y en el pico con estimulación. Al igual que en control, la aplicación de beta estimulación en presencia de la mutación no produce alteraciones grandes en la importancia de las corrientes, sin embargo invierte la sensibilidad en algunos biomarcadores.

A 3Hz vuelven a observarse resultados similares a los de control, además sigue sin haber grandes cambios con respecto a la mutación a 2Hz.. La bomba de sodio-potasio y la corriente rápida de potasio siguen siendo las variables más importancia. Cabe destacar que la mutación provoca que la corriente de potasio tipo 1 pierda importancia a 3Hz con respecto a lo que sucede en control. Al igual que en los casos anteriores, la beta estimulación no provoca grandes cambios.

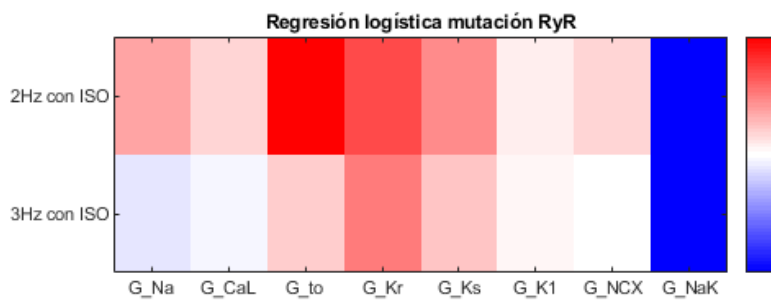


Figura 37: Matriz de coeficientes de la regresión logística para la mutación RyR^{R4497C}.

En la figura 37 que muestra la matriz de coeficientes de la regresión en presencia de la mutación RyR^{R4497C} se puede observar que la bomba sodio-potasio continúa siendo la más relevante. A 2Hz también destaca la corriente transitoria de salida de potasio (G_to), sin embargo a 3Hz la importancia de todas las corrientes es mucho menor que la de la bomba.

- **Mutación CASQ2(-/-):**

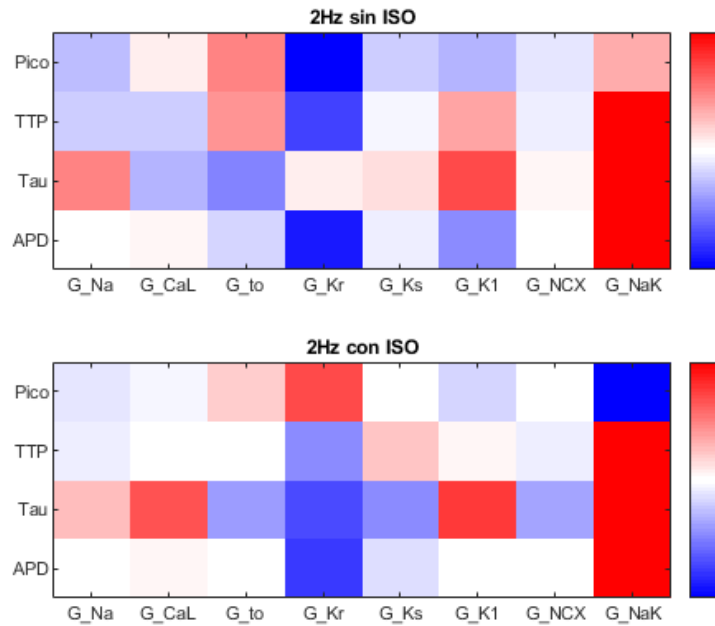


Figura 38: Matriz de correlación normalizada con la mutación CASQ2(-/-) a 2Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).

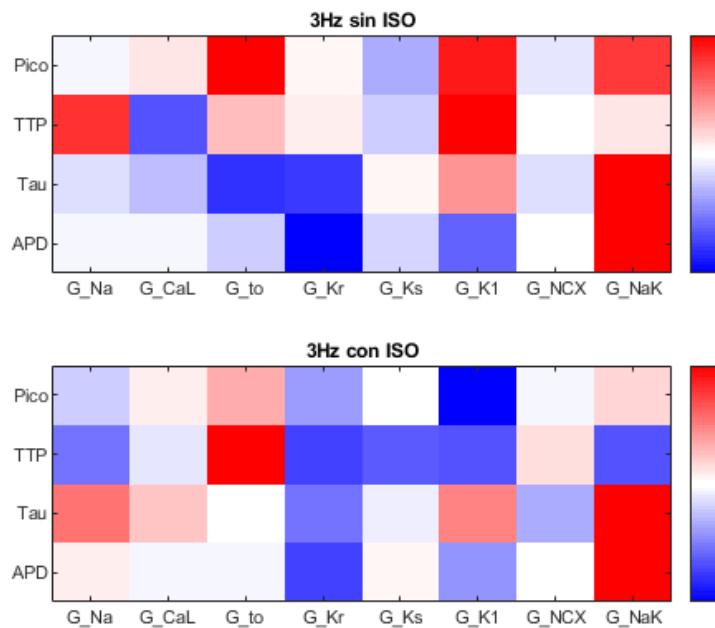


Figura 39: Matriz de correlación normalizada con la mutación CASQ2(-/-) a 3Hz sin beta estimulación (arriba) y con beta estimulación (abajo).

A 2Hz los resultados siguen el línea con lo obtenido anteriormente, la bomba sodio-potasio y la corriente rápida de potasio son las más importantes con sensibilidad positiva y negativa en la mayoría de los casos respectivamente. Sin embargo se puede ver como otras corrientes

como la de calcio tipo L (G_CaL), sodio (G_Na), potasio (G_to) y la de potasio tipo 1 (G_K1) tienen valores de correlación más elevados que en los casos de control y mutación del RyR. La aplicación de beta estimulación continúa sin provocar grandes cambios, sin embargo con esta mutación su efecto es algo superior a los casos anteriores. En particular la aplicación de beta estimulación a 2Hz hace que las corrientes que no son la bomba sodio-potasio y la rápida de potasio pierdan importancia.

A 3Hz se observa mucha más variabilidad que en los casos anteriores. La bomba sodio-potasio y la corriente rápida de potasio siguen siendo muy importantes, pero el resto de corrientes tienen valores de correlación más elevados. Este efecto es más marcado que el observado a 2Hz con esta misma mutación. Destaca especialmente la corriente de potasio tipo 1 que tiene importancia similar a la de la bomba y la rápida de potasio. En este caso no hay grandes diferencias entre los resultados obtenidos con y sin beta estimulación.

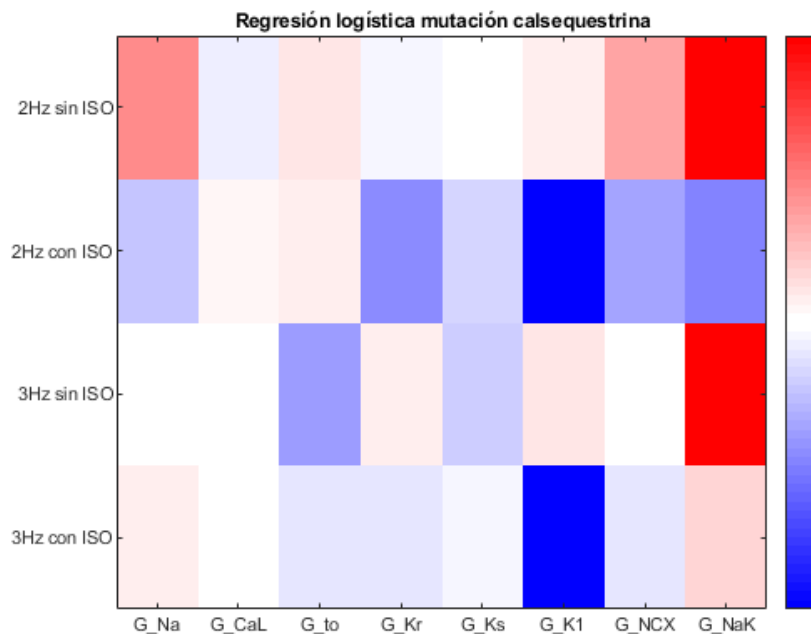


Figura 40: Matriz de coeficientes de la regresión logística para la mutación CASQ2(-/-).

En la figura 40 que muestra la matriz de coeficientes de la regresión para la mutación CASQ2(-/-) se observa que en los casos donde no se aplica beta estimulación la bomba sodio-potasio es la variable más importante, con signo positivo. Sin embargo, al aplicar beta estimulación pasa a ser la corriente de potasio tipo 1 la variable más importante, con signo negativo. El resto de corrientes son menos importantes. No se observan grandes diferencias debidas a la frecuencia de estimulación.

Los resultados obtenidos se encuentran en línea con lo observado en otros estudios. La importancia de la bomba sodio-potasio en el pico y dinámica de calcio aparece reflejada en el trabajo de Romero y colaboradores (2009). Debido a su importancia en los biomarcadores el estudio de Britton y colaboradores (2017) se centra en dicha bomba. Finalmente, la relevancia de la componente rápida de la corriente diferida de potasio y sus efectos sobre el APD₉₀ concuerdan con lo obtenido por Britton y colaboradores (2013).

6 CONCLUSIONES

En este trabajo final de máster se ha modelizado la mutación RyR2^{R4497C} basándose en los datos experimentales disponibles en la literatura científica sobre la dinámica de calcio. Para ello, se ha utilizado una herramienta de ajuste automático de parámetros que permite obtener el factor multiplicativo óptimo para el modelo de Markov del canal RyR.

También se ha adaptado un modelo existente de la mutación CASQ2(-/-) de la calsequestrina para reproducir los efectos de dicha mutación en miocitos ventriculares humanos.

Finalmente se ha desarrollado una población de modelos de miocitos ventriculares humanos en la que se han introducido las dos mutaciones modelizadas y se ha realizado una correlación para analizar la importancia de las principales corrientes de la membrana celular sobre los biomarcadores estudiados en ausencia y en presencia de las mutaciones modelizadas.

Para ello, se han llevado a cabo los siguientes objetivos secundarios:

1. *Modelizar la mutación RyR2^{R4497C} del canal RyR usando un modelo de miocito ventricular de humano.* Se ha desarrollado un modelo de esta mutación basándonos en los datos experimentales de Fernández-Velasco y colaboradores y usando la herramienta de ajuste utilizada por Moreno y colaboradores. Como resultado, se ha multiplicado por diez la velocidad de transición hacia el estado abierto del modelo de Markov del canal RyR.
2. *Adaptar el modelo existente de la mutación del tipo CASQ2(-/-) de la calsequestrina a un modelo de miocito ventricular de humano.* Se ha adaptado el modelo de mutación desarrollado por Yang y colaboradores definido en un modelo de conejo. Para reproducir el comportamiento de esta mutación se han reducido un 50% la concentración inicial y la derivada de la calsequestrina.
3. *Generar una población de modelos de cardiomiocitos ventriculares que reproduzca la variabilidad natural presente en los seres humanos.* Se ha generado una población de modelos de cardiomiocitos ventriculares modificando las principales corrientes de membrana de un modelo promedio. Para ello, se ha generado una distribución uniforme que modifique las conductancias de las corrientes en un rango de $\pm 100\%$, como Britton y sus colaboradores. Finalmente, la población de modelos se ha validado de manera que su APD₉₀ se encuentre dentro del rango fisiológico observado por O'Hara y sus colaboradores.
4. *Estudiar el efecto de la mutación RyR2R4497C del canal RyR y de la mutación del tipo CASQ2(-/-) de la calsequestrina en la generación de actividad eléctrica espontánea utilizando una población de modelos de cardiomiocitos ventriculares humanos.* Se han introducido las mutaciones modelizadas anteriormente en la población de modelos desarrollada. A continuación, se ha estudiado en cuántos modelos se produce actividad eléctrica espontánea y cuáles son las corrientes que más afectan a la generación de esta actividad.

5. *Estudio de los efectos de las principales corrientes de la membrana celular sobre los biomarcadores celulares relacionados con las mutaciones consideradas en este estudio.* Se ha realizado una correlación entre las conductancias de las corrientes y los biomarcadores estudiados (pico máximo, tiempo de pico y constante de recuperación del calcio intracelular y APD_{90}) utilizando la población de modelos generada previamente. Se ha observado que la bomba de sodio-potasio y la componente rápida de la corriente diferida de potasio son las que más influyen en los biomarcadores analizados.

7 LÍNEAS FUTURAS

El modelo actual está caracterizado para modelizar y simular las mutaciones RyR2^{R4497C} y CASQ2(-/-) causantes de la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica y observar su efecto en una población de modelos.

No obstante, el modelo es susceptible de admitir diversas modificaciones:

- Testear el efecto de fármacos como la flecainida, la lidocaína, la ranolazina y betabloqueantes.
- Modelizar otras mutaciones causantes de la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica.
- Realizar simulaciones en otras escalas, como a nivel de fibra, de tejido y de órgano. Mediante estas simulaciones también sería posible la obtención del ECG.

8 PUBLICACIONES

F. Escobar Ropero, M.A. Arnau Vives, E. Zorio Grima, J. Saiz, Rodríguez, L. Romero Pérez. Simulación del efecto de las mutaciones RyR2^{R4497C} y CASQ2(-/-) causantes de la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica utilizando una población de modelos de cardiomiocitos ventriculares humanos. XXXVII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica. (En fase de elaboración)

9 BIBLIOGRAFÍA

- Grandi, E., Pasqualini, F., & Bers, D. (2010). A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca transient. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology*, 48(1), 112-121. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.09.019
- Moreno, J., Yang, P., Bankston, J., Grandi, E., Bers, D., Kass, R., & Clancy, C. (2013). Ranolazine for Congenital and Acquired Late I Na -Linked Arrhythmias. *Circulation Research*, 113(7). doi: 10.1161/circresaha.113.301971
- Moreno JD, Lewis TJ, Clancy CE (2016) Parameterization for In-Silico Modeling of Ion Channel Interactions with Drugs. *PLoS ONE* 11(3): e0150761. doi:10.1371/journal.pone.0150761
- Yang, P., Moreno, J., Miyake, C., Vaughn-Behrens, S., Jeng, M., & Grandi, E. et al. (2015). In silicoprediction of drug therapy in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *The Journal Of Physiology*, 594(3), 567-593. doi: 10.1113/jp271282
- 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
- Raisman, J., & Gonzalez, A. M. (2013). Hipertextos del área de biología. Recuperado el 2 de junio de 2019 de <http://www.biologia.edu.ar/>
<https://www.itaca.edu.es/potencial-accion-cardiaco.htm>
- Montagud Balaguer, V. (2015). Arritmias. Recuperado el 15 de junio, 2018, from <http://www.fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/arritmias.html>
- Domingo, D. (2014). *Rasgos no ventriculares, clínicos y funcionales de la mutación RyR22R420Q causante de taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica*.
- Loewe, L. (2008) Genetic mutation. *Nature Education* 1(1):113
- Wang S, Trumble WR, Liao H, Wesson CR, Dunker AK, Kang CH (1998). "Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum". *Nat. Struct. Biol.* 5 (6): 476–83. doi:10.1038/nsb0698-476

- Bround MJ, Wambolt R, Luciani DS, Kulpa JE, Rodrigues B, Brownsey RW, Allard MF, Johnson JD (15 May 2013). "Cardiomyocyte ATP production, metabolic flexibility, and survival require calcium flux through cardiac ryanodine receptors in vivo". *Journal of Biological Chemistry*. 288 (26): 18975–86. doi:10.1074/jbc.M112.427062
- Soltis, A., & Saucerman, J. (2010). Synergy between CaMKII Substrates and β -Adrenergic Signaling in Regulation of Cardiac Myocyte Ca²⁺ Handling. *Biophysical Journal*, 99(7), 2038-2047. doi: 10.1016/j.bpj.2010.08.016
- 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>
- Stern, M. (1999). Local control models of cardiac excitation-contraction coupling. *The Rockefeller University Press*, 113, pp.469-489
- Britton, O., Bueno-Orovio, A., Van Ammel, K., Lu, H., Towart, R., Gallacher, D., & Rodriguez, B. (2013). Experimentally calibrated population of models predicts and explains intersubject variability in cardiac cellular electrophysiology. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 110(23), E2098-E2105. doi: 10.1073/pnas.1304382110
- Britton, O., Bueno-Orovio, A., Virág, L., Varró, A., & Rodriguez, B. (2017). The Electrogenic Na⁺/K⁺ Pump Is a Key Determinant of Repolarization Abnormality Susceptibility in Human Ventricular Cardiomyocytes: A Population-Based Simulation Study. *Frontiers In Physiology*, 8. doi: 10.3389/fphys.2017.00278
- Nelder J. A. and Mead R. A simplex method for function minimization. *The Computer Journal* (1965) 7 (4): 308-313 doi:10.1093/comjnl/7.4.308.
- El-Armouche, A. & Eschenhagen, T. *Heart Fail Rev* (2009) 14: 225. <https://doi.org/10.1007/s10741-008-9132-8>
- Ramay, H., Liu, O., & Sobie, E. (2011). Recovery of cardiac calcium release is controlled by sarcoplasmic reticulum refilling and ryanodine receptor sensitivity. *Cardiovascular Research*, 91(4), 598-605. doi: 10.1093/cvr/cvr143
- Thomas O'Hara, László Virág, András Varró, Yoram Rudy. Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation. *PLoS Comput Biol*. 2011 May; 7(5): e1002061. Published online 2011 May 26. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002061
- Fernández-Velasco, M., Rueda, A., Rizzi, N., Benitah, J., Colombi, B., & Napolitano, C. et al. (2009). Increased Ca²⁺ Sensitivity of the Ryanodine Receptor Mutant RyR2 R4496C Underlies Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation Research*, 104(2), 201-209. doi: 10.1161/circresaha.108.177493

Romero, L., Pueyo, E., Fink, M., & Rodríguez, B. (2009). Impact of ionic current variability on human ventricular cellular electrophysiology. *American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology*, 297(4), H1436-H1445. doi: 10.1152/ajpheart.00263.2009

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 Roper: Estudiante del Master Universitario de Ingeniería Biomédica. Responsable de la realización del estudio.

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	500	15.00	7500
Doctora Ingeniera	50	25.00	1250
SUBTOTAL			8750

Tabla 3: Desglose de los costes de mano de obra del trabajo.

El coste total de la mano de obra es de **ocho mil setecientos cincuenta euros** (8750 €)

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, copia de seguridad y almacenamiento 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	7	104.45
Portátil HP OMEN	1	849.99	60	7	99.17
Disco duro My Passport 4 Tb	1	80	96	7	5.83
SUBTOTAL					209.45

Tabla 4: 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 **doscientos nueve euros con cuarenta y cinco céntimos** (209.45 €)

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.
- Eclipse Neon (The Eclipse Foundation): Entorno de desarrollo gratuito para programación en C/C++
- Microsoft Office 365 (Microsoft Corporation, Redmond (WA), EEUU): Suite ofimática empleada para redactar los documentos de la memoria.
- BigML: Software online para el tratamiento y análisis de datos.

Descripción	Cantidad	Coste (€) sin IVA	Duración licencia (meses)	Tiempo de uso (meses)	Coste imputable (€) sin IVA
Windows 10	1	0	De por vida	7	0
Matlab R2019a	1	800	12	7	466.67
Eclipse Neon	1	0	De por vida	7	0
Microsoft Office 365	1	57.02	12	7	33.26
BigML	1	0	De por vida	7	
SUBTOTAL					499.93

Tabla 5: 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 **cuatrocientos noventa y nueve euros con noventa y tres céntimos** (499.93 €).

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	9459.38	11445.85
Gastos generales	1513.50	1831.34
Beneficio industrial	567.56	567.56
TOTAL	7020.62	13844.75

Tabla 6: Coste total del trabajo

El presupuesto total del proyecto es de **trece mil ochocientos cuarenta y cuatro euros con setenta y cinco céntimos** (13844.75 €)