UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MATHEUS LEONARDO ALVES DE CAMARGO

CONTRIBUIÇÕES DA MODELAGEM MATEMÁTICA PARA ESTUDO DO MECANISMO DE CONTRAÇÃO EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE ROEDORES EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

MOGI DAS CRUZES
2025

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MATHEUS LEONARDO ALVES DE CAMARGO

CONTRIBUIÇÕES DA MODELAGEM MATEMÁTICA PARA ESTUDO DO MECANISMO DE CONTRAÇÃO EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE ROEDORES EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Biomédica.
Área de concentração: Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Robson Rodrigues da Silva

MOGI DAS CRUZES
2025

FINANCIAMENTO





Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

C173c

Camargo, Matheus Leonardo Alves de
Contribuições da modelagem matemática para estudo do mecanismo de contração em miócitos ventriculares de roedores em condições fisiológicas / Matheus Leonardo Alves de Camargo. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
277 f. : il.

Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Robson Rodrigues da Silva.

1. Contração Miocárdia 2. Sarcômeros 3. Miofibrilas 4. Células musculares 5. Análise de variância I. Silva, Robson Rodrigues da II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 574.19285

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia vinte e três de maio de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese intitulada "MODELAGEM MATEMÁTICA E SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DO MECANISMO DE CONTRAÇÃO EM MIÓCITO VENTRICULAR DE ROEDORES EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS". para obtenção do grau de doutor(a) pelo(a) candidato(a) **Matheus Leonardo Alves de Camargo.** Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 72 (setenta e dois), a saber: 36 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da tese, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de doutor(a). A comissão examinadora foi constituída pelos senhores professores doutores: Robson Rodrigues da Silva, Terigi Augusto Scardovelli e Daniel Gustavo Goroso, da Universidade de Mogi das Cruzes, Jean Jacques Bonvent e Diogo Coutinho Soriano da Universidade Federal do ABC (UFABC), sob a presidência do primeiro como orientador do(a) aluno(a). A sessão pública da defesa da tese foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir, a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO (aprovado(a) /reprovado(a)) por UNANIMIDADE (unanimidade/maioria).

Mogi das Cruzes, 23 de maio de 2025.

Comissão Examinadora	Julgamento
gov.br Documento assinado digitalmente DANIEL GUSTAVO GOROSO Data: 26/05/2025 11:26:47-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br Prof. Dr. Daniel Gustavo Goroso	APROVADO (aprovado(a)/reprovado(a))
gov.br Documento assinado digitalmente DIOGO COUTINHO SORIANO Data: 26/05/2025 10:11:14-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br Prof. Dr. Diogo Coutinho Soriano	APROVADO (aprovado(a)/reprovado(a))
gov.br Documento assinado digitalmente TERIGI AUGUSTO SCARDOVELLI Data: 27/05/2025 14:53:11-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br Prof. Dr. Terigi Augusto Scardovelli	APROVADO (aprovado(a)/reprovado(a))
gov.br Documento assinado digitalmente JEAN JACQUES BONVENT Data: 26/05/2025 11:08:14-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br Prof. Dr. Jean Jacques Bonvent	APROVADO (aprovado(a)/reprovado(a))
Assinado digitalmente por: Robson Rodrigues da Silva Data: 2025.05.27 15:45:09 -0300 Prof. Dr. Robson Rodrigues da Silva	APROVADO (aprovado(a)/reprovado(a))

UMC
UNIVERSIDADE

Tel.: (11) 4798-7000
0800 19 2001
www.umc.br

ADENDO

ADENDO À ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia vinte e três de maio de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese intitulada: "MODELAGEM MATEMÁTICA E SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DO MECANISMO DE CONTRAÇÃO EM MIÓCITO VENTRICULAR DE ROEDORES EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS" pelo(a) candidato(a) **Matheus Leonardo Alves de Camargo,** para obtenção do grau de doutor(a) em Engenharia Biomédica.

Em adendo, informo que a banca sugeriu alteração no título da tese, que foi acatada pelo(a) candidato(a). Portanto o título correto é: "CONTRIBUIÇÕES DA MODELAGEM MATEMÁTICA PARA ESTUDO DO MECANISMO DE CONTRAÇÃO EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE ROEDORES EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS".

Mogi das Cruzes, 27 de maio de 2025.

Prof. Dr. Fabiano Bezerra Menegidio
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Dedico este trabalho à minha família, que me apoiou em todas as fases da minha vida até aqui, e especialmente à minha irmã, Lara Melissa Alves de Camargo, que foi uma luz em nossas vidas durante os anos em que esteve entre nós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas e professores do Núcleo de Pesquisas Tecnológicas (NPT/UMC) que contribuíram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial aos amigos que fiz durante minha trajetória: Luan de Almeida Moura, Mariana da Palma Valério, Higor Barreto Campos, Yasmim Fernandes Moniz, Bruno Toshio Gomes Gunji, André Roberto Fernandes da Silva e Leticia Araujo Rios.

À minha família, pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas e pelo incentivo constante.

Ao Prof. Dr. Robson Rodrigues da Silva, por sua orientação excepcional, pela organização das atividades e pela compreensão dos desafios inerentes a esse tipo de pesquisa, além da paciência e dedicação em me instruir ao longo do processo.

Ao Prof. Dr. Jose Luis Puglisi, que, durante minha estadia nos EUA para o Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, me acolheu e proporcionou uma experiência enriquecedora, oferecendo suporte e aprendizados que levarei para toda a vida.

Ao Prof. Dr. Daisuke Sato, que me recebeu calorosamente nos laboratórios da UC Davis, possibilitou minha participação em eventos científicos e contribuiu com ideias valiosas para o avanço da minha pesquisa.

Aos professores Dr. José W. M. Bassani e Dra. Rosana A. Bassani, pelas valiosas correções e observações nos trabalhos científicos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 através da bolsa de doutorado (código de financiamento: 88887.627770/2021-00).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2016/18422-7.

RESUMO

A contração cardíaca tem início nos sarcômeros, estruturas que abrigam os miofilamentos de actina e miosina. A interação do cálcio (Ca^{2+}) com a troponina C (TnC) resulta na formação de pontes-cruzadas (PTC's) entre esses filamentos. Esse processo começou a ser descrito matematicamente com os trabalhos de Hill (1938) e Huxley (1957). A partir dessas bases, diversos modelos foram desenvolvidos, abordando o fenômeno de forma bioquímica, mecânica e com variações entre espécies. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo modelo para miócitos ventriculares de roedores, capaz de simular contrações isométricas em diferentes temperaturas. Para isso, várias etapas foram realizadas, resultando em quatro artigos. Foram comparados cinco modelos de contração miocárdica — Rice *et al.* (1999) (R99), Rice *et al.* (2008) (R08), Negroni e Lascano (1996) (NL96), Negroni e Lascano (2008) (NL08) e Negroni *et al.* (2015) (N15) — avaliando suas respostas em contrações isosarcométricas geradas por uma concentração paramétrica de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]_i$), além da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} e da influência do comprimento do sarcômero. A análise mostrou que modelos mais recentes apresentam maior aderência aos dados experimentais e destacam a necessidade de parâmetros ajustáveis para diferentes espécies. A ferramenta ForceLAB foi desenvolvida com o intuito de comparar os modelos R99 e NL08 acoplados a um modelo para miócito ventricular de camundongo. Neste trabalho, uma versão aprimorada da ferramenta foi criada, incorporando novas funcionalidades para simulações computacionais. Usando essa ferramenta, testou-se a influência das constantes de cooperatividade na formação de PTCs vizinhas no modelo R99, na ausência de paralelismo entre as curvas de força versus pCa (logaritmo negativo da $[Ca^{2+}]_i$). Os resultados indicaram que as constantes de cooperatividade não influenciaram a formação de PTCs vizinhas. Investigou-se como alterações nas constantes de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}) do Ca^{2+} com a TnC afetam $[Ca^{2+}]_i$ e a força de contração em miócitos ventriculares de camundongo, por meio de acoplamento bidirecional dos modelos de Morotti *et al.* (2014) e Negroni *et al.* (2015). Os resultados mostraram que o aumento da afinidade de TnC por Ca^{2+} (reduzindo o valor de $K_d = k_{off}/k_{on}$) leva a uma maior amplitude de contração, mas menor amplitude de $[Ca^{2+}]_i$, enquanto a redução da afinidade resulta no efeito oposto. Além disso, essas alterações deslocaram a curva de força versus pCa, destacando que a modulação da contração depende principalmente das cinéticas da interação Ca^{2+}-TnC, independentemente do modelo eletrofisiológico utilizado. Por fim, desenvolveu-se um novo modelo que incorpora o coeficiente Q_{10} para simular a dinâmica dos miofilamentos e a contração em função da temperatura. O modelo foi calibrado com dados experimentais de Janssen *et al.* (2002) e demonstrou que, em temperaturas fisiológicas, a cinética dos miofilamentos se torna o principal fator limitante do relaxamento, enquanto, em temperaturas subfisiológicas, a remoção do Ca^{2+} do citosol é predominante. O modelo reproduziu com sucesso o comportamento não linear da força desenvolvida em diferentes temperaturas e a relação entre temperatura e sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}, alinhando-se com os dados experimentais.

Palavras-chave: modelagem matemática; contração cardíaca; miócito ventricular; miofilamentos; ferramenta computacional.

ABSTRACT

Cardiac contraction begins in the sarcomeres, structures that house the actin and myosin myofilaments. The interaction of calcium (Ca^{2+}) with troponin C (TnC) results in the formation of cross-bridges (CB's) between these filaments. This process was first described mathematically through the works of Hill (1938) and Huxley (1957). Based on these foundations, several models have been developed, addressing the phenomenon from biochemical, mechanical, and species-specific perspectives. The objective of this study was to develop a new model for ventricular myocytes from rodents, capable of simulating isometric contractions at different temperatures. To achieve this, several steps were taken, resulting in four papers. Five myocardial contraction models were compared — Rice *et al.* (1999) (R99), Rice *et al.* (2008) (R08), Negroni & Lascano (1996) (NL96), Negroni & Lascano (2008) (NL08), and Negroni *et al.* (2015) (N15) — evaluating their responses in isosarcometric contractions induced by a parametric cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$), along with the sensitivity of the myofilaments to Ca^{2+} and the influence of sarcomere length. The analysis showed that newer models have better adherence to experimental data and highlight the need for adjustable parameters for different species. The ForceLAB tool was developed to compare the R99 and NL08 models coupled to a ventricular myocyte model of a mouse. In this study, an improved version of the tool was created, incorporating new features for computational simulations. Using this tool, the influence of cooperativity constants on the formation of neighboring PTCs in the R99 model was tested, in the absence of parallelism between the force versus pCa curves (negative logarithm of $[Ca^{2+}]_i$). The results indicated that the cooperativity constants did not influence the formation of neighboring PTCs. The effect of alterations in the association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) constants of Ca^{2+} with TnC on $[Ca^{2+}]_i$ and contraction force in mouse ventricular myocytes was investigated through bidirectional coupling of the models by Morotti *et al.* (2014) and Negroni *et al.* (2015). The results showed that an increase in TnC's affinity for Ca^{2+} (reducing the $K_d = k_{off}/k_{on}$ value) leads to greater contraction amplitude, but a smaller amplitude of $[Ca^{2+}]_i$, whereas a decrease in affinity has the opposite effect. Furthermore, these changes caused shifts in the force vs. pCa curve, emphasizing that contraction modulation is mainly dependent on the kinetics of the Ca^{2+}-TnC interaction, regardless of the electrophysiological model used. Finally, a new model was developed incorporating the Q_{10} coefficient to simulate myofilament dynamics and contraction as a function of temperature. The model was calibrated with experimental data from Janssen *et al.* (2002) and demonstrated that, at physiological temperatures, myofilament kinetics become the primary limiting factor for relaxation, while at subphysiological temperatures, the removal of Ca^{2+} from the cytosol predominates. The model successfully reproduced the nonlinear behavior of the developed force at different temperatures and the relationship between temperature and myofilament sensitivity to Ca^{2+}, aligning with experimental data.

Keywords: mathematical modeling; cardiac contraction; ventricular myocyte; myofilaments; computational tool; temperature.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Principais modelos para força de contração organizados cronologicamente com uma breve descrição de cada um. 29

Figura 1 – Simulação da força desenvolvida obtida a partir do modelo de Morotti *et al.* (2021) com frequência variando na faixa de 1Hz a 10 Hz. 17
Figura 2 – Curvas características do PA nas diferentes células cardíacas. 21
Figura 3 – Diferenças entre o PA e as correntes iônicas de humano e camundongo. 22
Figura 4 – Processo de acoplamento excitação-contração. As fases descritas no texto possuem correspondência na ilustração. 24
Figura 5 – Dinâmica dos miofilamentos: processo de contração através dos filamentos de actina e miosina. 24
Figura 6 – Esquema básico para a termópila apresentado no trabalho de Hill (1913). 26
Figura 7 – Esquema ilustrando a teoria proposta por Huxley (1957) para o deslizamento dos filamentos para geração da força de contração.....27
Figura 8 – Esquema que ilustra uma unidade muscular de comprimento L (metade do comprimento do sarcômero).....36
Figura 9 – Esquema que apresenta os elementos que definem o alongamento da PTC. 37
Figura 10 – Diagrama de estados do modelo de Negroni e Lascano (1996). 38
Figura 11 – Indicação da região efetiva para formação de PTC's. 39
Figura 12 – Esquema para o novo modelo de PTC's. 41
Figura 13 – Modelo NL08. 43
Figura 14 – Unidade muscular composta por meio comprimento do sarcômero (L) composto de filamentos espesso e fino em paralelo com um elemento elástico. 46
Figura 15 – Modelo N15. 47
Figura 16 – Descrição do Modelo R99. 50
Figura 17 – Descrição do Modelo R08. 54
Figura 18 – Resumo das etapas realizadas no trabalho. 159

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CICR – Liberação de Cálcio Induzida por Cálcio (em inglês: *"Calcium Induced Calcium Release"*

ForceLAB – Laboratório Virtual de Força de Contração de Miócito Cardíaco

NL08 – Modelo matemático para força de contração apresentado no trabalho de Negroni e Lascano (2008)

N15 – Modelo matemático para força de contração apresentado no trabalho de Negroni e Lascano (2015)

NL96 – Modelo matemático para força de contração apresentado no trabalho de Negroni e Lascano (1996)

MB13 – Modelos matemático elétrico para miócito ventricular de camundongo descrito no trabalho de Mullins e Bondarenko (2013)

PA – Potencial de Ação

R08 – Modelo matemático para força de contração apresentado no trabalho de Rice *et al.* (2008)

R99 – Modelo matemático para força de contração apresentado no trabalho de Rice *et al.* (1999)

SERCA – Bomba Ca^{2+}-ATPase do RS

UMC – Universidade de Mogi das Cruzes

WHO – Organização Mundial de Saúde (em inglês: *"World Health Organization")*

SUMÁRIO

1 Introdução 12

1.1 Apresentação 12

1.2 Justificativa 14

2 Objetivos 18

2.1 Objetivo geral 18

2.2 Objetivos específicos 18

3 Escopo 19

4 Fundamentação teórica 20

4.1 Potencial de Ação 20

4.2 Acoplamento Excitação-Contração 22

5 Estado da Arte 25

5.1 Primeiras modelagens da contração muscular 25

5.1.1 Modelo reológico de Hill (1938) 25

5.1.2 Modelo para a contração muscular de Huxley (1957) 27

5.2 Principais modelos para força de contração 28

5.3 Os modelos de Negroni e colaboradores 35

5.3.1 Negroni e Lascano (1996) – NL96 35

5.3.2 Negroni e Lascano (2008) – NL08 41

5.3.3 Negroni *et al.* (2015) – N15 45

5.4 Os modelos de rice e colaboradores 49

5.4.1 Rice *et al.* (1999) – R99 49

5.4.2 Rice *et al.* (2008) – R08 53

6 Produção Científica 58

6.1 Revisão e comparação de modelos para dinâmica dos miofilamentos 60

6.2 Atualização do ForceLAB 113

6.3 Estudo de sensibilidade dos miofilamentos 122

6.4 Novo modelo proposto 128

7 Considerações Finais 158

7.1 Discussão 158

7.2 Conclusão 161

7.3 Impactos e Trabalhos Futuros 162

Referências 164

Anexo A: Certificado de participação do claib & cbeb 2022 179

Anexo B: Registro do software ForceLAB 181
Anexo C: Carta convite do PROF. Dr. Donald Bers 183
Anexo D: Certificado de participação do CBEB 2024 185
Anexo E: Menção honrosa do CBEB 2024 187
Apêndice A: Artigo de Revisão e Comparação dos Modelos de Rice e Negroni 189
Apêndice B: Artigo da Atualização do ForceLAB 239
Apêndice C: Artigo do Teste do Acoplamento Bidirecional 242
Apêndice D: artigo de Apresentação do Novo Modelo 245
Apêndice E: artigo em colaboração 276

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. No ano de 2019 foram cerca de 17,9 milhões de óbitos, correspondendo a 32% das mortes globais, sendo 85% por ataques cardíacos e infartos (WHO, 2017). Esclarecer os mecanismos da contração cardíaca é uma tarefa crucial para elucidar a gênese de diversas doenças cardíacas.

A principal função do coração é bombear o sangue para que este circule pelo corpo. Esse processo ocorre principalmente por conta da contração exercida pelas células que compõem o coração. Esses cardiomiócitos estão agrupados em densas estruturas conhecidas como sarcômeros (NIEDERER; CAMPBELL; CAMPBELL, 2019). O sarcômero é composto por proteínas entrelaçadas que têm a função de atuar na força ativa e passiva do músculo. As duas principais proteínas são a actina e a miosina que compõem, respectivamente, os filamentos fino e espesso (RASSIER, 2017). A ligação actina-miosina forma estruturas conhecidas como pontes-cruzadas (PTC's) que permitem que os filamentos deslizem para gerar a contração (STERN; LAKATTA, 1992). Todo esse processo só é possível devido à entrada de íons de cálcio (Ca^{2+}) pelo canal do tipo L durante o Potencial de Ação (PA) que induz a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) (Calcium Induced Calcium Release - CICR). A quantidade de Ca^{2+} no interior da célula ($[Ca^{2+}]_i$) eleva-se permitindo com que ocorram ligações entre Ca^{2+} e a Troponina C (TnC), o que desencadeia a formação de PTC's (BERS, 2002). Entender esse processo de forma quantitativa tem sido o alvo de diversos pesquisadores desde que as teorias para contração de Huxley de 1957 e 1974 foram publicadas e fomentaram essa área (HUXLEY, 1957, 1974).

Antes mesmo da ideia das PTC's os trabalhos de Hill de 1938 traziam um modelo reológico da contração através de estudos com o tecido muscular que abordaram variáveis como gasto energético, velocidade de encurtamento, trabalho mecânico e força da contração (HILL, 1938). Mas, foi em 1957 que a modelagem matemática da contração muscular teve seu grande marco com as teorias desenvolvidas por Huxley que formulou o seguinte: a força de contração é proporcional ao número de PTC's formadas (HUXLEY, 1957, 1974).

Partindo dessa premissa surgem diversas formas de modelar esse fenômeno. Uma delas é a abordagem bioquímica que descreve a contração como resultado de interações energéticas das proteínas contráteis como troponina, actina, miosina, tropomiosina e titina. Alguns dos principais modelos com essa abordagem são os de Lymn e Taylor (1971), Eisenberg *et al.* (1980) e Mijailovich; Fredberg e Butler (1996). Os trabalhos de Gray e Gonda (1977a, b) trazem uma abordagem do fenômeno utilizando as teorias de mecânica quântica o que demonstra o quão plural pode ser a modelagem da contração muscular. Os modelos também passaram a abordar diferentes espécies como porquinho da Índia (NOBLE *et al.*, 1998), furão (YUE, 1987), coelho (PETERSON; HUNTER; BERMAN, 1991), caninos (BURKHOFF, 1994), rato (MCCABE *et al.*, 2020), sapo (ZAHALAK, 1981) e muitos deles tem apenas a preocupação de estudar o fenômeno independente de espécie (IZAKOV *et al.*, 1991; PANERAI, 1980).

Os modelos animais mais utilizados na pesquisa sobre contração cardíaca são os de pequenos mamíferos, especialmente os roedores. Essa escolha se deve, principalmente, às semelhanças fisiológicas entre esses animais e os seres humanos, embora também haja diferenças conhecidas que podem ser identificadas com relativa facilidade (MOROTTI *et al.*, 2021). Algumas diferenças relevantes dizem respeito à estrutura do sistema cardiovascular, como a presença de uma artéria coronária principal superficial em humanos, enquanto, nos roedores, ela se encontra integrada ao miocárdio (JOUKAR, 2021). Também há distinções entre o PA de humanos e roedores: embora ambos apresentem uma fase de despolarização rápida, a repolarização ocorre de maneira distinta devido à atuação das correntes iônicas. Por exemplo, a corrente de Ca^{2+} do tipo L tem papel mais expressivo na repolarização em humanos, ao passo que, nos roedores, correntes rápidas de potássio contribuem para a ausência da fase de platô nos PA's (KAESE; VERHEULE, 2012). O transiente de Ca^{2+} também varia entre espécies, principalmente devido à sensibilidade dos receptores de rianodina, que depende do porte do animal e da frequência de estimulação — geralmente mais elevada em roedores (EDWARDS; LOUCH, 2017). Embora existam diferenças marcantes entre humanos e roedores, o uso destes animais tem se tornado cada vez mais comum na pesquisa, em parte devido ao aumento dos custos associados ao uso de espécies maiores e às questões éticas envolvidas na utilização de animais como cães (ODENING *et al.*, 2021). Outro fator relevante é que, mesmo com as diferenças citadas, estudos com roedores — como

camundongos, por exemplo — conseguem reproduzir de forma fiel arritmias cardíacas, como cardiomiopatias hereditárias e canalopatias observadas em humanos, possibilitando a investigação dessas doenças e de seus tratamentos (BLACKWELL *et al.*, 2022).

Dada a complexidade envolvida na fisiologia da contração cardíaca, independentemente da espécie utilizada, a modelagem matemática e computacional tem se consolidado como uma ferramenta indispensável para a investigação quantitativa desses processos. Através da simulação computacional, é possível representar desde mecanismos moleculares de formação de pontes cruzadas até dinâmicas eletromecânicas de todo o miocárdio. Além de permitir a formulação e o teste de hipóteses fisiológicas, os modelos oferecem a possibilidade de explorar condições patológicas, prever respostas a fármacos e avaliar intervenções clínicas de forma não invasiva (NIEDERER; LUMENS; TRAYANOVA, 2019; PATHMANATHAN; GRAY, 2018).

Um dos principais conceitos que orientam o uso de modelos animais é o “princípio dos 3Rs”, que visa reduzir, substituir e aperfeiçoar o uso desses modelos em pesquisas científicas (TOMEK *et al.*, 2025). Uma das formas mais promissoras de atingir esse objetivo é por meio de simulações computacionais, que permitem a substituição parcial de experimentos com animais. Um exemplo notável da aplicação desse conceito está no trabalho de Morotti *et al.* (2021), que desenvolveu tradutores de espécies baseados em modelos computacionais, capazes de mapear as diferenças entre modelos de camundongos, coelhos e humanos. Esses tradutores possibilitam que modelos animais sejam usados de forma mais eficaz na extrapolação de resultados para humanos.

Nos últimos anos, os avanços computacionais têm impulsionado o desenvolvimento de modelos mais rápidos e personalizados. Essas novas abordagens mostram que a modelagem computacional não apenas complementa a investigação experimental, mas também amplia significativamente a capacidade de compreender e prever os mecanismos fisiológicos e patológicos do coração.

1.2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços significativos na modelagem da contração cardíaca, ainda existem limitações importantes nos modelos atuais. Muitos deles não incorporam de

forma integrada a influência da temperatura na cinética dos miofilamentos, tratando seus efeitos apenas na dinâmica elétrica dos miócitos (MOROTTI *et al.*, 2014). Isso gera uma lacuna importante, sobretudo quando se busca simular condições fisiológicas realistas, como as encontradas em roedores a temperaturas normotérmicas (~37 °C) e sob diferentes frequências de estimulação. A ausência de mecanismos termossensíveis acoplados aos miofilamentos compromete a capacidade preditiva desses modelos em cenários onde há aumento da demanda metabólica, como no caso de batimentos cardíacos em alta frequência (NIEDERER; LUMENS; TRAYANOVA, 2019).

Diante dessa limitação, é fundamental que os modelos matemáticos para contração cardíaca sejam continuamente avaliados e atualizados, especialmente considerando a ampla variedade de abordagens disponíveis. É importante entender que o papel desses modelos é servir como ferramentas para compreensão e reprodução do fenômeno da contração cardíaca independentemente da complexidade (PUGLISI; WANG; BERS, 2004).

Dentre os modelos mais difundidos para descrever a contração cardíaca, destacam-se os de Negroni e Lascano (1996) (NL96), Negroni e Lascano (2008) (NL08), Negroni *et al.* (2015) (N15), Rice *et al.* (1999) (R99) e Rice *et al.* (2008) (R08). Esses modelos têm sido amplamente utilizados em diversas aplicações que evidenciam sua relevância para a compreensão da fisiologia cardíaca e suas adaptações patológicas. Entre os usos reportados na literatura, destacam-se:

- **NL96:** aplicado por Pironet *et al.* (2013) em um modelo multiescala do sistema cardiovascular, com o intuito de estudar a dependência de carga da relação pressão-volume ao final da sístole;
- **R99 e NL96:** utilizados por Coutu e Metzger (2005) para investigar os efeitos da expressão induzida do gene parvalbumina e da superexpressão do gene SERCA2a sobre as taxas de relaxamento miocárdico;
- **R99:** utilizado como base para o desenvolvimento de um modelo expandido de contração de miócitos ventriculares de camundongos com sinalização β1-adrenérgica, possibilitando simulações dos efeitos de fármacos como 4-aminopiridina e tedisamila (MULLINS; BONDARENKO, 2019);
- **R08:** foi reparametrizado e integrado ao modelo eletrofisiológico de Paci *et al.* (2020) para criar um modelo computacional eletromecânico de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes humanas (hiPSC-CMs),

possibilitando a simulação de marcadores contráteis, efeitos inotrópicos e respostas a fármacos como Verapamil e Bay-K 8644 (FORUZANDEHMEHR *et al.,* 2021);

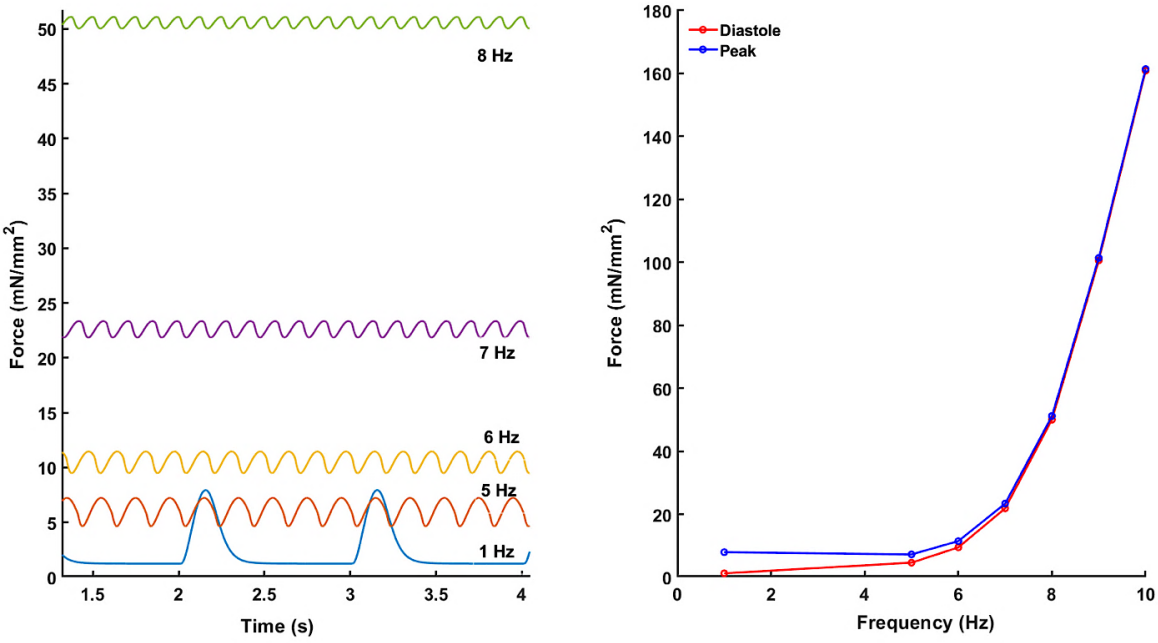
- **NL08 e N15:** foram empregados no desenvolvimento de um novo modelo de contração do músculo cardíaco que integra aspectos bioquímicos e biofísicos da ativação por Ca^{2+}, geração de força e consumo de ATP. Esse modelo reproduz respostas mecânicas em modos isométrico e isotônico, além de representar cerca de 60% do consumo total de ATP em um modelo de célula ventricular (MUANGKRAM *et al.*, 2017).

Em um trabalho anterior realizado por nosso grupo no Laboratório de Modelagem Matemática da Eletrofisiologia Cardíaca (LABMMEC), vinculado ao Núcleo de Pesquisas Tecnológicas (NPT) da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), dois desses modelos (NL08 e R99) foram analisados por Silva *et al.* (2021) por meio do acoplamento com o modelo elétrico de miócito ventricular de camundongo de Mullins e Bondarenko (2013) (MB13), com o objetivo de avaliar seu comportamento diante dos mesmos estímulos elétricos e transientes de Ca^{2+}. Utilizando a ferramenta ForceLAB, os modelos foram comparados por meio de simulações computacionais.

Como continuidade desse trabalho, analisaram-se os modelos mais recentes (R08 e N15) dos mesmos autores (Rice e Negroni), com o objetivo de verificar quais características foram mantidas ou aprimoradas. A partir dessa comparação, buscou-se identificar o modelo de cinética dos miofilamentos mais adequado para servir como base na construção de um novo modelo de contração. Esse novo modelo teria como principal diferencial a capacidade de simular a contração isométrica em miócitos ventriculares de roedores em condições fisiológicas.

Inicialmente, foram realizados testes para verificar o comportamento dos modelos em altas frequências, como as observadas fisiologicamente em roedores, constatando-se um problema na fase diastólica da força isométrica, como ilustrado na Figura 1. Por outro lado, os testes com alterações nos parâmetros dos modelos para simular variações de temperatura apresentaram resultados iniciais promissores. Diante disso, estabeleceu-se como objetivo a calibração do modelo selecionado com base em dados experimentais de força isométrica em diferentes temperaturas. Essa proposta visa incorporar o efeito da temperatura à cinética dos miofilamentos — um aspecto ainda pouco explorado nos modelos atualmente disponíveis.

Figura 1 – Simulação da força desenvolvida obtida a partir do modelo de Morotti *et al.* (2021) com frequência variando na faixa de 1Hz a 10 Hz.



Para integrar a parte mecânica à elétrica da eletrofisiologia de miócitos ventriculares, foi selecionado o modelo de Morotti *et al.* (2014), desenvolvido para miócitos ventriculares de camundongo, com o objetivo de gerar o PA, uma vez que esse modelo já contempla, em seus parâmetros, a influência da temperatura. Dessa forma, o modelo de cinética dos miofilamentos escolhido na comparação entre os modelos de Rice e Negroni será acoplado de forma bidirecional ao modelo de Morotti *et al.* (2014). O modelo resultante será calibrado para reproduzir dados experimentais de força isométrica em ratos, conforme os resultados de Janssen *et al.* (2002). Essa calibração é viável devido às semelhanças observadas na eletrofisiologia e na mecânica cardíaca entre diferentes espécies de roedores (EDWARDS; LOUCH, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um novo modelo matemático que descreva o processo de força de contração do miócito ventricular de roedores incluindo a dinâmica dos miofilamentos e a ativação através da ligação Ca^{2+}-TnC em condições fisiológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I) Revisar os modelos R99, R08, NL96, NL08 e N15, comparando-os por meio de testes *in silico*, e selecionar aquele que servirá como base para a nova proposta de modelagem;
II) Atualizar e aprimorar a ferramenta ForceLAB, tornando-a uma plataforma computacional capaz de facilitar as simulações do novo modelo e dos modelos revisados;
III) Realizar testes *in silico* do acoplamento bidirecional entre o modelo de cinética dos miofilamentos selecionado (entre os modelos de Negroni e Rice) e o modelo de miócito ventricular de camundongo proposto por Morotti *et al.* (2014);
IV) Desenvolver e validar um novo modelo de contração para roedores, capaz de simular o processo contrátil em diferentes faixas de temperatura, incluindo a fisiológica.

3 ESCOPO

Neste capítulo é apresentada uma breve descrição do que será abordado em cada um dos capítulos posteriores.

No Capítulo 4, é realizada uma revisão da literatura sobre a contração de miócitos cardíacos, fornecendo o embasamento teórico necessário para a compreensão dos fenômenos envolvidos.

O Capítulo 5 apresenta, em ordem cronológica, os principais modelos matemáticos utilizados para a descrição da contração de células musculares. Em seguida, um quadro comparativo sintetiza aqueles aplicados especificamente a miócitos cardíacos.

O Capítulo 6 apresenta a produção científica gerada ao longo do trabalho.

No Capítulo 7, a discussão dos resultados sintetiza as principais contribuições do trabalho, analisando criticamente os achados e seu impacto no campo da modelagem da contração cardíaca. São apresentadas as conclusões da tese, resumindo os principais avanços obtidos em cada artigo e destacando as inovações propostas. Por fim, são discutidos os impactos do estudo na comunidade científica e apresentadas as perspectivas para trabalhos futuros, indicando possíveis desdobramentos e aplicações da pesquisa.

No final do documento, são listadas as referências bibliográficas, seguidas pelos anexos, que contêm documentos suplementares relacionados aos artigos apresentados ao longo do trabalho.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 POTENCIAL DE AÇÃO

Para que ocorra o fenômeno da contração cardíaca é necessário um estímulo elétrico conhecido como Potencial de Ação (PA). Para que ocorra o PA é necessária uma troca de íons entre o meio externo e interno da célula cardíaca (WILLIAMS; MIRAMS, 2015). Isso acontece através da membrana celular que possui os chamados canais iônicos que possuem permeabilidade seletiva a certos tipos de íons como os de potássio (K^+), sódio (Na^+) ou Ca^{2+} (GARCIA-ELIAS; BENITO, 2018). Nas condições que antecedem um PA a membrana encontra-se no estado de equilíbrio, principalmente por conta dos íons de K^+ (SCHWARTZ *et al.*, 2020). Em células cardíacas humanas esse potencial de equilíbrio é de aproximadamente -90mV (GARG *et al.*, 2018). O processo do PA é dividido em 5 fases que dependendo da região do coração podem ocorrer ou não (ALDAY *et al.*, 2014). As fases de um PA são as seguintes:

Fase 0: conhecida como fase de despolarização rápida. Ocorre por conta da abertura dos canais de Na^+ que fazem o potencial da membrana ficar positivo por conta do influxo de Na^+;

Fase 1: é a fase da repolarização inicial, onde os canais de Na^+ se fecham e se abrem os de K^+, causando um efluxo desse íon e uma rápida queda no potencial;

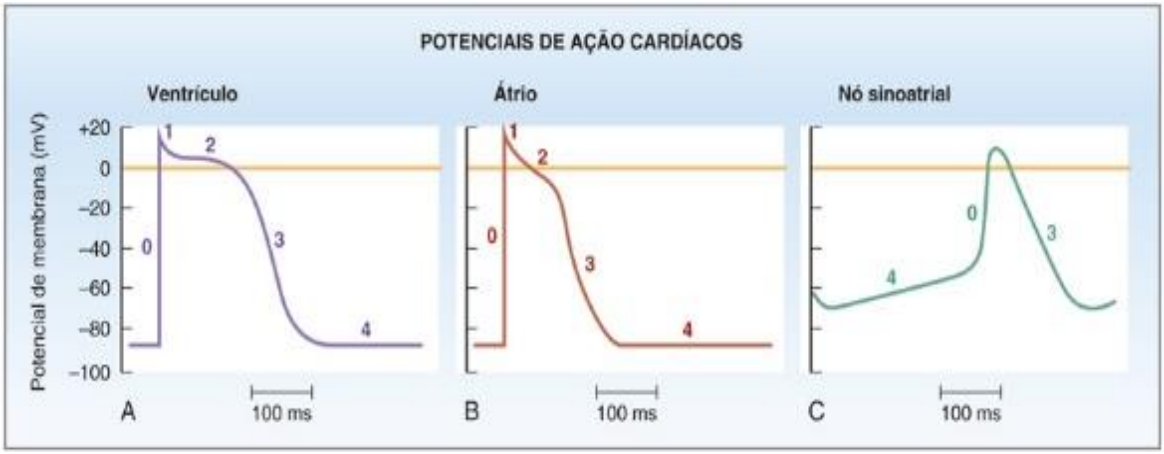
Fase 2: fase do “platô” onde o potencial se mantém constante por um período por conta do influxo de Ca^{2+} e pelo efluxo de K^+ que se equilibram;

Fase 3: fase da repolarização rápida, onde diminui o influxo de Ca^{2+} e os canais de K^+ podem então diminuir o potencial para o equilíbrio;

Fase 4: o potencial atinge o equilíbrio que é quase igual ao dos íons de K^+, pois são os responsáveis por manter a membrana nessas condições (SCHWARTZ *et al.*, 2020).

A Figura 2 ilustra as fases do PA e onde ocorrem dependendo da região do coração:

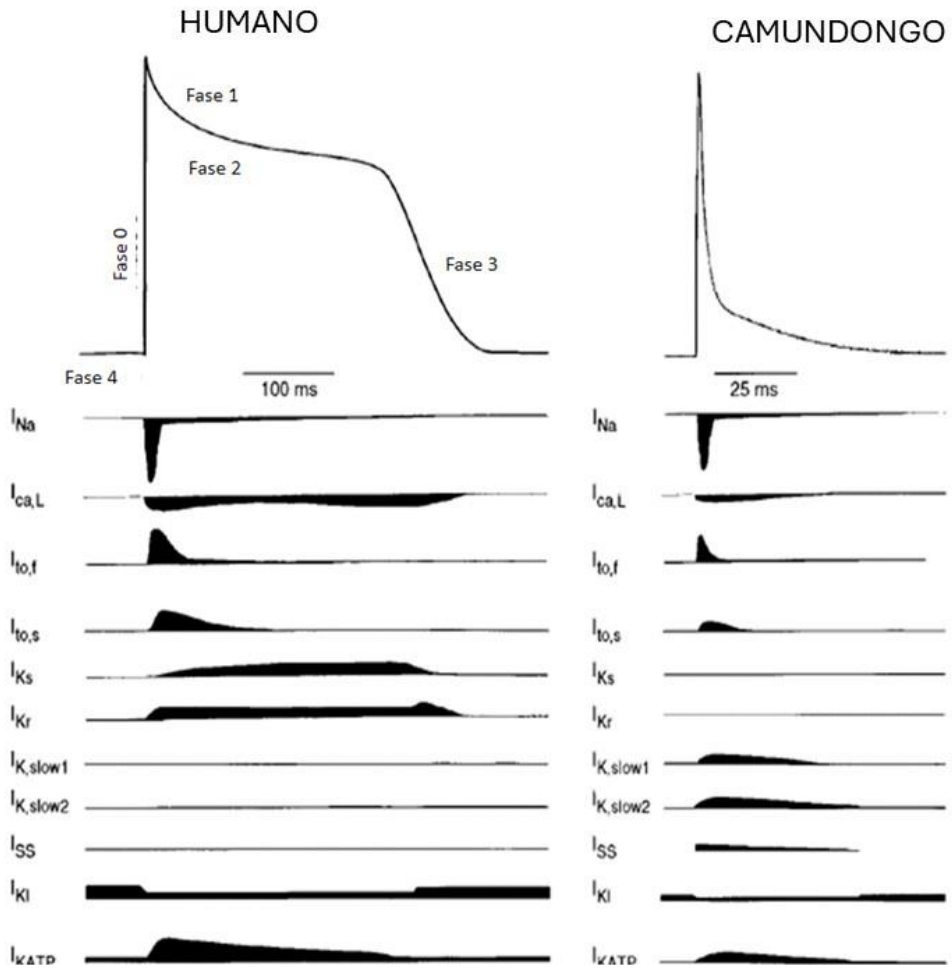
Figura 2 – Curvas características do PA nas diferentes células cardíacas.



Fonte: (CONSTANZO, 2018)

O PA como descrito anteriormente é o de células cardíacas humanas. Todo o processo de propagação do PA depende dos canais iônicos e alterações nessas estruturas podem ocasionar em diferentes fases e formatos da curva do PA. Diferentes espécies são utilizadas para o estudo de doenças cardíacas, porém é necessário entender as diferenças entre as estruturas encontradas em cada uma. Um mamífero muito utilizado nos estudos é o camundongo (NERBONNE, 2004). A Figura 3 apresenta algumas diferenças das principais correntes iônicas e do PA entre o modelo humano e o de camundongo. O PA de camundongo é claramente mais curto em relação ao de humano. As correntes que mais se equivalem são as de Ca^{2+} e Na^{+}. Já as de K^{+} possuem diferenças entre si, sendo maior o efluxo de K^{+} no modelo de camundongo, o que pode ser a causa pela repolarização mais rápida e de uma praticamente inexistente fase de platô (BONDARENKO *et al.*, 2004).

Figura 3 – Diferenças entre o PA e as correntes iônicas de humano e camundongo.



Fonte: (NERBONNE, 2004)

4.2 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO

A células do músculo cardíaco são compostas por sarcômeros que são estrutura formadas por filamentos espessos e finos (SILVA *et al.*, 2021). Nos filamentos espessos encontra-se a proteína miosina que possui sítios de ligação para a actina e atividade de ATPase enquanto nos filamentos finos tem-se as proteínas actina, tropomiosina e troponina (BERS; DESPA, 2013). A actina possui sítios de ligação para a miosina, a tropomiosina funciona como bloqueadora dos sítios de ligação da miosina e a troponina possui três subunidades sendo a troponina C (TnC) a que se liga aos íons de Ca^{2+}, causando uma alteração conformacional na proteína retirando o bloqueio da tropomiosina e permitindo a ligação actina-miosina (MULLINS; BONDARENKO, 2013). Essa ligação leva o nome de ponte cruzada (PTC) e permite

que os filamentos deslizem um sobre o outro o que dá origem a contração muscular (BERS; DESPA, 2013). No entanto, até que o Ca^{2+} se ligue à TnC ocorrem algumas etapas que são descritas a seguir:

Etapa 1: o processo se inicia com o PA que se propaga pelos miócitos através dos túbulos T. Na fase platô é quando são ativados os canais responsáveis pelo influxo de Ca^{2+}. Porém, a quantidade de Ca^{2+} intracelular ainda não é suficiente para desencadear a contração;

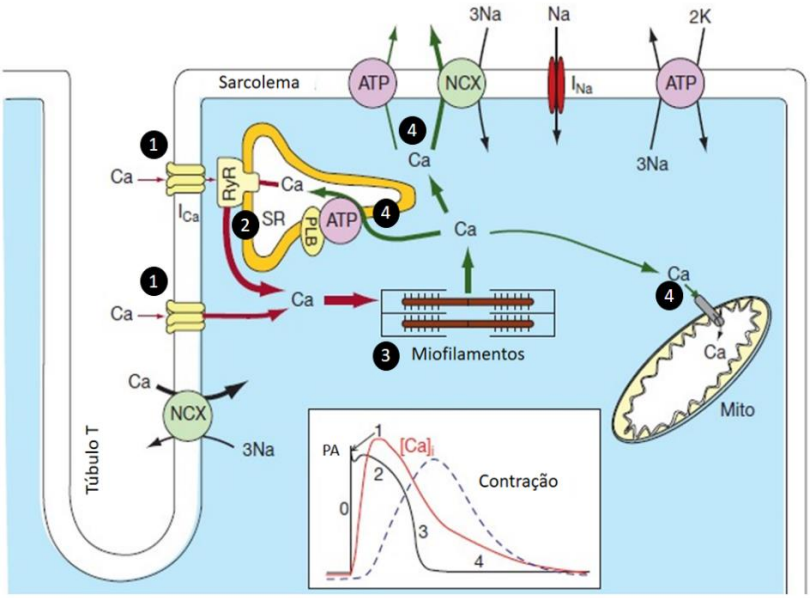
Etapa 2: o Ca^{2+} que entrou na célula ativa os receptores de rianodina (RyR) que são responsáveis pelo fluxo de Ca^{2+} do RS, processo conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR);

Etapa 3: com o aumento da concentração interna de Ca^{2+} agora os íons começam a se ligar à TnC, desbloqueando a interação entre a miosina e actina e formando as pontes cruzadas que permitem o deslizamento dos filamentos finos sobre os espessos, ocorrendo então a contração;

Etapa 4: o relaxamento ocorre por conta da entrada do Ca^{2+} em excesso no RS pela bomba ATPase, pela entrada de Ca^{2+} no canal mitocondrial e pela saída de Ca^{2+} pelo trocador NCX e pela bomba ATPase na membrana celular. Com a diminuição do Ca^{2+} citosólico cessam as ligações com a TnC fazendo com que a tropomiosina volte a atuar bloqueando as interações entre a actina e miosina (EISNER *et al.*, 2017).

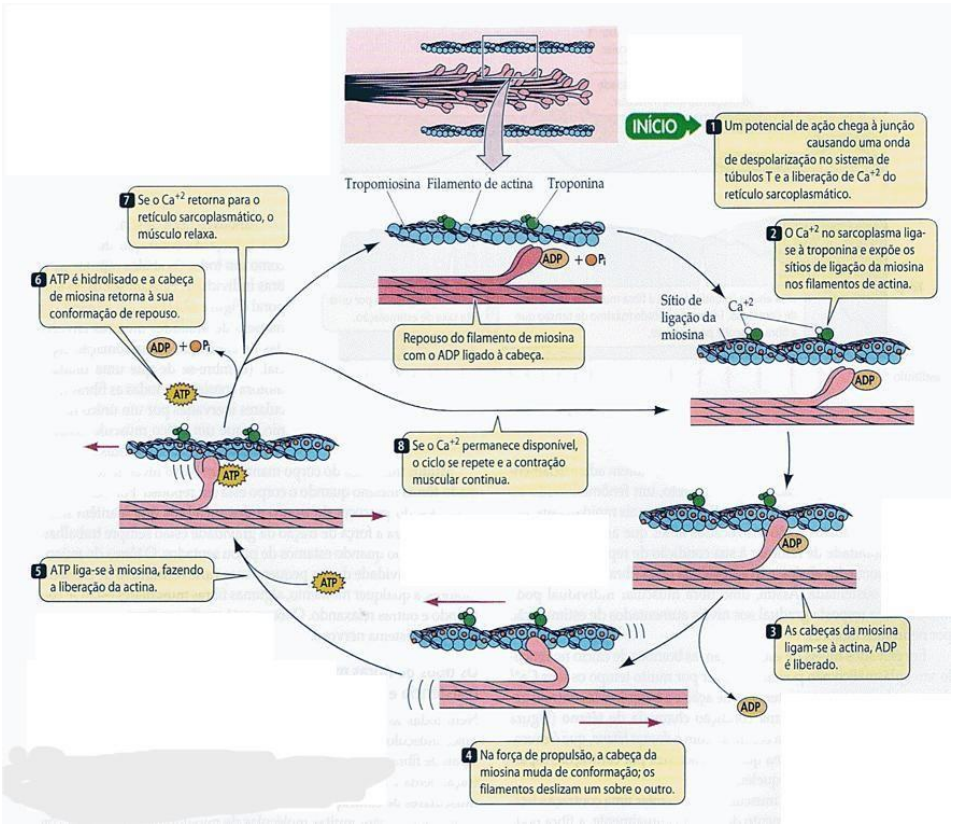
A Figura 4 ilustra todo o processo descrito anteriormente e a Figura 5 traz com mais detalhes a dinâmica que ocorre entre os filamentos de actina e miosina:

Figura 4 – Processo de acoplamento excitação-contração. As fases descritas no texto possuem correspondência na ilustração.



Fonte: (BERS; DESPA, 2013)

Figura 5 – Dinâmica dos miofilamentos: processo de contração através dos filamentos de actina e miosina.



Fonte: Adaptado de (PURVES *et al.*, 2009)

5 ESTADO DA ARTE

Nessa seção serão apresentados os primeiros modelos matemáticos para a contração muscular; os principais modelos posteriores em ordem cronológica com uma breve descrição de cada um; e por fim serão detalhados os modelos matemáticos para contração de cardiomiócitos utilizados no presente trabalho, os de NL96, NL08, N15, R99 e R08.

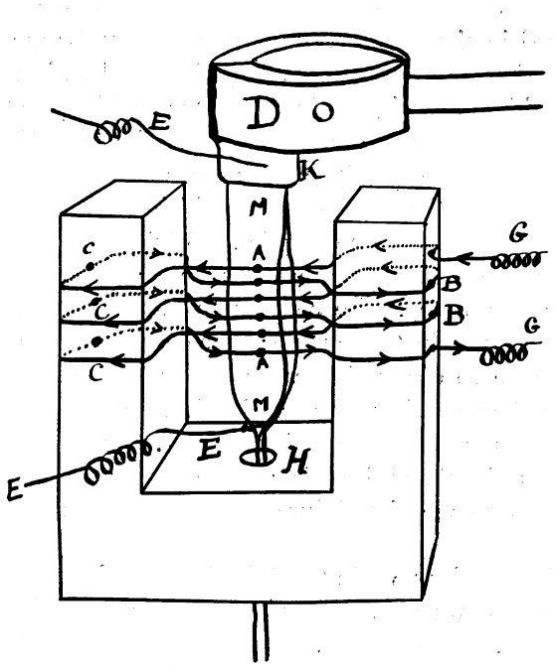
5.1 PRIMEIRAS MODELAGENS DA CONTRAÇÃO MUSCULAR

5.1.1 Modelo reológico de Hill (1938)

Em 1938, Archibald Vivian Hill publicou o trabalho (HILL, 1938) que viria a ser uma das bases das teorias do funcionamento da contração muscular tanto mecanicamente quanto energeticamente. O objetivo do estudo era utilizar os equipamentos disponíveis na época para capturar as relações entre a velocidade de encurtamento e gasto energético do músculo enquanto este era submetido a diferentes esforços. O trabalho foi dividido em três partes: na primeira são descritos os equipamentos e a técnica utilizada; na segunda são apresentados os resultados e a discussão; e na terceira é elaborada uma proposta teórica para o funcionamento muscular partindo dos resultados obtidos.

Os dados foram coletados utilizando um sistema de galvanômetros acoplados, sensíveis o suficiente para medir as mudanças de temperatura e deflexões do músculo. Esse sistema foi utilizado em conjunto com um equipamento chamado termópila, desenvolvido por Hill em cooperação com Downing (HILL, 1937), capaz acoplar um par de músculos sartório de sapo e transformar o calor produzido durante a contração em resistência elétrica. O esquema de funcionamento da termópila é apresentado na Figura 6, optou-se por usar o esquema apresentado em (HILL, 1913), pois sintetiza a ideia do equipamento.

Figura 6 – Esquema básico para a termópila apresentado no trabalho de Hill (1913).



O equipamento é composto por uma estrutura de borracha em “U”, onde é enrolado um fio de cobre formando as junções “frias” C-C e B-B que se ligam à junção “quente” A-A fixada no músculo M-M. Esse sistema é interligado ao sistema de galvanômetros G-G. O músculo é acoplado em K e D, estruturas fixas que variam de material de acordo a construção. O fio E-E é por onde passa o estímulo elétrico e o furo H interliga o músculo ao equipamento que registra a tensão gerada pela contração. Fonte: (HILL, 1913).

Hill já havia testado diversos modos de otimizar a coleta de dados dos experimentos, modificando os materiais do sistema de modo a chegar à uma alta sensibilidade térmica, baixa condutividade térmica e uma resistência adequada para os galvanômetros (BARCLAY; CURTIN, 2022).

Com o equipamento calibrado e em sua versão otimizada foi possível a coleta dos dados e a partir disso a elaboração de um modelo para a contração muscular. O modelo representa o músculo através de dois elementos em série, um elástico e outro contrátil governado pela seguinte equação:

$$(F + a).(v + b) = c \tag{1}$$

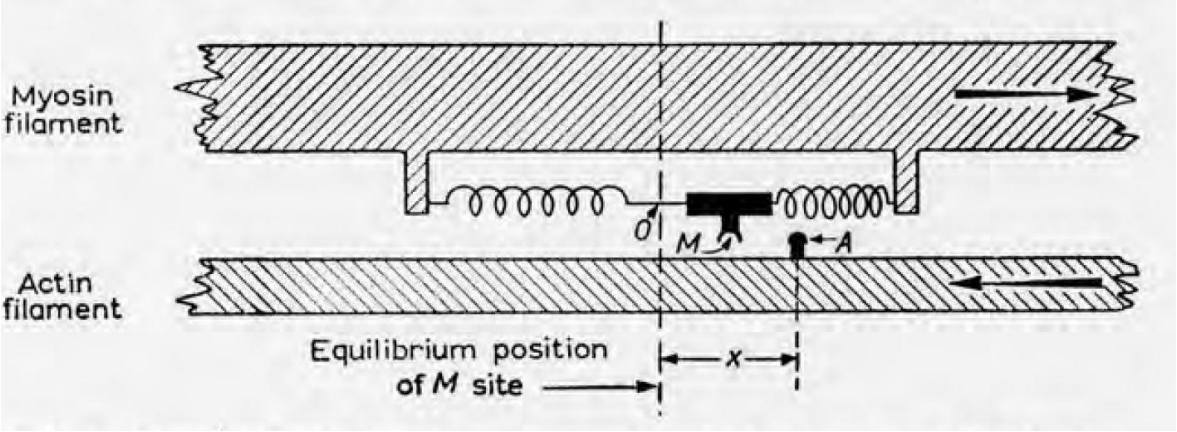
Onde F é a tensão/força do músculo, v a velocidade de contração e a, b e c constantes do modelo. Essa equação característica permitiu uma série de descobertas acerca das relações tensão-velocidade do músculo. No decorrer do artigo original (HILL, 1938) é feita a validação desse modelo e a dedução: da contração isométrica, quando

o comprimento do músculo é constante; das curvas de força vs. distância com velocidade constante; e da maior taxa de realização de trabalho do músculo que corresponde a 30% do total da contração isométrica.

5.1.2 Modelo para a contração muscular de Huxley (1957)

Primeira formulação matemática para o funcionamento da contração muscular a nível molecular. Através das observações experimentais da época, Huxley propõe a ideia de que os filamentos de actina e miosina formam ligações entre si e que o número dessas é proporcional à força desenvolvida. O esquema da Figura 7 ilustra a proposta para a dinâmica dos filamentos proposta:

Figura 7 – Esquema ilustrando a teoria proposta por Huxley (1957) para o deslizamento dos filamentos para geração da força de contração.



O ponto M representa o sítio de ligação da miosina com o ponto A da actina. O tracejado indicado por O é a posição de equilíbrio do elemento deslizante presente na miosina. A distância x entra A e O controla as taxas positivas e negativas de ligação de A com M. Fonte: (HUXLEY, 1957)

Com a teoria proposta foi possível então a formulação matemática do modelo. A formulação leva em conta dois estados em que os filamentos podem se encontrar: com ou sem ligação A-M. As taxas de transição entre esses estados são f e g, respectivamente, positiva e negativa para ligação A-M. Essas taxas variam de acordo com o valor de x (ver Figura 6) e as funções de cada uma são apresentadas a seguir:

$$x < 0 : f(x) = 0 : g(x) = g_2 \tag{2}$$

$$0 \leq x \leq h : f(x) = \frac{f_1.x}{h} : g(x) = \frac{g_1.x}{h} \quad (3)$$

$$x > h : f(x) = 0 : g(x) = \frac{g_1.x}{h} \quad (4)$$

onde h é o valor máximo que x pode assumir para que ocorra ligação A-M, $\frac{f_1}{h} = 43{,}3\ s^{-1}$, $\frac{g_1}{h} = 10\ s^{-1}$ e $g_2 = 209\ s^{-1}$.

A força de contração, definida como $P(v)$, possui duas equações nesse modelo: uma para a situação de encurtamento (Equação 5) e outra para a situação de alongamento (Equação 6) do sarcômero:

$$P(v) = 1 - \frac{2.\left(\frac{v}{h}\right)}{f_1 + g_1}.\left\{1 - e^{\left[-\frac{(f_1+g_1)}{2.\left(\frac{v}{h}\right)}\right]}\right\}.\left(1 + \frac{f_1 + g_1}{g_2}.\frac{\frac{v}{h}}{g_2}\right) \quad (5)$$

$$P(v) = 1 + \frac{2.\left(\frac{v}{h}\right)}{f_1 + g_1}.\frac{f_1}{g_1}.\left\{1 - e^{\left[-\frac{(f_1+g_1)}{2.\left(\frac{v}{h}\right)}\right]}\right\} \quad (6)$$

onde v é a velocidade de contração.

As equações do modelo de Huxley (1957) apresentadas anteriormente foram a versão reduzida presente no trabalho de Harry *et al.* (1990).

5.2 PRINCIPAIS MODELOS PARA FORÇA DE CONTRAÇÃO

Nessa seção serão apresentados e descritos de forma sucinta alguns dos principais modelos para força de contração muscular desenvolvidos posteriormente aos trabalhos de Hill (1938) e Huxley (1957). Os modelos são apresentados no Quadro 1 de forma cronológica.

Quadro 1 – Principais modelos para força de contração organizados cronologicamente com uma breve descrição de cada um.

Modelo	Espécie	Músculo	Descrição
(JULIAN, 1969)	Insetos	Fibrilares	Um dos primeiros modelos a incluir o papel do cálcio como gatilho do processo de contração muscular.
(LYMN; TAYLOR, 1971)	Coelho	Perna traseira e paravertebrais abaixo do tórax	Fornece uma abordagem bioquímica, incluindo as reações de ATP e ADP em um modelo baseado em Huxley (1957).
(HUXLEY; SIMMONS, 1971)	Rã	Semitendinoso	Acrescenta ao seu modelo original (HUXLEY,1957) a ideia de rotação da cabeça de miosina ligada à actina.
(GRAY; GONDA, 1977a, 1977b)	Indefinido	Estriado	Aplica as principais leis da mecânica quântica, conhecidas até aquele momento, ao modelo de Huxley (1957).
(EISENBERG; HILL, 1979)	Rã	Tibialis anterior	Modelo bioquímico para o ciclo de pontes-cruzadas com 4 estados que representam a rotação da cabeça de miosina.
(PANERAI, 1980)	Mamíferos	Papilar	Modelo baseado em Huxley (1957) que inclui o consumo de oxigênio nos processos da contração.
(ZAHALAK, 1981)	Indefinido	Indefinido	Traz uma nova abordagem ao modelo de Huxley (1957) com um sistema de equações diferenciais e modificações para ajustar às descobertas da época.

Quadro 1 – Principais modelos para força de contração organizados cronologicamente com uma breve descrição de cada um.

(HILL, 1983)	Indefinido	Indefinido	Apresenta a ideia de cooperatividade entre a formação de pontes-cruzadas e a ligação Cálcio-Troponina.
(YUE, 1987)	Furão	Papilar	Relaciona a concentração de cálcio intracelular com a força de contração desenvolvida.
(ZAHALAK; MA, 1990)	Indefinido	Indefinido	Adiciona ao modelo anterior (ZAHALAK, 1981) as dinâmicas de cálcio.
(KATSNELSON; IZAKOV YA.; MARKHASIN, 1990)	Indefinido	Cardíaco	Apresenta um modelo reológico que integra interações de cálcio com troponina ao tamanho de sarcômero e ao número de formações de pontes-cruzadas.
(PETERSON; HUNTER; BERMAN, 1991)	Coelho	Papilar	Modelo de 4 estados para força de contração célula cardíaca de coelho que inclui cálculos para o tempo de ligação entre Cálcio e Troponina C.
(IZAKOV *et al.*, 1991)	Indefinido	Cardíaco	Modelo reológico do músculo cardíaco que apresenta a ideia de cooperatividade entre a formação de pontes-cruzadas por proximidade.
(TAYLOR; SUGA; POLLACK, 1993)	Indefinido	Cardíaco	Junta os conceitos dos modelos de Hill (1938) com Huxley (1957) em um modelo para contração de célula cardíaca.

Quadro 1 – Principais modelos para força de contração organizados cronologicamente com uma breve descrição de cada um.

(LANDESBERG; SIDEMAN, 1994)	Indefinido	Cardíaco	Modelo para célula cardíaca que traz 4 estados para o sistema troponina interagindo com cálcio.
(BURKHOFF, 1994)	Rato	Ventricular	Integração de um modelo bioquímico de contração de células ventriculares com um modelo completo de ventrículo.
(ZOU; PHILLIPS, 1994)	Indefinido	Indefinido	Descrição matemática e computacional detalhada das dinâmicas entre as proteínas envolvidas na contração.
(DOBRUNZ; BACKX; YUE, 1995)	Rato	Ventricular	Modelo para contração do miócito ventricular de rato baseado em dados experimentais coletados através de um novo método para registro das relações da força com cálcio em miócitos isolados.
(HONDA; KOIWA; SHIRATO, 1996)	Indefinido	Estriado	Baseado no modelo de Gray e Gonda (1977a,b), estipula 4 estados para o ciclo de contração e relaciona as taxas de transição com as concentrações de cálcio.
(MIJAILOVICH; FREDBERG; BUTLER, 1996)	Indefinido	Estriado	Reformula o modelo de Huxley (1957) considerando agora a extensibilidade dos filamentos.
(NEGRONI; LASCANO, 1996)	Indefinido	Cardíaco	Determina 4 estados para o sistema de troponina e relaciona o tamanho do sarcômero aos transientes de cálcio.

Quadro 1 – Principais modelos para força de contração organizados cronologicamente com uma breve descrição de cada um.

(BARAN *et al.*, 1997)	Furão	Ventricular	Compara duas formas distintas de modelagem da contração: uma com 3 estados e outra com 4 estados.
(CAMPBELL, 1997)	Indefinido	Estriado	Elabora um modelo incluindo dois tipos de cooperatividade entre a formação de pontes-cruzadas: por proximidade de outras pontes e por dependência de cálcio.
(HUNTER; MCCULLOCH; TER KEURS, 1998)	Indefinido	Cardíaco	Aplica as formulações para dinâmicas de cálcio e dos miofilamentos em um modelo para o músculo cardíaco completo.
(RICE; WINSLOW; HUNTER, 1999)	Indefinido	Cardíaco	Apresenta 5 modelos com diferentes números de estados e mecanismos de cooperatividade para a formação de pontes-cruzadas.
(RAZUMOVA; BUKATINA; CAMPBELL, 1999)	Indefinido	Estriado	Modelo de 4 estados que inclui em sua formulações parâmetros de rigidez dos sarcômero.
(LANDESBERG; SIDEMAN, 1999)	Indefinido	Cardíaco	Traz uma abordagem bioquímica ao modelo anterior (LANDESBERG; SIDEMAN, 1994) e adiciona mecanismos de cooperatividade na formação de pontres-cruzadas.

Quadro 1 – Principais modelos para força de contração organizados cronologicamente com uma breve descrição de cada um.

(RAZUMOVA; BUKATINA; CAMPBELL, 2000)	Indefinido	Estriado	Testa diferentes mecanismos de cooperatividade na formação de pontes cruzadas com o modelo elaborado anteriormente (RAZUMOVA; BUKATINA; CAMPBELL, 1999).
(HONDA; NAYA; KOIWA, 2001)	Indefinido	Cardíaco	Simplifica o modelo anterior (HONDA; KOIWA; SHIRATO, 1996) para uma versão com 3 estados para descrever as propriedades sistólicas e de relaxamento do músculo cardíaco.
(SHIMIZU; TODAKA; BURKHOFF, 2002)	Canino	Ventricular	Integra um modelo de dinâmica dos miofilamentos a um modelo reológico que descreve pressão sanguínea nas paredes do ventrículo.
(RICE *et al.*, 2003)	Indefinido	Cardíaco	Descreve a ativação do filamento fino através de um modelo estatístico e representa também a cooperatividade por proximidade.
(RHODES *et al.*, 2003)	Porquinho da Índia	Ventricular	Utiliza a modelagem das dinâmicas dos miofilamentos e de cálcio para determinar a pressão no ventrículo esquerdo de porquinhos-da-Índia.
(RICE *et al.*, 2008)	Rato	Cardíaco	Traz uma abordagem detalhada da geometria do sarcômero e inclui dependência da temperatura nos parâmetros.

Quadro 1 – Principais modelos para força de contração organizados cronologicamente com uma breve descrição de cada um.

(NEGRONI; LASCANO, 2008)	Mamíferos	Cardíaco	Modelo de 6 estados que amplia as ideias do modelo anterior (NEGRONI; LASCANO, 1996) e adiciona um mecanismo de cooperatividade para a ligação de cálcio com troponina.
(CAMPBELL *et al.*, 2010)	Rato	Cardíaco	Descreve a ativação do filamento fino através de 4 estados em um modelo estocástico que inclui o mecanismo de cooperatividade por proximidade.
(WASHIO *et al.*, 2012)	Indefinido	Indefinido	Atualização do modelo de Rice *et al.* (2003) para aplicar simulações de Monte Carlo.
(CAMPBELL, 2014)	Indefinido	Cardíaco	Apresenta uma ferramenta computacional, o MyosSim, que permite a elaboração de modelos baseados em Huxley (1957) com quantos estados forem necessários.
(ABOELKASSEM *et al.*, 2015)	Indefinido	Cardíaco	Adiciona dois estados ao modelo de Campbell, S. G. *et al.* (2010) que representa a interação de actina e miosina sem a presença de cálcio.

Quadro 1 – Principais modelos para força de contração organizados cronologicamente com uma breve descrição de cada um.

(NEGRONI *et al.*, 2015)	Coelho	Ventricular	Simplificação do modelo anterior (NEGRONI; LASCANO, 2008) para um esquema de 5 estados e acoplamento em um modelo elétrico completo de célula cardíaca que conta com formulações para estimulação beta-adrenérgica.
(RHODES *et al.*, 2015)	Porquinho da Índia	Ventricular	Elabora um modelo que calcula a dependência da pressão do ventrículo à concentração de cálcio citosólico.
(MCCABE *et al.*, 2020)	Rato	Cardíaco	Modelo estocástico dos ciclos de ADP e ATP na dinâmica de miofilamentos.

5.3 OS MODELOS DE NEGRONI E COLABORADORES

Modelos matemáticos para estimar a força de contração do cardiomiócito ventricular que foram desenvolvidos e apresentados em três trabalhos: Negroni e Lascano (1996), Negroni e Lascano (2008) e Negroni *et al.* (2015).

5.3.1 Negroni e Lascano (1996) – NL96

O modelo matemático de Negroni e Lascano (1996) estima a força de contração desenvolvida no miócito ventricular utilizando parâmetros experimentais de mamíferos. É formado por uma série de arranjos de unidades musculares definidas pelo volume determinado pela área transversal do músculo e metade do comprimento do sarcômero (L):

$$L = \frac{L_m}{N_0} \tag{7}$$

Onde L_m é o comprimento total do músculo e N_0 o número de unidades musculares.

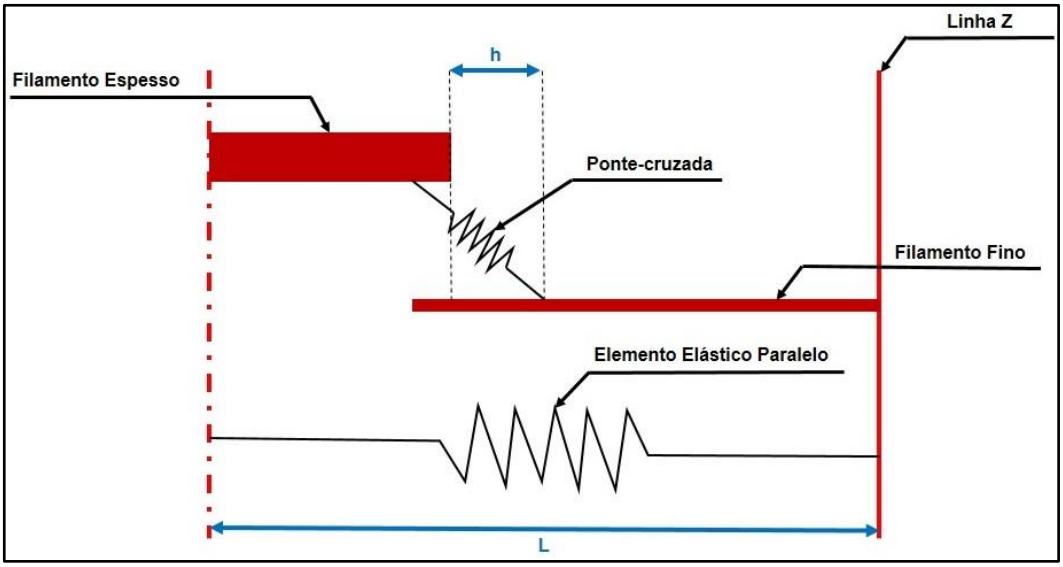
A força de contração é desenvolvida pelas pontes-cruzadas (PTC's), estruturas que se formam quando ocorre a ligação entre os filamentos fino e espesso através das proteínas miosina e actina. No modelo cada PTC é um elemento elástico que desenvolve força individualmente (f_b):

$$f_b = a.h \tag{8}$$

Sendo que a é a rigidez do elemento elástico e h o alongamento da PTC.

Outros fatores que colaboram para o desenvolvimento de força contração são a carga elástica dos componentes intracelulares e da malha de colágeno ao redor da célula. No modelo isso é representado por um elemento elástico em paralelo com a formação da PTC (Figura 8):

Figura 8 – Esquema que ilustra uma unidade muscular de comprimento L (metade do comprimento do sarcômero).



É composta pelos filamentos fino e espesso em paralelo com o elemento elástico. A PTC representada faz parte do filamento espesso e liga-se ao filamento fino com alongamento h. Fonte: Adaptado de (NEGRONI; LASCANO, 1996).

Sendo assim, a força de contração desenvolvida (F) é descrita pela soma da exercida pelo total de PTC's (F_b) e pelo elemento elástico em paralelo (F_p).

$$F = F_b + F_p \tag{9}$$

A força desenvolvida pelo elemento elástico em paralelo (F_p) é descrita como:

$$F_p = K.(L - L_o)^5 \quad (10)$$

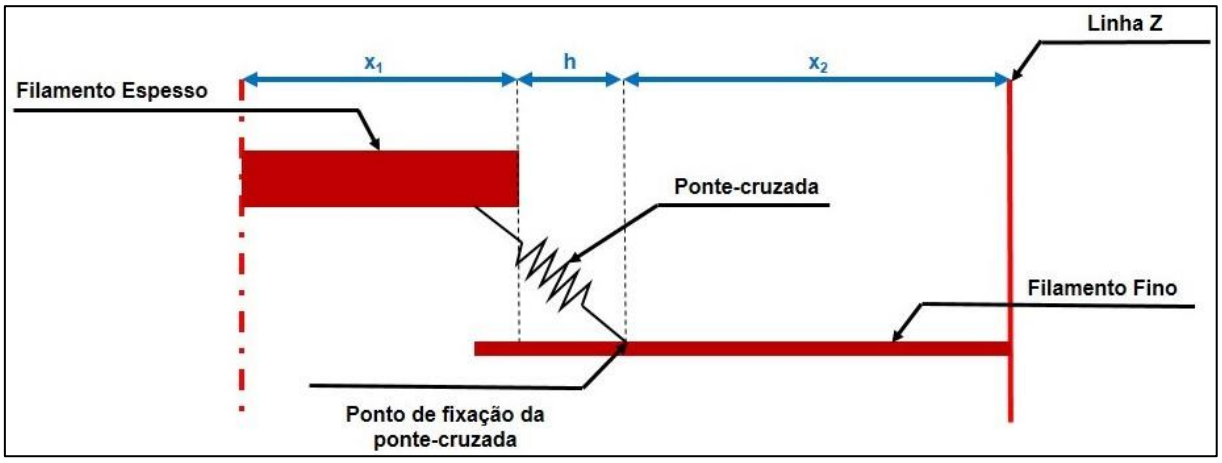
Sendo, K um parâmetro da equação, L e L_o os comprimentos, respectivamente, de metade do sarcômero e inicial do elemento elástico paralelo.

Um dos principais fatores que influenciam na força exercida pela PTC é seu alongamento, definido pela seguinte equação:

$$h = L - X \quad (11)$$

Onde L é metade do comprimento do sarcômero e X é o comprimento do filamento espesso (x_1) mais o comprimento do filamento fino menos a região de intersecção com a PTC (x_2) (Figura 9).

Figura 9 – Esquema que apresenta os elementos que definem o alongamento da PTC.



No esquema h é o alongamento que pode varia com x_2 que é definido pelo deslocamento do ponto de fixação da PTC no filamento fino e x_1 que é a metade comprimento do filamento espesso. Fonte: Adaptado de (NEGRONI; LASCANO, 1996).

Durante a contração podem ocorrer de forma assíncrona acoplamentos e desacoplamentos das PTC's, causando flutuações na força (HUXLEY, 1957). No modelo esse fenômeno não pôde ser representado de forma íntegra, pois a ausência da PTC acoplada no filamento fino pode ocasionar em uma queda abrupta da força para zero. Em vez disso, foi considerado um deslocamento do ponto de fixação da

PTC no filamento fino o que gera variações em X que são expressas na seguinte equação:

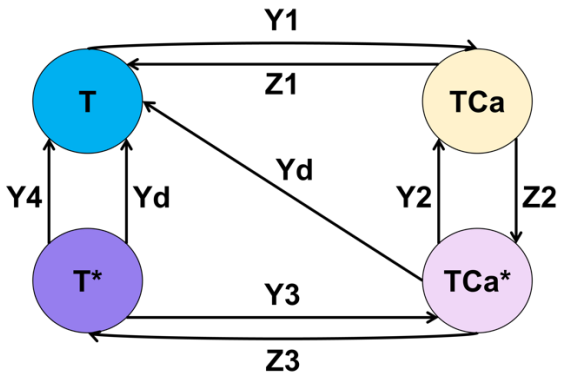
$$\frac{dX}{dt} = B.(h - h_c) \tag{12}$$

Sendo que B é um parâmetro do modelo, h e h_c o alongamento da PTC, respectivamente, final e inicial. Ao substituir a Equação 11 em 12 temos:

$$\frac{dX}{dt} = B.(L - X - h_c) \tag{13}$$

A formação de PTC's é um complexo fenômeno que no modelo foi descrito através de estados dependentes da cinética de Ca^{2+}. São 4 estados que indicam se há ligação da TnC com Ca^{2+} e/ou formação de pontes cruzadas (Figura 10).

Figura 10 – Diagrama de estados do modelo de Negroni e Lascano (1996).



No diagrama as constantes de associação e dissociação de Ca^{2+}, respectivamente, Y_1 e Z_1 regem as transições entre os estados T (TnC não ligada ao Ca^{2+}) e TCa (TnC ligada ao Ca^{2+}). A transição entre TCa e TCa* (TnC ligada ao Ca^{2+} com formação de PTC) é controlada pelas constantes Y_2 e Z_2. As constantes Y_3 e Z_3 fazem a transição entre os estados TCa* e T* (TnC não ligada ao Ca^{2+} com formação de PTC). Por fim, as constantes Y_4 e Y_d regem a transição para o estado T. Fonte: Adaptado de (NEGRONI; LASCANO, 1996).

Durante o fluxo de Ca^{2+} parte dele irá se ligar à TnC. No modelo isso é calculado através da seguinte equação:

$$Q_b = Y_1.[Ca^{2+}].[T] - Z_1.[TCa] \tag{14}$$

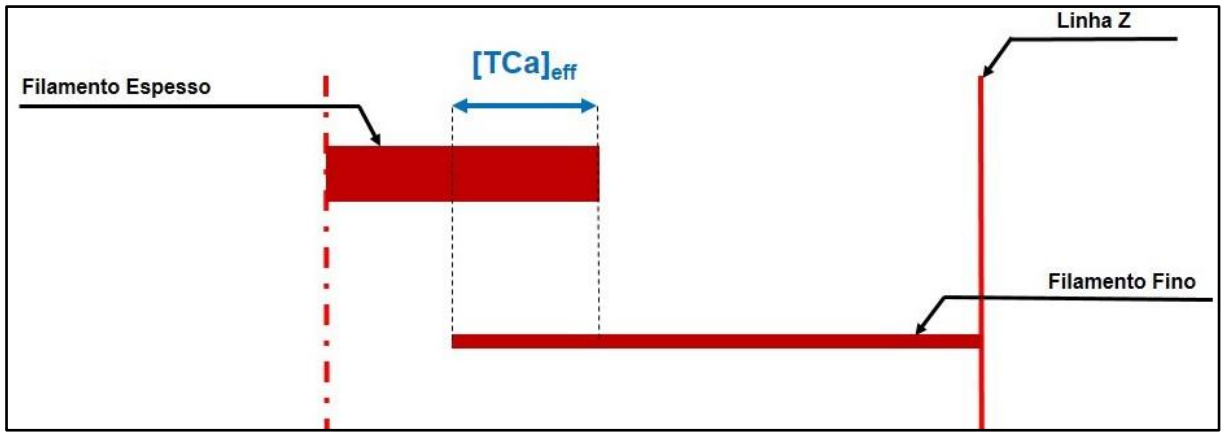
Nela são apresentadas as taxas de associação e dissociação de Ca^{2+} à TnC, respectivamente, Y_1 (k_{on}) e Z_1 (k_{off}), $[T]$ são os sítios de TnC sem Ca^{2+} ou PTC's, $[TCa]$ são os sítios de TnC com Ca^{2+} sem formação de PTC's e $[Ca^{2+}]$ é a concentração interna de Ca^{2+}.

No modelo o estado TCa* indica ligação da TnC ao Ca^{2+} com uma taxa de formação de PTC's que é calculada por:

$$Q_a = Y_2.[TCa]_{eff} - Z_2.[TCa*] \quad (15)$$

Sendo, Y_2 e Z_2 constantes de transição entre os estados TCa e TCa* e $[TCa]_{eff}$ é a porção efetiva de [TCa] para a formação de PTC's, ou seja, a região de intersecção entre os filamentos fino e espesso (Figura 11).

Figura 11 – Indicação da região efetiva para formação de PTC's.



Portanto, $[TCa]_{eff}$ é dependente do tamanho de meio sarcômero (L) e é definido pela seguinte equação:

$$[TCa]_{eff} = [TCa].e^{-R.(L-La)^2} \quad (16)$$

Onde La é o comprimento da intersecção ótima, onde $[TCa]_{eff}$ é máximo e R é uma constante do modelo.

O estado [T*] indica formação de PTC's, porém sem Ca^{2+} ligado à TnC. A taxa líquida do Ca^{2+} liberado nesse estado é calculada a partir da seguinte equação:

$$Q_r = Y_3.[TCa^*] - Z_3.[T^*].[Ca^{2+}] \quad (17)$$

Sendo, Y_3 e Z_3 constantes de transição entre os estados [TCa*] e [T*].

Após o fenômeno da contração ocorre o desprendimento das PTC's, o chamado estado estacionário da força, representado no modelo como [T]. A equação apresentada a seguir calcula a taxa de desprendimento das pontes-cruzadas nesse estado:

$$Q_d = Y_4.[T^*] \tag{18}$$

Onde Y_4 é a constante de transição entre os estados [T*] e [T].

Outra variável que pode influenciar no desprendimento das PTC's é o comprimento de X, pois atua diretamente no alongamento da PTC. No modelo são descritas duas equações que predizem a relação de X na transição dos estados [TCa*] e [T*] para o estado estacionário [T]. Para o estado [T*] tem-se:

$$Q_{d1} = Y_d.\left(\frac{dX}{dt}\right)^2.[T^*] \tag{19}$$

Já para o estado [TCa*] é dado que:

$$Q_{d2} = Y_d.\left(\frac{dX}{dt}\right)^2.[TCa^*] \tag{20}$$

Sendo Y_d uma constante de transição entre os estados [TCa*] e [T*] para [T].

As taxas apresentadas anteriormente influenciam na mudança dos estados do sistema TnC-Ca^{2+} e no fluxo intracelular de Ca^{2+}. Sendo assim, as taxas de transição para [TCa], [TCa*], [T*] e [Ca^{2+}], respectivamente, são:

$$\frac{d[TCa]}{dt} = Q_b - Q_a \tag{21}$$

$$\frac{d[TCa^*]}{dt} = Q_a - Q_r - Q_{d2} \tag{22}$$

$$\frac{d[T^*]}{dt} = Q_r - Q_d - Q_{d1} \tag{23}$$

No modelo a força de contração F_b é desenvolvida pelo total de PTC's nos estados [TCa*] e [T*]. Portanto, a equação que define o número de PTC's formadas é:

$$N = A_v . V_m . ([TCa^*] + [T^*]) \quad (24)$$

Onde, A_v é a constante de Avogrado e V_m o volume total do músculo.

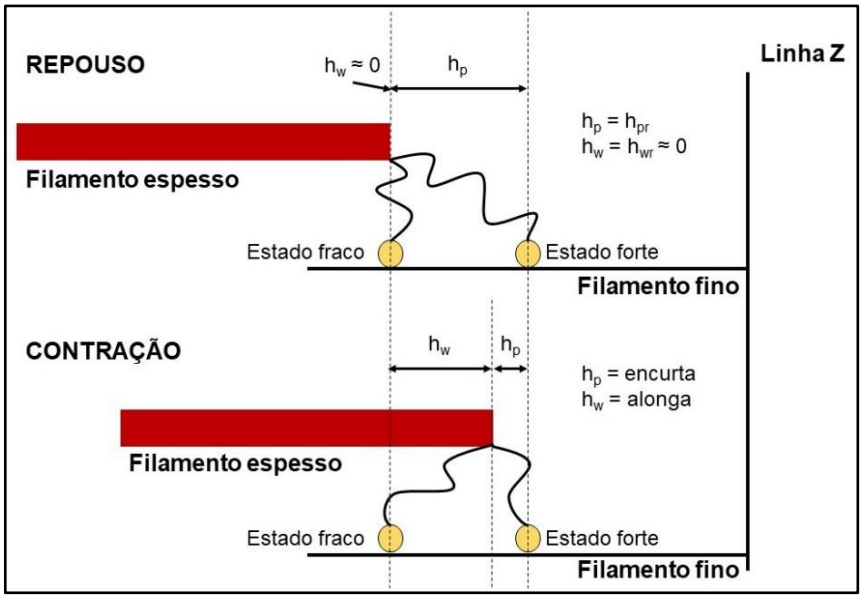
Por fim, a força total desenvolvida pelas PTC's é a força f_b multiplicada pelo número total de PTC's dividido pela área do músculo (F_b=(f_b.N)/$area_r$). Substituindo os termos da equação, realizando as operações algébricas necessárias e convertendo as constantes em um nova, A, obtém-se:

$$F_b = A . ([TCa^*] + [T^*]) . (L - X) \quad (25)$$

5.3.2 Negroni e Lascano (2008) – NL08

Atualização do modelo de 1996 que apresenta a ideia de dois estados de PTC's: fraco e forte (Figura 12). Com isso, diversas modificações foram feitas, principalmente relacionadas ao sistema troponina.

Figura 12 – Esquema para o novo modelo de PTC's.



Nele a formação de PTC's ocorre em dois estados: fraco e forte. Sendo h_w e h_p os comprimentos das PTC's nos estados fraco e forte, respectivamente. Durante o repouso h_w é igual a h_{wr} que é muito

próximo de zero. Já h_p no repouso é igual a h_{pr}. Ao ocorrer a contração h_w aumenta de comprimento e h_p diminui. Fonte: Adaptado de (NEGRONI; LASCANO, 2008).

A equação que define a força exercida pelas PTC's é semelhante a do modelo anterior (Equação 26):

$$F_b = A_e.[CB].h \tag{26}$$

Onde A_e é o produto de importantes constantes do modelo: a – constante elástica de cada ponte-cruzada, A – constante de Avogadro, L_r – comprimento do músculo e K_i – fração do volume mioplasmático do músculo; $[CB]$ é a concentração de todas as PTC's e h é a média do alongamento das PTC's.

Para condizer com o novo modelo a equação anterior foi modificada para incluir elementos para cada um dos dois tipos de PTC's:

$$F_b = A_w.[CB_w].h_w + A_p.\left[CB_p\right].h_p \tag{27}$$

A constante A, o alongamento h e a concentração $[CB]$ recebem os subíndices w (*weak*) e p (*power*) que representam, respectivamente, componentes dos tipos fraco e forte das PTC's.

A variação do tamanho de metade do sarcômero depende do alongamento dos dois tipos de PTC's o que acaba gerando uma equivalência:

$$\frac{dL}{dt} = B.(h_w - h_{wr}) + \frac{dh_w}{dt} \tag{28}$$

$$\frac{dL}{dt} = B.\left(h_p - h_{pr}\right) + \frac{dh_p}{dt} \tag{29}$$

Para simplificação o valor de B foi assumido como o mesmo para ambas as equações.

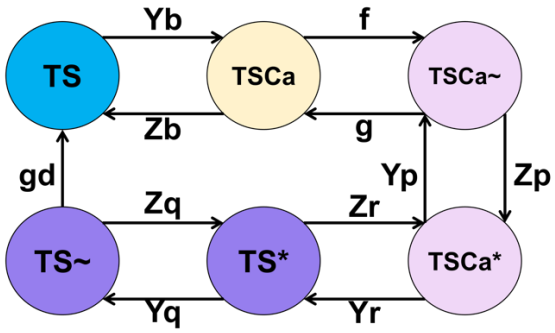
Assim como no modelo anterior, para representar outras estruturas elásticas da célula é adotado um elemento elástico em paralelo cuja força exercida é somada para obter a força total. A equação que calcula a força exercida por esse elemento, que possui componentes em comum com a Equação 10, é apresentada a seguir:

$$F_p = K_e.(L - L_o)^5 + L_e.(L - L_o) \quad (30)$$

Aqui K_e, L_e e L_o são constantes do modelo.

Nesse modelo os sistemas de troponina (TS) podem se apresentar em seis estados, dois a mais em relação ao anterior (Figura 13). Os estados contemplam os dois tipos de formação de PTC's: fraco e forte.

Figura 13 – Modelo NL08.



Seis estados do TS: TS livre (TS); Ca^{2+} ligado ao TS sem PTC's anexas ($TSCa_3$), Ca^{2+} ligado ao TS com PTC's anexas no estado fraco ($TSCa_3$~), Ca^{2+} ligado ao TS com PTC's anexas no estado forte ($TSCa_3$*), TS sem Ca^{2+} com PTC's anexas no estado forte (TS*) e TS sem Ca^{2+} com PTC's anexas no estado fraco (TS~). Q_{rel} e Q_{pump} representam fluxos de Ca^{2+} a partir do retículo sarcoplásmico atuando sobre o mioplasma (Myo). Fonte: Adaptado de (NEGRONI; LASCANO, 2008).

O modelo conta com a implementação do efeito de cooperatividade na formação das PTC's. Cada TS conta com 3 unidades regulatórias de troponina-tropomiosina (RU) onde se ligam Ca^{2+}. A ligação de um Ca^{2+} a uma RU leva a ligação da adjascente, tendo por fim um TS com 3 Ca^{2+} ligados. Para simplificação o modelo considera o TS como uma única grande molécula onde se ligam 3 Ca^{2+}, o chamado critério de Hill para cooperatividade.

Sendo assim, considerando os dois tipos de PTC's do modelo a equação para a força desenvolvida pelo conjunto de PTC's passa a ser:

$$F_b = A_w.([TSCa_3\sim] + [TS\sim]).h_w + A_p.([TSCa_3{}^*] + [TS^*]).h_p \quad (31)$$

Aqui $[TSCa_3\sim]$ e $[TSCa_3{}^*]$ são a concentração de TS's ligados a Ca^{2+}, respectivamente, com formação de PTC's no estado fraco e forte, e $[TS\sim]$ e $[TS^*]$ são

TS's sem a ligação de Ca^{2+}, respectivamente, com formação de PTC's no estado fraco e forte.

Dentre os estados apresentados o estado livre do TS é calculado a partir da seguinte equação:

$$[TS] = [TS_t] - [TSCa_3\sim] - [TSCa_3{}^*] - [TSCa_3] - [TS\sim] - [TS^*] \quad (32)$$

Onde $[TS_t]$ e $[TSCa_3]$ são as concentrações de TS's, respectivamente, total e com ligação ao Ca^{2+} sem formação de PTC's .

Assim como no modelo anterior o tamanho de meio sarcômero também influencia na formação de PTC's. Quando o filamento fino sobrepõe o espesso forma-se a região efetiva. A equação para definir essa região é semelhante a do modelo anterior (Equação 33):

$$[TSCa_3]_{eff} = [TSCa_3].e^{-R.(L-La)^2} \quad (33)$$

Sendo assim, a transição entre os estados é feita através de equações diferenciais acopladas que são apresentadas a seguir:

$$\frac{d[TSCa_3]}{dt} = Y_b.[TS].[Ca^{2+}]_i^3 - Z_b.[TSCa_3] + g.[TSCa_3\sim] - f.[TSCa_3]_{eff} \quad (34)$$

Sendo $[Ca^{2+}]_i^3$ o Ca^{2+} que se liga ao TS, Y_b e Z_b são taxas, respectivamente, de ligação e desligamento de Ca^{2+}, e f e g são taxas, respectivamente, de formação e desprendimento de PTC's.

$$\frac{d[TSCa_3\sim]}{dt} = f.[TSCa_3]_{eff} - g.[TSCa_3\sim] + Z_p.[TSCa_3{}^*] - Y_p.[TSCa_3\sim] \quad (35)$$

Onde Y_p e Z_p são as taxas de transição, respectivamente, de $[TSCa_3\sim]$ para $[TSCa_3{}^*]$ e de $[TSCa_3{}^*]$ para $[TSCa_3\sim]$.

$$\frac{d[TSCa_3{}^*]}{dt} = Y_p.[TSCa_3\sim] - Z_p.[TSCa_3{}^*] + Z_r.[TS^*].[Ca^{2+}]_i^3 - Y_r.[TSCa_3{}^*] \quad (36)$$

Sendo Y_r e Z_r taxas de transição, respectivamente, de $[TSCa_3{}^*]$ para $[TS^*]$ e de $[TS^*]$ para $[TSCa_3{}^*]$.

$$\frac{d[TS^*]}{dt} = Y_r.[TSCa_3{}^*] - Z_r.[TS^*].[Ca^{2+}]_i^3 + Z_q.[TS\sim] - Y_q.[TS^*] \quad (37)$$

Onde Y_q e Z_q são as taxas de transição, respectivamente, de $[TS^*]$ para $[TS\sim]$ e de $[TS\sim]$ para $[TS^*]$.

$$\frac{d[TS\sim]}{dt} = Y_q.[TS^*] - Z_q.[TS\sim] - g_d.[TS\sim] \quad (38)$$

Sendo g_d uma taxa de desprendimento de PTC's.

As taxas g_d e g são dependentes do comprimento do sarcômero, sendo expressas nas seguintes equações:

$$g = Z_a + Y_v.\left(1 - e^{-\gamma.(h_w - h_{wr})^2}\right) \quad (39)$$

Onde Z_a, Y_v, e γ são parâmetros do modelo.

$$g_d = Y_d + Y_c.(L - L_c)^2 + Y_{vd}.\left(1 - e^{-\gamma.(h_w - h_{wr})^2}\right) \quad (40)$$

Sendo Y_d, Y_c e Y_{vd} parâmetros do modelo.

O fluxo de Ca^{2+} para os miofilamentos e chamado de Buffer Troponina e é definido no modelo pela seguinte equação:

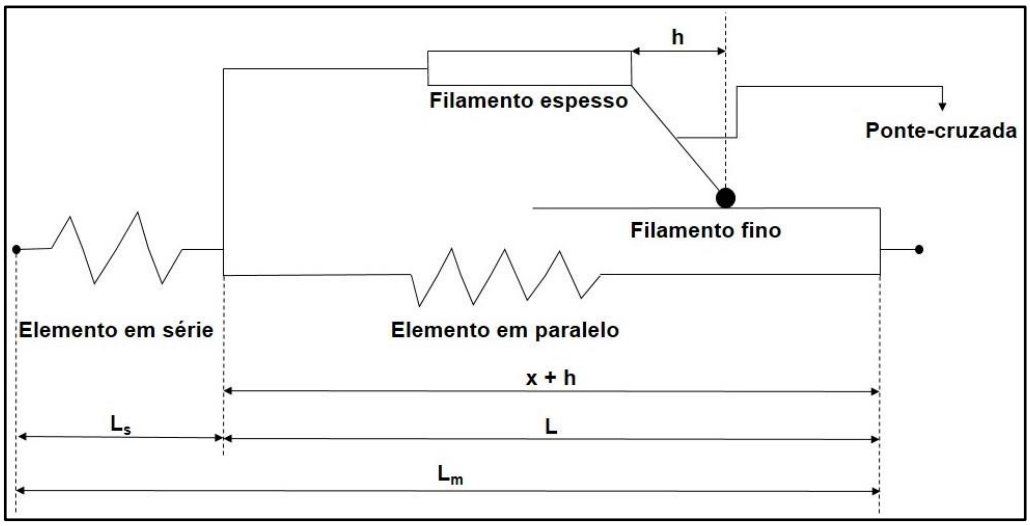
$$I_{tropn} = 3.\left(\frac{d[TSCa_3]}{dt} + \frac{d[TSCa_3\sim]}{dt} + \frac{d[TSCa_3{}^*]}{dt}\right) \quad (41)$$

5.3.3 Negroni *et al.* (2015) – N15

Modelo que adiciona uma nova estrutura no esquema dos miofilamentos que representa a elasticidade das extremidades musculares (Figura 14). A mais

importante alteração desse modelo em relação ao anterior é a redução do número de estados de TS para cinco.

Figura 14 – Unidade muscular composta por meio comprimento do sarcômero (L) composto de filamentos espesso e fino em paralelo com um elemento elástico.



A PTC equivalente representando todas as pontes transversais anexas faz parte do filamento espesso. Ela se fixa ao filamento fino pela extremidade móvel de sua estrutura elástica, com alongamento h, definindo um comprimento x = L - h. Um elemento elástico em série com comprimento L_s é responsável por representar as extremidades musculares conformes e junto com L compõem o comprimento total do músculo (L_m). Fonte: Adaptado de Negroni *et al.* (2015).

A força desenvolvida pelo conjunto é definida pela equação a seguir:

$$F_m = F_b + F_p \tag{42}$$

Onde F_b e F_p são a força desenvolvida, respectivamente, pelo conjunto das PTC's e pelo elemento paralelo.

A força desenvolvida pelo elemento em série é igual a total exercida pelo músculo, pois, o comprimento do meio sarcômero é constante. Sendo assim, a equação da força exercida pelo elemento em série é dada por:

$$F_s = F_m = \alpha.\left(e^{\beta L_s} - 1\right) \tag{43}$$

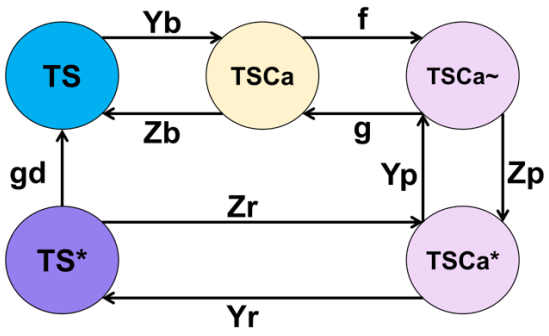
Sendo α e β parâmetros do modelo referentes à elasticidade.

Com isso, o comprimento total do músculo passa a ser a soma dos comprimentos, respectivamente, do elemento em série e do meio sarcômero.

$$L_m = L_s + L \tag{44}$$

A principal mudança desse modelo em relação ao anterior é a nova cinética dos miofilamentos que considera 5 estados de TS em vez de 6 (Figura 15). Também foram feitas mudanças em alguns parâmetros de transição dos estados.

Figura 15 – Modelo N15.



O modelo de desenvolvimento da força dos miofilamentos consiste em de 5 estados de TS com ou sem ligação de Ca2+. Cada TS é composto por três unidades reguladoras de troponina adjacentes capazes de agir cooperativamente para ligar Ca2+ em três etapas sucessivas. Os sistemas de troponina são: TS livre; Ca2+ ligado à TS sem PTC's ligadas (TSCa3), Ca2+ ligado à TS com PTC's ligadas no estado fraco (TSCa3~), Ca2+ ligado à TS com PTC's ligados no estado forte (TSCa3*), e TS sem Ca2+ com PTC's ligadas no estado forte (TS*).

Considerando somente os estados onde há formação de PTC's a força desenvolvida é dada por:

$$F_b = A_w.([TSCa_3\sim]).h_w + A_p.([TSCa_3{}^*] + [TS^*]).h_p \tag{45}$$

Os parâmetros são os mesmos da Equação 31 com apenas a exclusão do estado de [TS~].

A transição entre os estados é descrita através de uma série de equações diferenciais acopladas apresentadas a seguir:

$$\frac{d[TSCa_3]}{dt} = Y_b.[TS].[Ca^{2+}]_i^3 - Z_b.[TSCa_3] + g.[TSCa_3\sim] - f.[TSCa] \quad (46)$$

$$\frac{d[TSCa_3\sim]}{dt} = f.[TSCa_3] - g.[TSCa_3\sim] + Z_p.[TSCa_3{}^*] - Y_p.[TSCa_3\sim] \quad (47)$$

$$\frac{d[TSCa_3{}^*]}{dt} = Y_p.[TSCa_3\sim] - Z_p.[TSCa_3{}^*] + Z_r.[TS^*].[Ca^{2+}]_i^3 - Y_r.[TSCa_3{}^*] \quad (48)$$

$$\frac{d[TS^*]}{dt} = Y_r.[TSCa_3{}^*] - Z_p.[TS^*].[Ca^{2+}]_i^3 - g_d.[TS^*] \quad (49)$$

A resolução das equações fornece a concentração de TS livre que é definida pela seguinte equação:

$$[TS] = [TS_t] - [TSCa_3] - [TSCa_3\sim] - [TSCa_3{}^*] - [TS^*] \quad (50)$$

Nas equações apresentadas os parâmetros Y_b, Z_b, f, g, Y_p, Z_p, Y_r, Z_r, e g_d são de taxa de reação com subscritos b, p, r e d, respectivamente, relacionados à ligação de Ca^{2+}, transição de estado forte, reversão da ligação de Ca^{2+} e dissociação de PTC's. A variável $[TS_t]$ é a concentração total de TS.

Dentre os parâmetros de taxa de reação do modelo, alguns apresentam dependência do tamanho do sarcômero.

$$f = Y_a.e^{-R_a(L-L_a)^2} \quad (51)$$

Onde L_a é o valor do comprimento de meio sarcômero para que ocorra a zona de máxima efetividade para formação de PTC's, R_a um parâmetro que define a curtose da curva e Y_a o valor de de f quando $L = L_a$, ou seja, o valor máximo.

$$g = Z_a + Y_h \quad (52)$$

$$Y_h = F_h.Y_v.\left(1 - e^{-\gamma(h_w - h_{wr})^2}\right) \quad (53)$$

Sendo h_{wr} o valor de h_w (comprimento da PTC em estado fraco) no estado estacionário, γ o parâmetro que define a curtose da curva, Y_v parâmetro que amplifica o desligamento das PTC's, F_h o valor que gera a assimetria e Z_a o valor de de g quando $h_w = h_{wr}$, ou seja, o valor máximo.

$$g_d = Y_d . e^{-Y_c(L-L_c)} \tag{54}$$

Onde L_c determina o comprimento da região do sarcômero na qual g_d varia, Y_c define a taxa de mudança de g_d e Y_d é o valor de g_d para $L = L_c$.

5.4 OS MODELOS DE RICE E COLABORADORES

Modelos para estimar a força de contração do miócito ventricular que utilizam parâmetros de diferentes espécies de mamíferos. Baseiam-se nas hipóteses levantadas no trabalho de Huxley (1957) para a dinâmica dos miofilamentos. Os dois modelos possuem a ideia de permissividade para a formação de PTC's que só é possível através da ativação por Ca^{2+}.

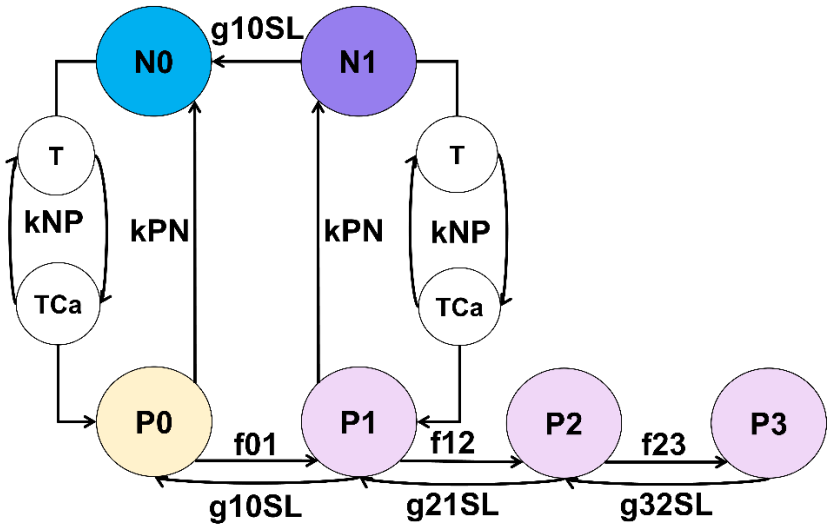
5.4.1 Rice *et al.* (1999) – R99

No trabalho original de Rice *et al.* (1999) são apresentados cinco modelos matemáticos para geração de força isométrica nos miofilamentos cardíacos. Estes foram comparados com dados reportados na literatura. Utilizando os modelos também foram analisados três mecanismos de cooperação na formação da PTC's: *mecanismo 1* - consiste na ideia de que a formação de PTC's aumenta a afinidade do Ca^{2+} com a TnC; *mecanismo 2* - postula que a formação de uma PTC faz com que haja um aumento na taxa de formação de pontes vizinhas; *mecanismo 3* - baseado na ideia de que a interação de ponta a ponta da tropomiosina com a troponina adjacente aumenta a taxa de formação de PTC's.

A construção dos modelos se dá considerando uma unidade funcional de tropomiosina, actina e troponina em que a tropomiosina pode estar em estado permissivo ou não permissivo para a formação de PTC's. O número de PTC's formadas em cada unidade funcional varia em cada modelo podendo chegar até três formações. Dentre os modelos apresentados destaca-se o "Modelo 4" que no trabalho

de Mullins e Bondarenko (2013) foi acoplado a um modelo matemático completo de miócito ventricular de camundongo. Para isso teve seus parâmetros ajustados às especificidades da espécie utilizada no modelo elétrico. O esquema exibido na Figura 16 sintetiza a dinâmica de transição dos estados de tropomiosina.

Figura 16 – Descrição do Modelo R99.



Os estados N0 e N1 são não-permissivos à formação de pontes-cruzadas, porém, o estado N1 possui a formação de uma PTC residual do estado P1 em estado fraco; P0 representa um estado onde há a ligação actina-miosina, porém, fraca. P1, P2 e P3 são estados onde há formação forte de, respectivamente, 1, 2 e 3 PTC's. Cada estado representa uma fração da probabilidade total em que a unidade funcional pode estar (ou seja, N0 + N1 + P0 + P1 + P2 + P3 = 1). As taxas de acoplamento entre os estados permissivos (f01, f12 e f23) possuem fatores multiplicadores onde a formação de uma ponte-cruzada facilita a formação da próxima, implementando assim o *mecanismo 2*. As taxas de desacoplamento (g10, g21 e g32) possuem dependência do tamanho do sarcômero. A transição entre os estados não-permissivos e permissivos é dada através de um parâmetro dependente da ligação de TCa e do tamanho do sarcômero (hNP). Por fim, a transição para os estados não-permissivos é realizada através de uma constante (hPN) adaptada para os parâmetros de camundongo no trabalho de Mullins e Bondarenko (2013). As cores representadas no diagrama possuem correspondência nas Figuras 15 e 17. Fonte: Adaptado de (RICE *et al.*, 1999)

O *mecanismo 3* é o principal meio de cooperação para formação de PTC's no modelo R99. Ele é representado no modelo pela interação de Ca^{2+} com TnC (T e TCa) que é crucial para desencadear a transição dos estados não permissivos (N0 e N1) para os permissivos à formação de PTC's (P0, P1, P2 e P3). Mais detalhes acerca das taxas de transição entre os estados encontram-se na descrição da Figura 15. Como o modelo é baseado nas teorias propostas por Huxley (1957), a força desenvolvida é equivalente ao número de PTC's formadas, sendo assim, os estados N1, P1, P2 e P3 são cruciais nesse processo. A força de contração total no modelo como apresentado em Mullins e Bondarenko (2013) é dada por:

$$F_{contr} = -73{,}26.F_{contrn} \tag{55}$$

Onde F_{contrn} é a força de contração normalizada e -73,26 é um fator de ajuste para dados experimentais de camundongo. Com isso, F_{contrn} é calculada a partir das seguintes equações:

$$F_{max} = P1_{max} + 2.(P2_{max}) + 3.(P3_{max}) \tag{56}$$

$$P1_{max} = \frac{f_{01}.(2.g_{minxb}).(3.g_{minxb})}{\Sigma} \tag{57}$$

$$P2_{max} = \frac{f_{01}.f_{12}.(3.g_{minxb})}{\Sigma} \tag{58}$$

$$P3_{max} = \frac{f_{01}.f_{12}.f_{23}}{\Sigma} \tag{59}$$

$$\begin{aligned}\Sigma = (g_{minxb}).(2.g_{minxb}).(3.g_{minxb}) + f_{01}.(2.g_{minxb}).(3.g_{minxb}) \\ + f_{01}.f_{12}.(3.g_{minxb}) + f_{01}.f_{12}.f_{23}\end{aligned} \tag{60}$$

Com F_{max} sendo a força máxima que pode ser desenvolvida; $P1_{max}$, $P2_{max}$ e $P3_{max}$, os valores máximos que podem assumir, respectivamente, P1, P2 e P3; f_{01}, f_{12} e f_{23} as taxas de transição para os estados com formação, respectivamente, de 1, 2 e 3 PTC's; g_{minxb} o valor base para as taxas de desligamento de PTC's; e Σ o somatório parcial dos termos baseado na regra de King-Altman (KING; ALTMAN, 1956).

A dinâmica de miofilamentos é regida pelo sistema de equações diferenciais acopladas apresentado a seguir:

$$\frac{dN0}{dt} = k_{PN}.P0 + g_{10SL}.N1 - k_{NP}.N0 \tag{61}$$

$$\frac{dN1}{dt} = k_{PN}.P1 - (k_{NP} + g_{10SL}).N1 \tag{62}$$

$$\frac{dP0}{dt} = g_{10SL}.P1 + k_{NP}.N0 - (k_{PN} + f_{01}).P0 \tag{63}$$

$$\frac{dP1}{dt} = g_{21SL}.P2 + f_{01}.P0 + k_{NP}.N1 - (f_{12} + g_{10SL} + k_{PN}).P1 \quad (64)$$

$$\frac{dP2}{dt} = g_{32SL}.P3 + f_{12}.P1 - (f_{23} + g_{21SL}).P2 \quad (65)$$

$$\frac{dP3}{dt} = f_{23}.P2 - g_{32SL}.P3 \quad (66)$$

Nas equações k_{NP} e k_{PN} são, respectivamente, as taxas de transição entre os estados permissivo e não-permissivo à formação de PTC's; e g_{32SL}, g_{21SL} e g_{10SL} são, respectivamente, as taxas para desligamento de 3, 2 e 1 PTC's.

As taxas de transição são descritas nas seguintes equações:

$$f_{01} = 3 * f_{XB} \quad (67)$$

$$f_{12} = 10 * f_{XB} \quad (68)$$

$$f_{23} = 7 * f_{XB} \quad (69)$$

$$g_{10SL} = g_{xbSL} \quad (70)$$

$$g_{21SL} = 2 * g_{xbSL} \quad (71)$$

$$g_{32SL} = 3 * g_{xbSL} \quad (72)$$

Onde f_{XB} e g_{xbSL} são, respectivamente, as taxas base para formação e desligamento de PTC's.

A taxa g_{xbSL} é dependente de SL e é formada a partir da resolução das equações:

$$g_{xbSL} = g_{minxb}.(2 - (SL_{norm})^{1,6}) \quad (73)$$

$$SL_{norm} = \frac{SL - 1{,}3\mu m}{2{,}3\mu m - 1{,}3\mu m} \quad (74)$$

Sendo SL_{norm} o tamanho de SL que gera a menor taxa de desligamento de PTC's.

A taxa k_{PN} é constante diferente de k_{NP} que é definida pela pelas equações:

$$k_{NP} = k_{PN}.\left(\frac{[LTRPNCa]}{[LTRPNCa]_{tot}.K_{half}}\right)^{Ntm} \tag{75}$$

$$Ntm = 5 + 3.SL_{norm} \tag{76}$$

$$K_{half} = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_{Ca}}{1{,}5\mu M - SL_{norm}.1{,}0\mu M}\right)} \tag{77}$$

$$K_{Ca} = \frac{k_{ltrpn}^{-}}{k_{ltrpn}^{+}} \tag{78}$$

Nas equações, $[LTRPNCa]$ e $[LTRPNCa]_{tot}$ são as concentrações de Ca^{2+} associadas aos sítios de troponina de baixa afinidade, respectivamente, instantânea e total; K_{half} é metade da concentração máxima de Ca^{2+}-TnC; Ntm é o coeficiente de Hill que nesse caso representa a cooperatividade para a associação Ca^{2+}-TnC; K_{Ca} é o coeficiente de dissociação aparente de Ca^{2+} da TnC, também chamado nesse trabalho de K_d; k_{ltrpn}^{-} é o coeficiente de dissociação Ca^{2+}-TnC (k_{off}); e k_{ltrpn}^{+} é o coeficiente de associação Ca^{2+}-TnC (k_{on}).

As concentrações de Ca^{2+} associadas aos sítios de TnC de baixa ($[LTRPNCa]$) e alta ($[HTRPNCa]$) afinidade são definidas na resolução das seguintes equações diferenciais:

$$\frac{d[LTRPNCa]}{dt} = k_{ltrpn}^{+}.[Ca^{2+}]_i.\{[LTRPNCa]_{tot} - [LTRPNCa]\} - k_{ltrpn}^{-}.[LTRPNCa] \tag{79}$$

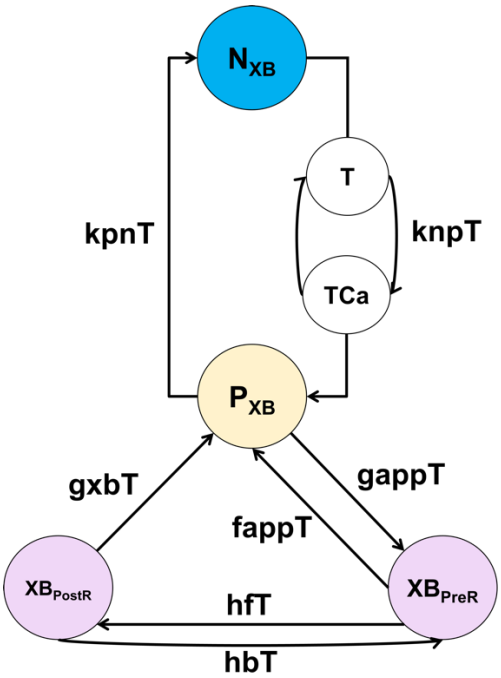
$$\frac{d[HTRPNCa]}{dt} = k_{htrpn}^{+}.[Ca^{2+}]_i.\{[HTRPNCa]_{tot} - [HTRPNCa]\} - k_{htrpn}^{-}.[HTRPNCa] \tag{80}$$

5.4.2 Rice *et al.* (2008) – R08

Modelo apresentado no trabalho de Rice *et al.* (2008) que possui a capacidade de simular a força de contração sob uma grande variedade de condições: tamanho do músculo fixo com variações em SL – isométrica, SL e músculo fixos – isosarcométrica

e contração durante a pressão exercida pelo volume sanguíneo – isotônica. Esse aspecto do modelo permite a representação de diversos protocolos experimentais. Inclui um detalhamento da parte geométrica do sarcômero e parâmetros dependentes de temperatura. O modelo completo leva em consideração diversos aspectos do músculo, como a viscosidade, massa e propriedades elásticas das extremidades do sarcômero. O modelo é construído considerando que uma unidade regulatória (UR) de troponina e tropomiosina que pode encontrar-se em quatro estados: N_{XB}, P_{XB}, XB_{PreR} e XB_{PostR}. Mais detalhes sobre os parâmetros de transição e estados do modelo podem ser encontrados na descrição da Figura 17.

Figura 17 – Descrição do Modelo R08.



O estado N_{XB} é não-permissivo à formação de pontes-cruzadas. O estado P_{XB} é permissivo à formação de PTC's com Ca^{2+} associado à TnC e como no modelo R08 PTC's em estado fraco não são consideradas relevantes na modelagem, a formação destas está englobada nesse estado. As taxas de transição entre os estados P_{XB} e N_{XB} (knpT e kpnT) possuem dependência no tamanho do sarcômero, ligação de Ca^{2+} com TnC (TCa) e da temperatura. Em XB_{PreR} há formação de PTC's em estado forte com a cabeça de miosina estendida, pois, ainda não ocorreu a isomerização. Esse estado colabora para modelar a rigidez muscular, porém não atua ativamente na força de contração. A transição de P_{XB} para XB_{PreR} é através da taxa fappT que é dependente apenas da temperatura com seus outros parâmetros constantes. A taxa de transição de XB_{PreR} para P_{XB} é dependente de SL e da temperatura. O estado XB_{PostR} é onde ocorre ativamente a contração através da rotação da cabeça de miosina das PTC's. A transição de XB_{PreR} para esse estado é dependente de SL e da temperatura (hfT). Já a taxa de transição de XB_{PostR} para XB_{PreR} é dependente apenas de temperatura (hbT). Por fim, a transição de XB_{PostR} para P_{XB} é através da taxa gxbT que possui dependência em SL e na temperatura. As cores utilizadas no diagrama possuem correspondência nas Figuras 15 e 16. Fonte: Adaptado de (RICE *et al.*, 2008)

A força ativa de contração no modelo é definida pela seguinte equação:

$$F_{active}(x) = SOVF_{thick}(x).\frac{xXB_{PreR}.XB_{PreR} + xXB_{PostR}.XB_{PostR}}{x_0.XB_{PostR}^{Max}} \quad (81)$$

Onde $SOVF_{thick}(x)$ é a região do filamento espesso onde há possibilidade de formação de PTC's dependente de SL no modelo denominado x; XB_{PreR} e XB_{PostR} são os estados, respectivamente, antes e após a rotação da cabeça de miosina; xXB_{PreR} e xXB_{PostR} são o alongamento das PTC's, respectivamente, antes e depois da rotação da cabeça de miosina; x_0 alongamento final da PTC no estado XB_{PostR}; e XB_{PostR}^{Max} é o valor de XB_{PostR} para as condições ótimas.

Os estados transitam entre si através de um sistema de equações diferenciais acopladas que é apresentado a seguir:

$$\frac{d}{dt}N_{XB} = -k_{n_{pT}}.N_{XB} + k_{p_{nT}}.P_{XB} \quad (82)$$

$$\frac{d}{dt}P_{XB} = k_{n_pT}.N_{XB} - \left(k_{p_{nT}} + f_{appT}\right).P_{XB} + g_{appT}.XB_{PreR} + g_{xbT}.XB_{PostR} \quad (83)$$

$$\frac{d}{dt}XB_{PreR} = f_{appT}.P_{XB} - \left(g_{appT} + h_{fT}\right).XB_{PreR} + h_{bT}.XB_{PostR} \quad (84)$$

$$\frac{d}{dt}XB_{PostR} = h_{fT}.XB_{PreR} - (h_{bT} + g_{xbT}).XB_{PostR} \quad (85)$$

Nas equações $k_{n_{pT}}$, $k_{p_{nT}}$, f_{appT}, g_{appT}, h_{fT}, h_{bT} e g_{xbT} são taxas de transição definidas na descrição da Figura 17. As equações correspondentes de cada taxa são apresentadas a seguir:

$$k_{n_pT} = k_{n_p}.permtot.Qk_{n_p}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad (86)$$

$$k_{p_nT} = k_{p_n}.inversepermtot.Qk_{p_n}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad (87)$$

$$f_{appT} = f_{app}.xbmod_{species}.Qf_{app}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad (88)$$

$$g_{appT} = g_{app}.g_{app}slmod.xbmod_{species}.Qg_{app}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad (89)$$

$$g_{app}slmod = 1 + \left(1 - SOVF_{thick}(x)\right).gslmod \quad (91)$$

$$h_{fT} = h_f.h_fmod.xbmod_{species}.Qh_f^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad (92)$$

$$h_fmod = e^{-sign(xXB_{PreR}).hfmdc.\left(\frac{xXB_{PreR}}{x_0}\right)^2} \quad (93)$$

$$h_{bT} = h_b.xbmod_{species}.Qh_b^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad (94)$$

$$gxbmd = \begin{cases} e^{\sigma_p.\left(\frac{(x_0 - xXB_{PostR})}{x_0}\right)^2} \; if \; xXB_{PostR} < x_0 \\ e^{\sigma_n.\left(\frac{(x_0 - xXB_{PostR})}{x_0}\right)^2} \; if \; xXB_{PostR} \geq x_0 \end{cases} \quad (95)$$

$$g_{xbT} = g_{xb}.gxbmd.xbmod_{species}.Qg_{xb}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad (96)$$

Onde k_{n_p}, k_{p_n}, f_{app}, g_{app}, h_f, h_b e g_{xb} são constantes base para as taxas de transição; $TmpC$ é a temperatura da célula; Qk_{n_p}, Qk_{p_n}, Qf_{app}, Qg_{app}, Qh_f, Qh_b e Qg_{xb} são constantes de temperatura das taxas de transição; $permtot$ é a componente que representa a cooperatividade entre a formação de PTC's próximas e $inversepermtot$ é a componente inversa a essa; $xbmod_{species}$ é a constante das taxas de transição referente à espécie do modelo; $g_{app}slmod$ é a componente dependente de SL de g_{appT}; h_fmod e $gxbmd$ são componentes dependentes do alongamento da PTC, respectivamente, das taxas de h_{fT} e g_{xbT}; e $gslmod$, $hfmdc$, σ_p e σ_n são constantes do modelo.

O alongamento da PTC para os estados XB_{PreR} e XB_{PostR} é determinado através das equações diferenciais apresentadas a seguir:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}xXB_{PreR} = {} & \frac{1dSL}{2dt} \\ & + \frac{\phi}{XB_{PreR}^{DutyFract}}.\left[f_{appT}.(-xXB_{PreR})\right. \\ & \left. + h_{bT}.(xXB_{PostR} - x_0 - xXB_{PreR})\right] \end{aligned} \quad (97)$$

$$\frac{d}{dt}xXB_{PostR} = \frac{1dSL}{2dt} + \frac{\phi}{XB_{PostR}^{DutyFract}}.\left[h_{fT}.\left(xXB_{PreR} + x_0 - xXB_{PostR}\right)\right] \quad (98)$$

Sendo ϕ é um termo escalar derivado empiricamente; e $XB_{PreR}^{DutyFract}$ e $XB_{PostR}^{DutyFract}$ representam a ativação total do filamento fino, respectivamente, para os estados XB_{PreR} e XB_{PostR}.

6 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Como embasamento teórico para este trabalho, realizou-se inicialmente uma revisão dos principais modelos de contração muscular. Essa etapa também teve como objetivo comparar os modelos R99, R08, NL96, NL08 e N15 por meio de simulações computacionais, a fim de verificar qual deles seria mais adequado para servir de base à nova proposta de modelagem abordada neste trabalho. Essa etapa resultou no Estado da Arte apresentado na Seção 5 e no artigo descrito na Seção 6.1.

A segunda etapa do projeto envolveu a atualização da ferramenta computacional ForceLAB. O objetivo desse aprimoramento foi preparar um ambiente virtual capaz de simular os cinco modelos estudados e o novo modelo a ser desenvolvido. Os resultados dessa etapa foram apresentados no XXVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica e no IX Congresso Latino-Americano de Engenharia Biomédica de 2022 (CBEB e CLAIB 2022) (Anexo A), resultando na publicação do artigo descrito na Seção 6.2. Posteriormente, a ferramenta ForceLAB, que permite a comparação entre dois dos principais modelos de contração, foi registrada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o número de processo BR512023001669–1 (Anexo B).

Durante o desenvolvimento do trabalho, foi realizada uma etapa de pesquisa no exterior por meio do Programa de Doutorado-Sanduíche no Exterior (PDSE – Processo: 88881.846611/2023-01), viabilizada pela carta de convite do Dr. Donald Bers (Anexo C) e pela supervisão do Prof. Daisuke Sato, vinculado ao *Department of Pharmacology* da *University of California*, *Davis* (https://health.ucdavis.edu/pharmacology/). Nesse período, foram conduzidos testes com o modelo selecionado na etapa de comparação, acoplado ao modelo para miócito ventricular de camundongo de Morotti *et al.* (2014). Esse trabalho resultou no artigo apresentado na Seção 6.3, exposto no XXIX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica de 2024 (CBEB 2024) (Anexo D). Esse trabalho recebeu menção honrosa por meio da premiação SBEB Sérgio Santos Mühlen, na sessão em que foi apresentado (Anexo E).

Ainda nesse período, em colaboração com o Prof. Dr. Jose Luis Puglisi e com base no trabalho de mestrado do discente Gabriel Marcos de Souza Motta, foi realizada a coautoria de um artigo que propõe uma nova abordagem para modelos de célula cardíaca, denominada *Feed Forward Modeling* (Apêndice E).

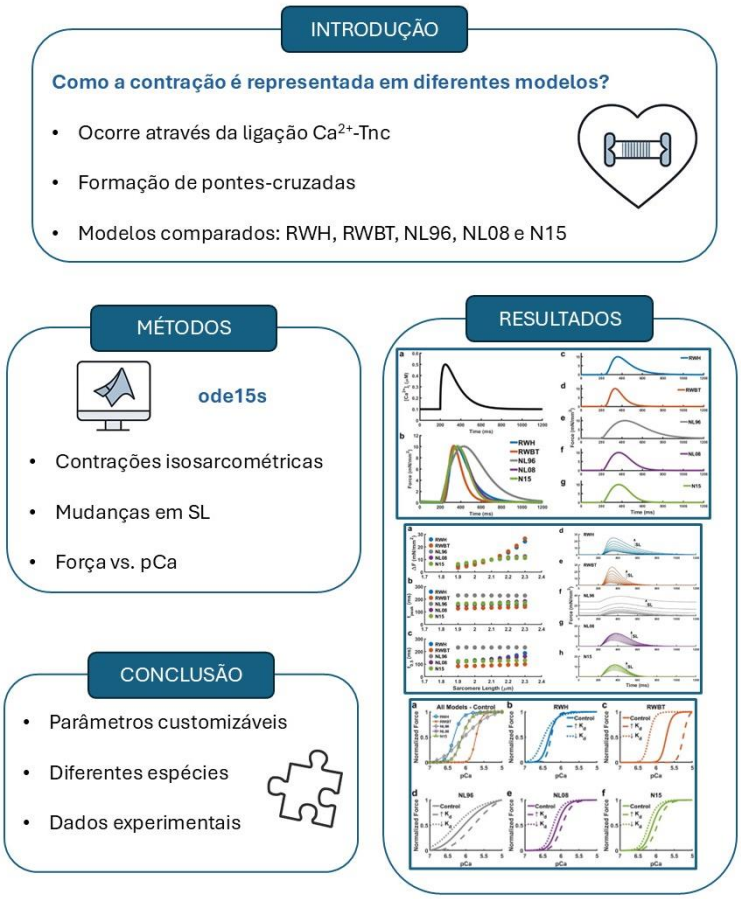
A partir dessas etapas e colaborações, consolidaram-se a ideia principal e as condições para o desenvolvimento de um novo modelo de contração cardíaca em roedores para diferentes temperaturas, incluindo a fisiológica, conforme apresentado na Seção 6.4.

6.1 REVISÃO E COMPARAÇÃO DE MODELOS PARA DINÂMICA DOS MIOFILAMENTOS

Título: Análise e Comparação de Cinco Modelos Matemáticos que Descrevem a Dinâmica dos Miofilamentos Durante a Contração de Miócitos Ventriculares

Revista para submissão: Mathematical Modelling of Natural Phenomena

Hipótese: Modelos matemáticos mais recentes, que incorporam mecanismos cooperativos na ligação de Ca^{2+} à troponina e parâmetros ajustados para camundongos, são mais eficazes em representar as propriedades dinâmicas da contração miocárdica do que modelos mais antigos.



ANÁLISE E COMPARAÇÃO DE CINCO MODELOS MATEMÁTICOS QUE DESCREVEM A DINÂMICA DOS MIOFILAMENTOS DURANTE A CONTRAÇÃO DE MIÓCITOS VENTRICULARES

Matheus Leonardo Alves de Camargo[1*], Daisuke Sato[2], José Wilson Magalhães Bassani[3], Rosana Almada Bassani[3], Robson Rodrigues da Silva[1,3]

[1]Núcleo de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brasil

[2]Department of Phamacology, University of California, Davis, CA, Unites States of America

[3]LabNECC, Centro de Engenharia Biomédica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Autor correspondente: [*]matheus.leonardo675@gmail.com

ORCID's: 0000-0002-4071-8741; 0000-0001-9341-0970; 0000-0003-4202-6420; 0000-0002-6453-1359; 0000-0003-1082-0777

RESUMO

Objetivo: A contração cardíaca ocorre nos sarcômeros, onde os miofilamentos de actina e miosina interagem. A ligação de cálcio (Ca^{2+}) à troponina C (TnC) facilita a formação de pontes cruzadas entre actina e miosina, levando ao encurtamento do sarcômero e à contração. Modelos matemáticos que descrevem a dinâmica dos miofilamentos foram desenvolvidos com base em diversas formulações e dados experimentais. Este estudo compara cinco modelos: dois de Rice *et al.* (R99, R08) e três de Negroni *et al.* (NL96, NL08, N15), com foco em *twitches* de contração e contrações em estado estacionário, incluindo a dependência do comprimento do sarcômero (SL) e a sensibilidade ao Ca^{2+}. **Métodos:** Os modelos foram simulados no MATLAB R2019a utilizando o solucionador ode15s para equações diferenciais acopladas. Um transiente de Ca^{2+} paramétrico uniforme representando um *twitch* de contração limitou a análise às características específicas dos miofilamentos. As forças de contração isossarcométrica foram medidas em diferentes SL, e as relações força-pCa (logaritmo negativo da concentração citosólica de Ca^{2+}) foram avaliadas. **Resultados:** Os modelos mais recentes representaram melhor a contração dos cardiomiócitos. Variações no perfil temporal do *twitch*, na dependência de SL e na resposta de força em estado estacionário frente a mudanças na afinidade da TnC por Ca^{2+} foram associadas a diferenças na formulação dos processos de contração e a dados específicos por espécie. **Conclusão:** Este estudo destaca a necessidade de modelos de contração com parâmetros dependentes da espécie e personalizáveis, permitindo maior flexibilidade de simulação e melhor alinhamento com os dados experimentais.

Palavras-chave: Contração Cardíaca, Miócito Ventricular, Modelagem Matemática, Miofilamentos, Cálcio.

INTRODUÇÃO

A principal função do coração é bombear sangue para a circulação e, assim, para todos os tecidos do corpo. Esse processo é impulsionado principalmente pela contração sincronizada das células miocárdicas que compõem as câmaras ventriculares. A organela contrátil dessas células é a miofibrila, formada por unidades elementares chamadas sarcômeros. Os sarcômeros estão dispostos em série e são compostos por filamentos constituídos de complexos proteicos com organização entrelaçada. A actina e a miosina são os principais componentes dos filamentos fino e espesso do sarcômero, respectivamente, e sua interação é essencial para a contração [1]. As cabeças de miosina que se projetam sobre os filamentos finos e se ligam à actina formam estruturas conhecidas como pontes cruzadas, que, ao sofrerem uma mudança conformacional, provocam o deslizamento dos filamentos finos em direção ao centro do sarcômero, gerando encurtamento e/ou tensão [2].

No sarcômero em repouso, o sítio de ligação da miosina na actina encontra-se obstruído pela tropomiosina. No entanto, esse sítio é exposto após a ligação de Ca^{2+} a outra proteína do filamento fino, a troponina C (TnC), desencadeando uma alteração conformacional no complexo proteico. A concentração de Ca^{2+} no mioplasma ($[Ca^{2+}]i$) é transitoriamente elevada em resposta ao potencial de ação, quando a entrada de Ca^{2+} por canais do tipo L desencadeia a liberação de grandes quantidades de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) por meio do mecanismo de liberação induzida por Ca^{2+}. O aumento de $[Ca^{2+}]_i$ favorece a ligação do íon à TnC, iniciando a formação das pontes cruzadas [3]. Esse processo tem sido foco de diversos estudos desde a publicação da teoria da contração por deslizamento dos filamentos, de Huxley [4,5].

Mesmo antes da elaboração do conceito de pontes cruzadas, Hill propôs, em 1938, um modelo reológico da contração com base em estudos sobre o gasto energético do músculo, a velocidade de encurtamento, o trabalho mecânico e a força contrátil [6]. No entanto, a modelagem matemática da contração muscular teve um avanço decisivo cerca de 20 anos depois com as teorias desenvolvidas por Huxley, nas quais a força de contração é proporcional ao número de pontes cruzadas formadas [4,5]. A partir desse pressuposto, surgiram diversas

formulações para modelar esse fenômeno. A abordagem pode ser bioquímica, considerando a contração como resultado de interações energéticas entre as proteínas miofilamentares [7–9]. Já a proposta de Gray e Gonda [10,11] utilizou uma abordagem baseada na mecânica quântica, o que exemplifica a diversidade de conceitos que fundamentam a modelagem da contração muscular.

Os modelos podem ser baseados em dados experimentais obtidos de preparações de diferentes espécies, como cobaia [12], furão [13], coelho [14], cão [15], roedores [16] e rã [17], embora nem todos os modelos os utilizem [18,19]. Dessa forma, os modelos continuam em constante evolução e precisam ser continuamente avaliados à luz de dados experimentais. É essencial compreender que os modelos matemáticos contribuem para o avanço do conhecimento, atuando como ferramentas para melhor compreender o fenômeno da contração cardíaca, independentemente do nível de complexidade envolvido [20].

Em um estudo anterior [21], comparamos duas formulações comumente utilizadas para simular a contração miocárdica: os modelos publicados por Rice *et al.* em 1999 (R99) [22] e o proposto por Negroni & Lascano em 2008 (NL08) [23]. Utilizando o mesmo comprimento sarcomérico constante e os dados de entrada de um modelo eletrofisiológico para ventrículo de roedor [24], obtivemos contrações do tipo twitch com amplitudes semelhantes e pequenas diferenças no tempo de resposta. No entanto, ao simular a relação entre força em estado estacionário e pCa (isto é, o logaritmo negativo da concentração molar de Ca^{2+}), apenas o modelo NL08 foi capaz de gerar curvas paralelas para diferentes valores da constante de dissociação de equilíbrio (K_d) do Ca^{2+} na TnC, como esperado [21]. Mais recentemente, versões atualizadas de ambos os modelos foram propostas por Rice *et al.* em 2008 (R08) [25] e por Negroni *et al.* em 2015 (N15) [26].

O objetivo do presente estudo é comparar o desempenho de R08 e N15 com os modelos anteriores, a saber, R99, NL08 e NL96 — um modelo mais antigo publicado por Negroni & Lascano (NL96) [27] — na simulação de contrações do tipo twitch e da relação força-pCa em estado estacionário.

MATERIAIS E MÉTODOS

Uma Breve Descrição dos Modelos Comparados

Modelo NL96: Este modelo baseia-se em quatro postulados:
(i) a força é gerada por pontes cruzadas, cujo número é proporcional ao comprimento do sarcômero (SL);
(ii) a força desenvolvida pelas pontes cruzadas é proporcional ao alongamento de sua estrutura elástica;
(iii) quando o SL não varia, o alongamento das pontes cruzadas permanece constante; e, quando o SL muda, o comprimento das pontes cruzadas é reajustado para novas posições ao longo do filamento fino por meio do desprendimento e reatamento das pontes cruzadas;
(iv) o aumento da taxa de dissociação das pontes cruzadas durante as variações de SL depende da taxa de reajuste do comprimento dessas pontes cruzadas.

O modelo apresenta um esquema para a dinâmica dos miofilamentos que descreve diferentes estados do sistema de troponina (TS), relacionando a associação Ca^{2+}–TnC e a formação de pontes cruzadas (Figura 1A). No estado T, o sítio de ligação ao Ca^{2+} da TnC está livre. No estado TCa, o Ca^{2+} se liga à TnC, mas sem formação de pontes cruzadas. No estado TCa*, o Ca^{2+} está ligado à TnC e ocorre a associação actina-miosina nas regiões onde há sobreposição entre os filamentos fino e espesso. A transição de TCa para TCa* depende do tamanho da região efetiva (TCa_{eff}, onde as pontes cruzadas podem ser formadas, ou seja, a zona de sobreposição dos filamentos), que, por sua vez, depende do SL. No estado T*, as pontes cruzadas estão em estado de força, mas o Ca^{2+} já se dissociou da TnC. As transições entre os estados são governadas pelas constantes de taxa Y1, Z1, Y2, Z2, Y3, Z3 e Y4.

De acordo com o postulado (i) do modelo, a força desenvolvida pelas pontes cruzadas é expressa, após normalização pela área da secção transversal do músculo (F_{NL96}, em mN/mm²), como:

$$F_{NL96} = A.([TCa^*] + [T^*]).(L - X) \quad (1)$$

onde A representa o componente constante da equação, definido como o produto da constante de Avogadro pelo volume da unidade muscular; L é o comprimento do hemissorcômero; e X é a região não elástica composta por metade do filamento espesso mais o comprimento não sobreposto do filamento fino. O modelo completo está descrito no artigo de 1996 de Negroni & Lascano [27]. Em Silva *et al.* (2021) [21], o modelo NL08 foi modificado para se ajustar a dados experimentais de camundongos. Para as simulações do presente estudo, o modelo NL96 foi calibrado com base na versão ajustada do modelo NL08 apresentada por Silva *et al.* [21]. Detalhes adicionais sobre os ajustes do modelo podem ser encontrados no material suplementar.

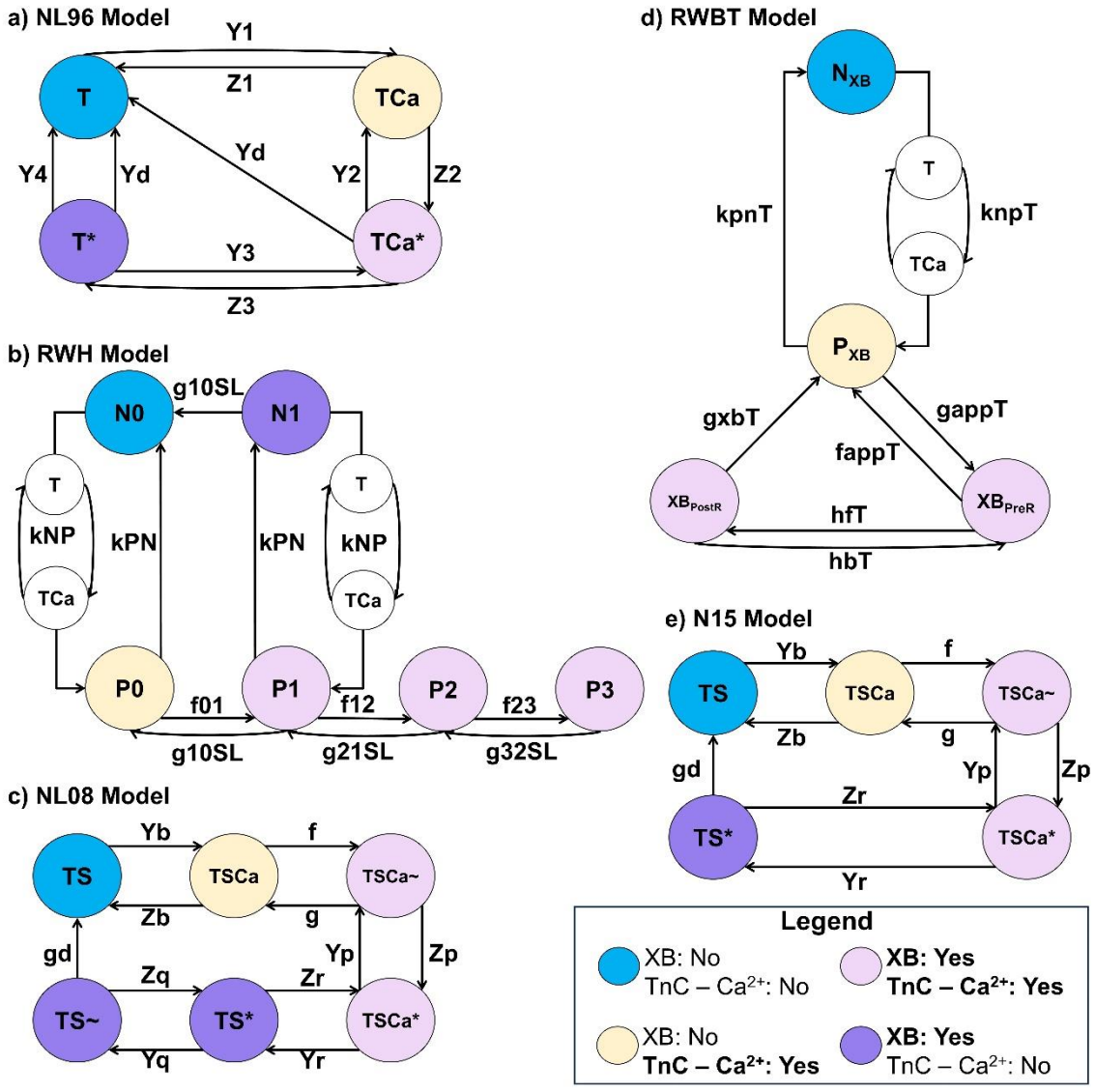


Figura 1. Diagramas de estados para os modelos NL96 [27] (A), NL08 [23] (B), R99 [22] (C), R08 [25] (D) e N15 [26] (E). Na legenda, “XB” denota a formação de pontes

cruzadas, P e N indicam, respectivamente, estados permissivos e não permissivos para a formação das pontes cruzadas. “TnC–Ca^{2+}” representa a interação entre a troponina C e o Ca^{2+}. Para mais detalhes, veja o texto.

Modelo R99: No artigo de 1999 de Rice *et al.* [22], foram desenvolvidos cinco modelos matemáticos para a geração de força isométrica por sarcômeros cardíacos, e seus resultados foram comparados com dados reportados na literatura. Os modelos assumiram diferentes configurações de três mecanismos cooperativos na formação das pontes cruzadas:

(i) mecanismo 1, no qual a formação da ponte cruzada aumenta a afinidade da TnC pelo Ca^{2+};

(ii) mecanismo 2, no qual a formação da ponte cruzada aumenta a taxa de formação de pontes cruzadas vizinhas, e múltiplas pontes cruzadas podem sustentar a ativação independente de Ca^{2+};

(iii) mecanismo 3, no qual se assume que a interação de extremidade a extremidade da tropomiosina com moléculas adjacentes de troponina (Tn) aumenta a taxa de formação de pontes cruzadas.

Em todos os modelos, a miosina está associada a uma unidade funcional composta por actina, Tn e tropomiosina, sendo que esta última pode estar em estado permissivo ou não permissivo para a formação de pontes cruzadas. No modelo 4 (selecionado para implementação no presente estudo), o número de pontes cruzadas formadas em cada unidade funcional varia de uma a três.

A formação cooperativa das pontes cruzadas é alcançada principalmente pelos mecanismos 2 e 3. Este último é representado no modelo pela interação do Ca^{2+} com a TnC (estados T e TCa), que é crucial para desencadear a transição dos estados não permissivos (N0 e N1) para os estados permissivos para formação de pontes cruzadas (P0, P1, P2 e P3) (Figura 1B). A interação fraca entre actina e miosina ocorre no estado P0, enquanto a interação forte com formação de 1, 2 ou 3 pontes cruzadas ocorre nos estados P1, P2 e P3, respectivamente. Embora N1 seja um estado não permissivo, uma ponte residual fraca do estado P1 está presente. Cada estado é representado como uma fração de probabilidade (isto é, N0 + N1 + P0 + P1 + P2 + P3 = 1). As taxas de ligação das pontes cruzadas (f_{01}, f_{12} e f_{23}) possuem multiplicadores para implementar o mecanismo 2, ou seja, a formação de uma ponte facilita a formação de outra,

enquanto as taxas de desligamento (g_{10}, g_{21} e g_{32}) dependem do comprimento do sarcômero (SL).

A transição entre estados não permissivos e permissivos depende tanto da ligação Ca^{2+}–TnC quanto do SL, resumida pela constante h_{NP} na formulação apresentada por Mullins & Bondarenko [24]. No referido artigo, a transição para os estados não permissivos foi expressa pela constante h_{PN}, ajustada para reproduzir dados experimentais de cardiomiócitos de camundongo, e foi utilizada no presente estudo.

Assim como o modelo R99 é baseado na proposta de Huxley [4], a força desenvolvida é equivalente ao número de pontes cruzadas formadas (estados N1, P1, P2 e P3). A força de contração normalizada (F_{R99}, em mN/mm²) é dada por:

$$F_{RWH} = \alpha . \frac{P1 + N1 + 2.(P2) + 3.(P3)}{P1_{max} + 2.P2_{max} + 3.P3_{max}} \quad (2)$$

onde α (em mN/mm²) é um parâmetro de ajuste implementado por Mullins & Bondarenko [24], e P1max, P2max e P3max representam as condições ótimas para o desenvolvimento da força máxima. Mais detalhes sobre a construção do modelo podem ser encontrados em Rice *et al.* [22], Mullins & Bondarenko [24] e no material suplementar.

Modelo NL08: O modelo publicado por Negroni & Lascano em 2008 [23] representa uma expansão do modelo anterior NL96. As principais mudanças estão relacionadas à dinâmica dos miofilamentos e à cinética do Ca^{2+}. No novo modelo, cada complexo de troponina (TS) é composto por três unidades regulatórias (RU), cada uma contendo um único sítio de ligação para Ca^{2+}, de modo que o TS pode ligar cooperativamente três íons Ca^{2+}. Outro aspecto importante implementado é o conceito de dois estados das pontes cruzadas: um estado fraco, com ligação actina-miosina mas sem desenvolvimento de força, e um estado forte, no qual a ponte cruzada gera força contrátil.

Foi desenvolvido um esquema de seis estados para a dinâmica dos miofilamentos (em comparação aos dois estados do modelo anterior) (Figura 1C), a saber:

a) TS (sem ligação de Ca^{2+});
b) TSCa (Ca^{2+} ligado ao TS sem formação de ponte cruzada);
c) TSCa~ (Ca^{2+} ligado ao TS com formação fraca de ponte cruzada);
d) TSCa* (Ca^{2+} ligado ao TS com formação forte de ponte cruzada);
e) TS* (formação forte de ponte cruzada sem ligação de Ca^{2+} ao TS);
f) TS~ (formação fraca de ponte cruzada sem ligação de Ca^{2+} ao TS).

Como no modelo anterior, a transição de TSCa para TSCa~ depende de uma região efetiva para a formação de pontes cruzadas (TCa_{eff}). As constantes de taxa g e g_d dependem da extensão das pontes cruzadas, que, por sua vez, depende do comprimento do sarcômero (SL). Todas as transições são governadas pelas constantes de taxa f, Y_b, Z_b, Y_p, Z_p, Y_r, Z_r, Y_q e Z_q. A força contrátil desenvolvida pelas pontes cruzadas (F_{NL08}) é descrita por:

$$F_{NL08} = A_w.([TSCa\sim] + [TS\sim]).h_w + A_p.([TSCa^* + TS^*]).h_p \qquad (3)$$

onde A_w e A_p são constantes relacionadas ao número de pontes cruzadas nos estados fraco e forte, respectivamente, e h_w e h_p indicam o alongamento médio das pontes cruzadas nesses estados.

Modelo R08: O modelo proposto por Rice *et al.* em 2008 [25] tem a capacidade de simular a força contrátil sob uma ampla variedade de condições de comprimento do sarcômero e do músculo (ou seja, condições isométricas, isosarcométricas e isotônicas), o que permite a representação de diversos protocolos experimentais. Inclui vários parâmetros dependentes da temperatura e da geometria do sarcômero. O modelo completo considera ainda diversos outros aspectos, como viscosidade, massa e propriedades elásticas das extremidades do sarcômero.

O modelo assume uma unidade regulatória (RU) de troponina e tropomiosina que pode assumir quatro estados (Figura 1D):
a) um estado não permissivo para formação de pontes cruzadas (N_{XB});
b) um estado permissivo para formação de pontes cruzadas com Ca^{2+} ligado à TnC, mas cuja interação é fraca ou sem ligação efetiva (P_{XB});

c) um estado permissivo para ligação forte da ponte cruzada, no qual a cabeça de miosina está estendida (XB_{PreR});
d) estado semelhante ao anterior, exceto que a cabeça de miosina rotacionou e induziu tensão no “pescoço” flexível (XB_{PostR}).

As constantes de taxa de transição entre os estados P_{XB} e N_{XB} (k_{npT} e k_{pnT}, respectivamente) dependem do comprimento do sarcômero (SL), da ligação de Ca^{2+} à TnC e da temperatura. A ligação da ponte cruzada no estado XB_{PreR} contribui para a rigidez muscular, mas não participa ativamente da força contrátil. As constantes de taxa de transição de PXB para esse estado (f_{appT}) e de XB_{PostR} para XB_{PreR} (h_{bT}) dependem apenas da temperatura. As constantes de transição de XB_{PreR} para P_{XB} (g_{appT}) e para XB_{PostR} (h_{fT}), e do último estado para P_{XB} (g_{xbT}) dependem tanto de SL quanto da temperatura.

Para as simulações deste estudo, o modelo foi utilizado no modo isosarcométrico, e o termo $SOVF_{thick}(x)$ [25] foi removido para se obter diretamente a força ativa em sua unidade padrão (mN/mm²), sem escala adicional para a geometria do sarcômero. Neste modelo, a força de contração (F_{R08}) foi formulada como:

$$F_{RWBT} = \beta . \frac{xXB_{PostR} . XB_{PostR}}{x_0 . XB_{PostR}^{Max}} \quad (4)$$

onde β é um parâmetro empírico para ajustar o modelo aos dados de camundongo, xXB_{PostR} é a distorção média das pontes cruzadas no estado XB_{PostR}, x_0 é a distorção média das pontes cruzadas nos estados fortemente ligados, e XB^{Max}_{PostR} é o número máximo possível de unidades regulatórias (RUs) no estado XB_{PostR} sob condições ótimas. Os detalhes completos do modelo estão disponíveis em Rice *et al.* [25].

Modelo N15: Este modelo, que abrange uma parte significativa das estruturas estabelecidas no modelo anterior (NL08), foi desenvolvido para ser acoplado a um modelo elétrico de coelho com formulação para simular os efeitos da estimulação β-adrenérgica. A principal mudança está na dinâmica dos miofilamentos, agora representada por cinco estados (Figura 1E):
a) sem ligação de Ca^{2+} à TnC (TS);

b) ligação de Ca^{2+} à TnC sem formação de ponte cruzada (TSCa);
c) ligação de Ca^{2+} à TnC e formação fraca de ponte cruzada (TSCa~);
d) ligação de Ca^{2+} à TnC e formação forte de ponte cruzada (TSCa*);
e) formação forte de ponte cruzada sem ligação de Ca^{2+} à TnC (TS*).

Há poucas diferenças em relação ao modelo NL08, como a exclusão do estado TS~ e a inclusão da dependência do comprimento do sarcômero (SL) na constante de taxa f, que governa a transição de TSCa para TSCa~.

A equação que descreve a força de contração desenvolvida pelas pontes cruzadas com este modelo (F_{N15}) é:

$$F_{N15} = A_w.([TSCa\sim]).h_w + A_p.([TSCa^* + TS^*]).h_p \quad (5)$$

onde A_w e A_p são constantes relacionadas ao número de pontes cruzadas nos estados fraco e forte, respectivamente, e h_w e h_p indicam o alongamento médio das pontes cruzadas nesses estados. O modelo completo está apresentado em Negroni *et al.* [26].

No presente estudo, os modelos comparados foram adaptados para se adequar aos parâmetros de camundongo, conforme realizado em um estudo anterior [21]. Mais detalhes sobre as modificações podem ser encontrados no material suplementar. Os modelos foram implementados no MATLAB R2019a e resolvidos utilizando a função ode15s. As simulações foram conduzidas em um computador desktop (Dell, OptiPlex7050) com sistema operacional Windows 10 (64 bits) e processador Dual Core Intel® Core™ i7 (CPU 7700, 3,60 GHz).

Protocolos de Simulação

Contrações Fásicas do Tipo Twitch: Para simular uma elevação de $[Ca^{2+}]_i$ evocada por um potencial de ação, que atua como gatilho para uma contração do tipo *twitch*, foi gerado um transiente paramétrico de Ca^{2+} de acordo com a seguinte equação (Figura 2A):

$$[Ca^{2+}]_i = [Ca^{2+}]_{io} + \Delta[Ca^{2+}].\left(\frac{t - t_{ap}}{t_i}\right)^{n_i}.e^{n_i.\left(1-\left(\frac{t-t_{ap}}{t_i}\right)\right)} \quad (6)$$

onde $[Ca^{2+}]_{io}$ é a concentração diastólica de Ca^{2+} intracelular, $\Delta[Ca^{2+}]$ é a amplitude do transiente de Ca^{2+} (ou seja, o pico de $[Ca^{2+}]_i$ menos $[Ca^{2+}]_{io}$), t é a duração total da simulação, t_{ap} é o instante em que o transiente se inicia, t_i é o tempo até o pico do transiente de Ca^{2+}, e n_i é um parâmetro de ajuste exponencial que corresponde a uma variável quantitativa associada à cinética de abertura e fechamento do canal de cálcio tipo L.

O mesmo transiente de Ca^{2+} foi utilizado como entrada para todos os modelos comparados, com os seguintes valores dos parâmetros: t = 1200 ms; $[Ca^{2+}]_{io}$ = 0,1 μM; $\Delta[Ca^{2+}]$ = 0,4 μM; t_{ap} = 200 ms; t_i = 50 ms; e n_i = 0,5.
Foram realizados dois tipos de simulação para cada modelo:

Experimento 1: força de contração tipo twitch. Foi simulada uma única contração tipo *twitch* sob condição isosarcométrica (SL = 2,1 μm), utilizando como entrada o transiente paramétrico de Ca^{2+} descrito acima. As seguintes variáveis foram comparadas entre os modelos: força diastólica (F_{dia}), pico de força de contração (F_{peak}), amplitude da contração (ΔF), tempo até o pico da força (t_{peak}) e tempo de meia-relaxação ($t_{0.5}$).

Experimento 2: relação força-comprimento no twitch. Como todos os modelos utilizados neste estudo incluem dependência dos parâmetros do twitch em relação ao comprimento do sarcômero (SL), foram simuladas contrações como no Experimento 1, porém com diferentes valores de SL diastólico, de 1,9 a 2,3 μm. As variáveis comparadas foram ΔF, t_{peak} e $t_{0.5}$.
As unidades de força e das variáveis temporais das contrações simuladas foram mN/mm² e ms, respectivamente.

Força de contração em estado estacionário: Neste protocolo, o desenvolvimento de força em estado estacionário foi simulado em resposta a etapas discretas de concentração de Ca^{2+} no meio miofibrilar, expressa em pCa, ou seja, o logaritmo negativo da concentração molar de Ca^{2+}.

Experimento 3: relação força-pCa. O valor máximo da força gerada foi simulado em diferentes valores de pCa, de 7,0 a 5,0. Cada etapa de pCa teve duração de

1,2 s. A força desenvolvida em cada valor de pCa foi normalizada em relação ao valor máximo. Esse procedimento foi repetido após alteração da sensibilidade da TnC ao Ca^{2+}, modificando-se o valor de K_d da interação TnC–Ca^{2+}. Isso foi realizado por meio do aumento ou diminuição da constante de associação de Ca^{2+} à TnC (k_{on}) por um fator de 3 ($K_d = k_{off} / k_{on}$, onde k_{off} é a constante de dissociação do complexo). Uma função sigmoidal foi ajustada aos pontos de acordo com:

$$F = \frac{F_{max}}{1 + 10^{(pCa - pCa_{50}).n_H}} \quad (7)$$

onde F_{max} é a força máxima, pCa_{50} é o valor de pCa no qual a força é metade da força máxima, e n_H é o coeficiente de Hill da curva.

RESULTADOS

Twitches de Contração Isossarcométricos

Os parâmetros das contrações do tipo twitch desencadeadas pelo transiente paramétrico de Ca^{2+}, simuladas com os modelos NL96, NL08, N15, R99 e R08, são apresentados na Tabela 1, enquanto as contrações estão ilustradas na Figura 2. O uso de uma única forma de onda de entrada e os ajustes realizados nos parâmetros dos modelos para a espécie (camundongo) provavelmente contribuíram para a similaridade na amplitude das contrações simuladas. Pode-se observar que as contrações geradas com os modelos mais recentes (R08 e N15) apresentam uma cinética mais rápida do que as demais.

Tabela 1. Parâmetros das contrações do tipo twitch isosarcométricas (SL = 2,1 μm) apresentadas nas Figuras 2B–G, simuladas com os modelos R99 [22], R08 [25], NL96 [27], NL08 [23] e N15 [26]. F_{dia}: força diastólica; F_{peak}: pico de força; ΔF: amplitude da contração; t_{peak}: tempo até o pico da força; $t_{0.5}$: tempo de meia-relaxação.

Modelo	R99	R08	NL96	NL08	N15
F_{dia} (mN/mm^2)	0,02	0,10	0,26	0,12	0,10
F_{peak} (mN/mm^2)	10,03	10,14	10,04	10,1	10,1
ΔF (mN/mm^2)	10	10,04	9,78	9,98	9,99

t_{peak} (ms)	158	133	229	168	168
$t_{0.5}$ (ms)	141	91	243	140	128

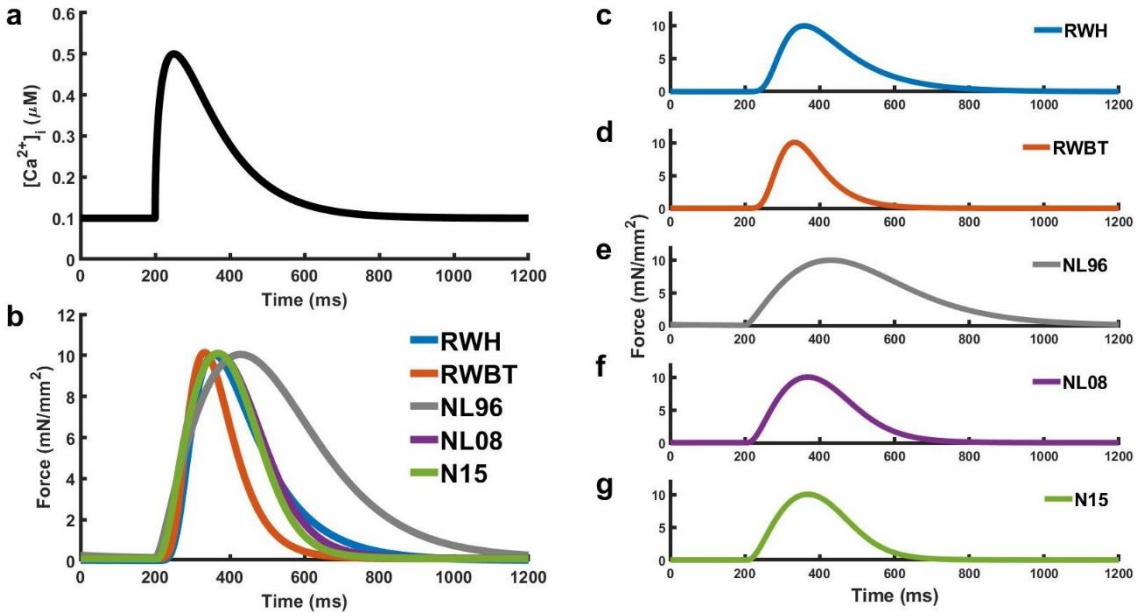


Figura 2. (A) Transiente paramétrico de Ca^{2+} utilizado como única forma de onda de entrada nas simulações com todos os modelos. (B) Contrações do tipo twitch isosarcométricas sobrepostas, geradas com os modelos R99, R08, NL96, NL08 e N15, as quais são apresentadas separadamente nos painéis C, D, E, F e G, respectivamente. Os parâmetros das contrações estão apresentados na Tabela 1.

Relação Força-Comprimento na Contração do Tipo Twitch

A influência do comprimento do sarcômero (SL) na contração do tipo twitch isossarcométrica, conforme simulada com os modelos NL96, NL08, N15, R99 e R08, é apresentada na Figura 3. A coluna da esquerda (Figuras 3A–C) ilustra a relação entre SL e os parâmetros ΔF, t_{peak} e $t_{0.5}$, enquanto a coluna da direita (Figuras 3D–H) mostra a progressão das curvas de contração isossarcométrica conforme o SL aumenta em cada modelo.

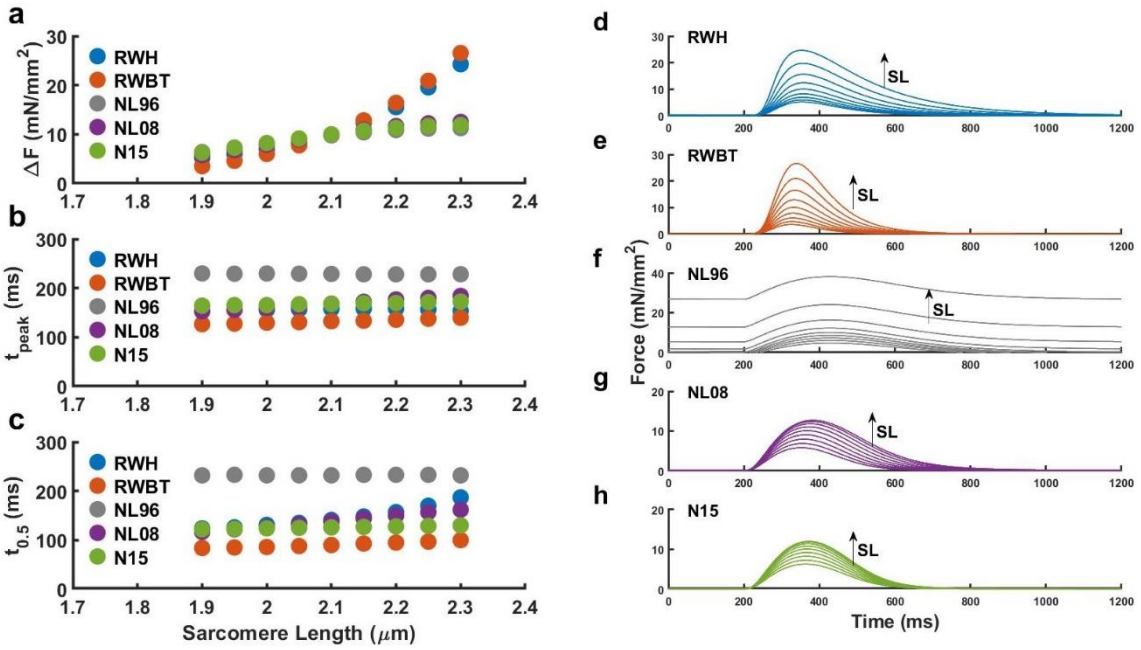


Figura 3. Relação entre os parâmetros da contração e o comprimento de repouso do sarcômero (SL) para contrações do tipo twitch simuladas com os modelos R99, R08, NL96, NL08 e N15. (A) Amplitude da força desenvolvida na contração twitch (ΔF). (B) Tempo até o pico da força (t_{peak}). (C) Tempo de meia-relaxação ($t_{0.5}$). Os traçados das contrações twitch simuladas com os modelos R99 [22], R08 [25], NL96 [27], NL08 [23] e N15 [26] são apresentados nos painéis D, E, F, G e H, respectivamente.

Relação Força-pCa

As curvas sigmoides que representam a relação entre força em estado estacionário e pCa nas simulações realizadas com os cinco modelos estão apresentadas na Figura 4, enquanto os parâmetros dessas curvas estão na Tabela 2. As curvas da Figura 4A foram simuladas utilizando os valores originais de K_d para a ligação Ca^{2+}-TnC de cada modelo (controle na Tabela 2), ao passo que as Figuras 4B–F mostram os conjuntos de curvas para cada modelo, nos quais o respectivo valor de K_d foi aumentado (↑K_d) ou diminuído (↓K_d) por um fator de 3.

Tabela 2. Parâmetros das curvas força-pCa apresentadas na Figura 4, simuladas com os modelos R99 [22], R08 [25], NL96 [27], NL08 [23] e N15 [26], respectivamente. pCa: logaritmo negativo da concentração molar de Ca^{2+}; K_d: constante de equilíbrio da dissociação Ca^{2+}-TnC; ↓K_d: K_d diminuído em 3 vezes; ↑K_d: K_d aumentado em 3 vezes; pCa_{50}: valor de pCa correspondente a 50% da força máxima; n_H: coeficiente de Hill.

	Controle			(↓ K_d)			(↑ K_d)		
Modelos	**pCa_{50}**	**n_H**	**K_d**	**pCa_{50}**	**n_H**	**K_d**	**pCa_{50}**	**n_H**	**K_d**
R99	6.33	3.4	0.6	6.48	2.29	0.2	6.28	4.25	1.8
R08	5.73	5.58	7.72	6.2	5.14	2.57	5.26	4.12	23.16
NL96	6.06	1.78	0.77	6.28	1.48	0.26	5.79	2	2.31
NL08	6.11	3.52	0.77	6.22	3.45	0.26	5.97	3.45	2.31
N15	6.1	3.54	0.77	6.22	3.47	0.26	5.97	3.47	2.31

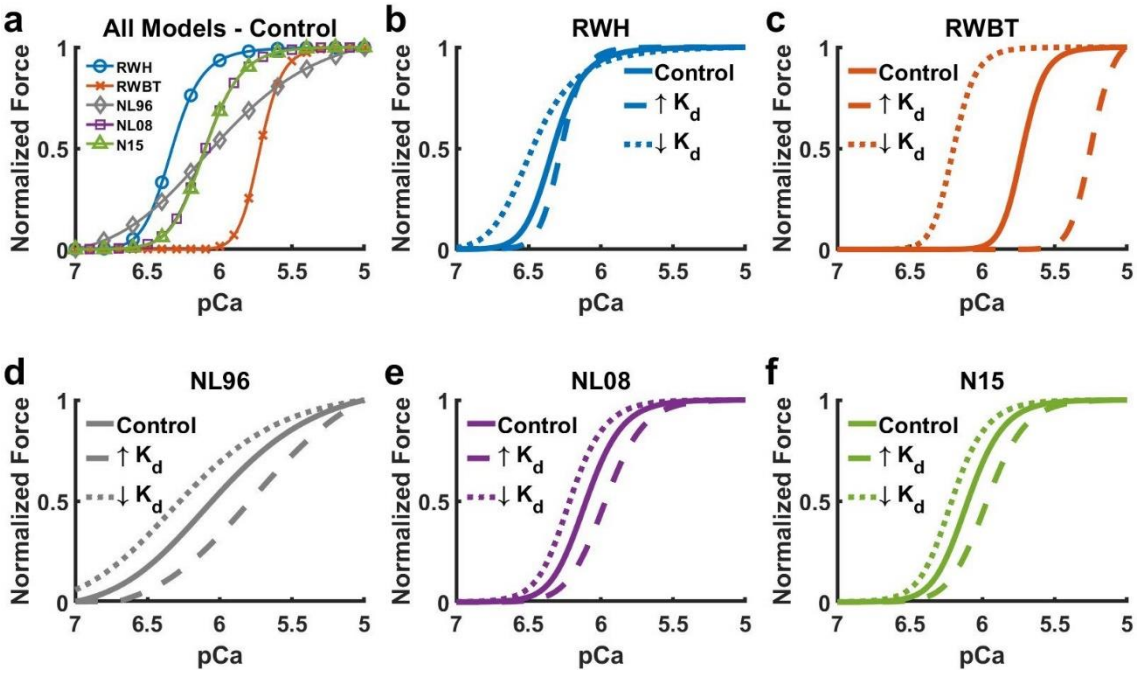


Figura 4. Relação força versus pCa simulada com os modelos R99 [22], R08 [25], NL96 [27], NL08 [23] e N15 [26]. As curvas foram simuladas utilizando os valores originais da constante de dissociação do complexo Ca^{2+}-troponina C (K_d) (painel A), assim como para cada modelo após aumento (↑K_d) e diminuição (↓K_d) de 3 vezes nos valores de K_d (painéis B–F).

DISCUSSÃO

Como a formação da ponte cruzada é considerada o principal mecanismo gerador de força, não é surpreendente que a fase ascendente da contração seja semelhante nos modelos NL08 e N15, que utilizaram o mesmo valor para a constante de taxa de fixação da ponte cruzada (parâmetro f, baseado em dados

experimentais de miócitos ventriculares de rato; [28]). Entretanto, no modelo NL96, a fase ascendente da contração foi mais lenta, provavelmente porque a taxa de fixação da ponte cruzada (Y2, baseada em dados do miocárdio de coelho; [14]) é menor do que nos modelos mais recentes dos autores. A influência da diferença na interação TnC-Ca^{2+} sobre o desenvolvimento mais lento da contração pode provavelmente ser descartada, já que aumentar o parâmetro k_{on} de ligação do Ca^{2+} ao mesmo valor usado no modelo NL08 não reduziu o t_{peak} do twitch. Outro fator que pode contribuir para o desenvolvimento mais rápido da força observado nos modelos NL08 e N15, em comparação com o NL96, pode ser a incorporação da cooperatividade de três sítios de ligação de Ca^{2+} por unidade regulatória, que é uma simplificação do fenômeno descrito por Robinson *et al.* [29].

O relaxamento do músculo cardíaco reflete a redução do número de pontes cruzadas actina-miosina [30] devido à diminuição do $[Ca^{2+}]i$ e, consequentemente, da ligação do Ca^{2+} à TnC. Como observado para o desenvolvimento da contração, o relaxamento foi consideravelmente mais lento no twitch simulado com o modelo NL96 em comparação com o NL08. O uso de um transitório paramétrico de Ca^{2+} no presente estudo foi fundamental para isolar os fatores dependentes dos miofilamentos, removendo assim a influência das diferenças específicas de espécie na cinética do transitório de Ca^{2+}. Isso é importante porque os modelos considerados neste trabalho assumem valores de parâmetros baseados em experimentos com miocárdio de diferentes mamíferos (e.g., roedores, furões, coelhos), que apresentam diferenças marcantes no curso temporal do transitório de Ca^{2+} [31,32].

O modelo NL96 usa três constantes de taxa para o desencaixe da ponte cruzada actina-miosina. Uma delas (Yd) depende da extensão da ponte cruzada, que é zero sob condições isosarcométricas. As outras duas constantes (Y4 = 0,04 ms^{-1}; e Z2 = 0,0013 ms^{-1}) foram estimadas ajustando o modelo a dados experimentais reportados do miocárdio de coelho [14] e furão [33]. O modelo NL08, por sua vez, assume apenas duas constantes de taxa para o desencaixe da ponte cruzada: uma que depende do comprimento do sarcômero (SL) e da extensão da ponte cruzada (g_d = 0,0558 ms^{-1} sob condição isosarcométrica com SL = 2,1 μm) e outra que é independente desses fatores (g = 0,0023 ms^{-1}).

Assim, sob as condições de simulação atuais, a taxa de desencaixe da ponte cruzada é maior no NL08, o que explicaria parcialmente o menor valor de t0,5. No entanto, diferenças na dinâmica filamentar proposta também devem ser consideradas. O modelo NL08 considera dois estados de fixação da ponte cruzada, forte e fraco, baseado em modelos anteriores [22,34-36], e seis estados para o sistema da troponina (vs. dois estados no modelo NL96; Figura 1). A aceleração adicional do relaxamento com o modelo NL15 (vs. NL08) pode ser explicada pela alteração na constante de taxa de desencaixe da ponte cruzada gd, que no modelo mais recente foi considerada dependente exponencialmente do SL (para SL até 2,4 μm).

O twitch simulado com o modelo R08 apresentou o relaxamento mais rápido entre os modelos. Esse modelo incorpora duas taxas de desencaixe da ponte cruzada: uma dependente (g_{appT}) e outra independente do SL (g_{xbT}) (ver Figura 1D). Embora Rice *et al.* (2008) tenham apontado que a redução do SL aumenta g_{appT}, facilitando o desencaixe da ponte cruzada e promovendo um relaxamento mais rápido, isso não deve impactar as simulações presentes de contrações isosarcométricas. Uma explicação plausível para o relaxamento mais rápido do twitch com esse modelo é a menor afinidade da TnC pelo Ca^{2+} (maior K_d) comparado ao modelo R99 (ver suplemento), o que deveria promover uma dissociação mais rápida do Ca^{2+} do filamento fino.

O alongamento do sarcômero em repouso aumenta a força desenvolvida pela contração ao aumentar o grau de sobreposição dos miofilamentos (e assim, o número de possíveis ligações de ponte cruzada) e ao aumentar a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} [37-40]. Esse fenômeno foi reproduzido por todos os modelos testados (Figura 3A). Nos modelos R99 e R08, o SL afeta diretamente a ligação do Ca^{2+} à TnC, impactando a constante de taxa da transição do estado não permissivo para o permissivo para formação da ponte cruzada (h_{NP} e k_{npT}, respectivamente). Isso pode explicar a influência mais acentuada do SL no ΔF nesses modelos. Por outro lado, a relação ΔF-SL simulada com os modelos NL96, NL08 e N15 apresenta um platô para SL > 2,1 μm. Nesses modelos, a geração de força depende exponencialmente do SL, mas a sensibilidade ao SL é limitada por uma constante (L_a ou L_c). Essa formulação foi baseada no trabalho de Gordon *et al.* [41], desenvolvido com músculo esquelético de rã, que apresenta

uma saturação similar na relação ΔF-SL. Além disso, é interessante observar que somente no modelo NL96 o aumento do SL em repouso causou um aumento acentuado da força passiva (de repouso) (compare o painel F com os painéis D, E, G e H na Figura 3). Esse comportamento não parece estar causalmente relacionado à relação mais plana entre SL e força ativa (ΔF) nesse modelo e pode ser atribuído à forma como as equações das taxas de transição dependentes do SL foram elaboradas. Diferentemente dos modelos posteriores, que incorporam formulações que limitam o crescimento das taxas com SL (Material Suplementar, equações B13, B14, C13 e C15), o modelo NL96 emprega um crescimento proporcional direto dessas taxas com SL (Material Suplementar, equações A9 e A10).

O t_{peak} foi relativamente insensível ao SL, exceto para os twitches simulados com o modelo NL08 (Figura 3B). Essa diferença pode ser devido ao uso de índices de assimetria e relaxamento de Campbell *et al.* [42] para o desenvolvimento da força, o que também pode explicar a sensibilidade do t0,5 ao SL nesse modelo (Figura 3C). Para o modelo R99, por outro lado, o relaxamento foi prolongado com o aumento do SL, possivelmente porque envolve transições entre um maior número de estados em que as constantes de taxa dependem do SL.

A inclinação da curva (n_H) foi similar para os modelos R99, NL08 e NL15, enquanto a relação foi mais íngreme no modelo R08 e mais gradual no modelo NL96. O valor de pCa_{50}, indicador da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}, variou pouco entre a maioria dos modelos, ou seja, a faixa de [Ca^{2+}] correspondente a 50% da força máxima foi de 0,5-1 μM (correspondente a pCa50 entre 6,0 e 6,3; Tabela 2). A exceção foi o R08, em que a sensibilidade ao Ca^{2+} foi a menor (força meia-máxima requeria [Ca^{2+}] ~5 μM).

Exceto pelo modelo R99, cujas curvas apresentaram comportamento anômalo, conforme relatado por Silva *et al.* [21], o aumento e a diminuição em 3 vezes do K_d da interação TnC-Ca^{2+} produziram deslocamentos opostos na curva força-pCa, de forma paralela e simétrica (compare Figura 4B com Figuras 4C-F). O principal fator que contribui para a resposta não linear da curva à variação do K_d no modelo R99 pode ser a dependência do n_H em relação ao K_d observada

nesse modelo [21]. Essa característica no modelo R99 e a baixa inclinação da relação força-pCa (baixo n_H) no modelo NL96 foram corrigidas em versões posteriores dos modelos (R08, NL08 e N15). No entanto, apesar de menos dependente do K_d, o n_H determinado com o modelo R08 ainda apresentou variação com mudanças no Kd, porém agora assimétrica (ou seja, diminuição em graus diferentes quando K_d foi aumentado e reduzido por um fator de 3). Em contraste, nos modelos desenvolvidos por Negroni e colaboradores, a variação do n_H com o K_d foi mínima (Tabela 2).

Por outro lado, a curva gerada com o modelo R08 foi consideravelmente mais sensível às mudanças no K_d, em comparação com as produzidas pelos modelos mais recentes desenvolvidos pelos colaboradores Negroni (NL08 e N15). A explicação para essa diferença pode estar no impacto de k_{on} e k_{off} em cada modelo. Nos modelos NL08 e N15, essas constantes de taxa são os únicos fatores que afetam diretamente a ligação do Ca^{2+} à TnC, enquanto no modelo R08, a interação TnC-Ca^{2+} em sítios de alta e baixa afinidade é governada por equações intermediárias nas quais temperatura, espécie e SL também são considerados. Enquanto o modelo R08 parece reproduzir melhor os dados experimentais da relação força-pCa e sensibilidade ao Ca^{2+} [43,44], os modelos NL08 e N15, que são menos dependentes da espécie, podem ser mais versáteis na simulação das curvas força-pCa para estudar, por exemplo, farmacologia e fisiopatologia cardíaca [45].

Para todos os modelos comparados neste estudo, um único transitório paramétrico de Ca^{2+} foi usado para disparar a contração twitch. Como essa abordagem elimina a interferência das variações dependentes da espécie na eletrofisiologia e na dinâmica do Ca^{2+}, permitiu restringir a comparação à formulação que descreve os fenômenos que ocorrem apenas no nível do miofilamento. No entanto, fenômenos a montante do aparelho contrátil podem ser introduzidos incluindo modelos eletrofisiológicos específicos por espécie atualmente disponíveis [46-48].

CONCLUSÃO

Entre os modelos comparados de contração do miocárdio, as propostas mais antigas dos grupos de Rice e Negroni (respectivamente R99 e NL96) apresentam limitações. Enquanto o modelo NL96 responde a um alongamento relativamente leve do sarcômero com um aumento marcado da força passiva, a relação força-pCa gerada pelo modelo R99 é afetada de maneira aberrante pelo K_d da interação TnC-Ca^{2+}. No entanto, embora os desenhos centrais dos modelos NL96 e R99 tenham sido mantidos (por exemplo, os estados da TnC em relação à ligação de Ca^{2+} e o conceito de permissividade para a formação da ponte cruzada, respectivamente), as versões posteriores desses modelos mostraram melhorias e melhor reprodução dos dados experimentais nos quais se baseiam. O modelo R08 possui o diagrama de estados mais simplificado, porém considera variáveis não levadas em conta em outros modelos, como temperatura e comprimento do filamento, o que pode ser importante dependendo das condições da simulação. Investigar o comportamento desses modelos quando acoplados a modelos eletrofisiológicos específicos para espécies de miócitos ventriculares e aumentar a flexibilidade do modelo para escolha de parâmetros específicos de espécie deve ser o próximo passo do presente estudo.

DECLARAÇÕES E AFIRMAÇÕES

Contribuição dos Autores

Matheus Leonardo Alves de Camargo realizou as simulações e elaborou a versão inicial do manuscrito. Daisuke Sato contribuiu na primeira revisão e auxiliou na estruturação do texto. José Wilson Magalhães Bassani e Rosana Almada Bassani participaram da revisão crítica do manuscrito e colaboraram na redação da seção de discussão. Robson Rodrigues da Silva realizou a revisão final do manuscrito e foi responsável pela concepção inicial do estudo.

Declaração de Disponibilidade de Dados

Todos os scripts MATLAB e os dados armazenados utilizados neste trabalho estão disponíveis no repositório OSF e podem ser acessados pelo seguinte link: https://osf.io/zqcr6/.

Declaração de Conflito de Interesses

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse financeiros ou pessoais relacionados a este estudo.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; código financeiro 88887.627770/2021-00), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo 2016/18422-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; bolsa nº 30400/2016-2), Ministério da Saúde/FINEP (Convênio 0113021400, ref. 0441/12) e pela Universidade de Mogi das Cruzes.

REFERÊNCIAS

[1] Rassier DE. Sarcomere mechanics in striated muscles: from molecules to sarcomeres to cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2017; 313: C134-C145. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00050.2017.

[2] Stern MD, Lakatta EG. Excitation-contraction coupling in the heart: the state of the question. FASEB J. 1992; 6: 3092-3100. https://doi.org/10.1096/fasebj.6.12.1325933.

[3] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002; 415(6868): 198-205. https://doi.org/10.1038/415198a.

[4] Huxley AF. Muscle structure and theories of contraction. Prog Biophys Biophys Chem. 1957; 7: 255-318. https://doi.org/10.1016/S0096-4174(18)30128-8.

[5] Huxley AF. Muscular contraction. J Physiol. 1974; 243: 1-43. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1974.sp010740.

[6] Hill AV. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. Proc. R. Soc. Lond. 1938; B126136–195. http://doi.org/10.1098/rspb.1938.0050.

[7] Lymn RW, Taylor EW. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. Biochemistry. 1971; 10: 4617-4624. https://doi.org/10.1021/bi00801a004.

[8] Eisenberg E, Hill TL, Chen Y. Cross-bridge model of muscle contraction. Quantitative analysis. Biophys J. 1980; 29: 195-227. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(80)85126-5.

[9] Mijailovich SM, Fredberg JJ, Butler JP. On the theory of muscle contraction: filament extensibility and the development of isometric force and stiffness. Biophys J. 1996; 71: 1475-1484. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79348-7.

[10] Gray BF, Gonda I. The sliding filament model of muscle contraction. I. Quantum mechanical formalism. J Theor Biol. 1977; 69: 167-185. https://doi.org/10.1016/0022-5193(77)90394-0.

[11] Gray BF, Gonda I. The sliding filament model of muscle contraction. II. The energetic and dynamical predictions of a quantum mechanical transducer model. J Theor Biol. 1977; 69: 187-230. https://doi.org/10.1016/0022-5193(77)90395-2.

[12] Pásek M, Simurda J, Orchard CH, Christé G. A model of the guinea-pig ventricular cardiac myocyte incorporating a transverse-axial tubular system. Prog Biophys Mol Biol. 2008; 96: 258-280. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.07.022.

[13] Yue DT. Intracellular [Ca2+] related to rate of force development in twitch contraction of heart. Am J Physiol. 1987; 252(Pt 2): H760-H770. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1987.252.4.H760.

[14] Peterson JN, Hunter WC, Berman MR. Estimated time course of Ca2+ bound to troponin C during relaxation in isolated cardiac muscle. Am J Physiol. 1991; 260(Pt 2): H1013-H1024. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.260.3.H1013.

[15] Burkhoff D. Explaining load dependence of ventricular contractile properties with a model of excitation-contraction coupling. J Mol Cell Cardiol. 1994; 26: 959-978. https://doi.org/10.1006/jmcc.1994.1117.

[16] McCabe KJ, Aboelkassem Y, Teitgen AE, *et al.* Predicting the effects of dATP on cardiac contraction using multiscale modeling of the sarcomere. Arch Biochem Biophys. 2020; 695: 108582. https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108582.

[17] Zahalak, GI. A distribution-moment approximation for kinetic theories of muscular contraction. Math Biosci. 1981; 55: 89-114. https://doi.org/10.1016/0025-5564(81)90014-6.

[18] Izakov VYa, Katsnelson LB, Blyakhman FA, Markhasin VS, Shklyar TF. Cooperative effects due to calcium binding by troponin and their consequences for contraction and relaxation of cardiac muscle under various conditions of mechanical loading. Circ Res. 1991; 69: 1171-1184. https://doi.org/10.1161/01.res.69.5.1171.

[19] Panerai RB. A model of cardiac muscle mechanics and energetics. J Biomech. 1980; 13: 929-940. https://doi.org/10.1016/0021-9290(80)90163-3.

[20] Puglisi JL, Wang F, Bers DM. Modeling the isolated cardiac myocyte. Prog Biophys Mol Biol. 2004; 85: 163-178. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.12.003.

[21] Silva RR, Filho OBS, Bassani JWM, Bassani RA. The ForceLAB simulator: Application to the comparison of current models of cardiomyocyte contraction. Comput Biol Med. 2021; 131: 104240. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104240.

[22] Rice JJ, Winslow RL, Hunter WC. Comparison of putative cooperative mechanisms in cardiac muscle: length dependence and dynamic responses. Am J Physiol. 1999; 276: H1734-H1754. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.276.5.H1734.

[23] Negroni JA, Lascano EC. Simulation of steady state and transient cardiac muscle response experiments with a Huxley-based contraction model. J Mol Cell Cardiol. 2008; 45: 300-312. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.04.012.

[24] Mullins PD, Bondarenko VE. A mathematical model of the mouse ventricular myocyte contraction. PLoS One. 2013; 8: e63141. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063141.

[25] Rice JJ, Wang F, Bers DM, de Tombe PP. Approximate model of cooperative activation and crossbridge cycling in cardiac muscle using ordinary differential equations. Biophys J. 2008; 95: 2368-2390. https://doi.org/10.1529/biophysj.107.119487.

[26] Negroni JA, Morotti S, Lascano EC, *et al.* β-adrenergic effects on cardiac myofilaments and contraction in an integrated rabbit ventricular myocyte model. J Mol Cell Cardiol. 2015; 81: 162-175. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.014.

[27] Negroni JA, Lascano EC. A cardiac muscle model relating sarcomere dynamics to calcium kinetics. J Mol Cell Cardiol. 1996; 28: 915-929. https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0086.

[28] Janssen PM, Hunter WC. Force, not sarcomere length, correlates with prolongation of isosarcometric contraction. Am J Physiol. 1995; 269 (Pt 2): H676-H685. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.2.H676.

[29] Robinson JM, Wang Y, Kerrick WG, Kawai R, Cheung HC. Activation of striated muscle: nearest-neighbor regulatory-unit and cross-bridge influence on myofilament kinetics. J Mol Biol. 2002; 322: 1065-1088. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00855-0.

[30] Chung CS, Hoopes CW, Campbell KS. Myocardial relaxation is accelerated by fast stretch, not reduced afterload. J Mol Cell Cardiol. 2017; 103: 65-73. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.01.004.

[31] Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. J Physiol. 1994; 476: 279-293. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020130.

[32] Bassani RA, Bassani JW, Bers DM. Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems. J Physiol. 1994; 476: 295-308. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020131.

[33] Kawai M, Saeki Y, Zhao Y. Crossbridge scheme and the kinetic constants of elementary steps deduced from chemically skinned papillary and trabecular muscles of the ferret. Circ Res. 1993; 73: 35-50. https://doi.org/10.1161/01.res.73.1.35.

[34] Julian FJ, Sollins KR, Sollins MR. A model for the transient and steady-state mechanical behavior of contracting muscle. Biophys J. 1974; 14: 546-562. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(74)85934-5.

[35] Landesberg A, Sideman S. Mechanical regulation of cardiac muscle by coupling calcium kinetics with cross-bridge cycling: a dynamic model. Am J Physiol. 1994; 267(Pt 2): H779-H795. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.2.H779.

[36] Razumova MV, Bukatina AE, Campbell KB. Stiffness-distortion sarcomere model for muscle simulation. J Appl Physiol 1999; 87: 1861-1876. https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.5.1861.

[37] Allen DG, Kentish JC. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. J Mol Cell Cardiol. 1985; 17: 821-840. https://doi.org/10.1016/s0022-2828(85)80097-3.

[38] Wang YP, Fuchs F. Length, force, and Ca (2+)-troponin C affinity in cardiac and slow skeletal muscle. Am J Physiol. 1994; 266(Pt 1): C1077-C1082. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.4.C1077.

[39] Konhilas JP, Irving TC, de Tombe PP. Frank-Starling law of the heart and the cellular mechanisms of length-dependent activation. Pflugers Arch. 2002; 445: 305-310. https://doi.org/10.1007/s00424-002-0902-1.

[40] MacIntosh BR. Recent developments in understanding the length dependence of contractile response of skeletal muscle. Eur J Appl Physiol. 2017; 117: 1059-1071. https://doi.org/10.1007/s00421-017-3591-3.

[41] Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. J Physiol. 1966; 184: 170-192. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1966.sp007909.

[42] Campbell KB, Razumova MV, Kirkpatrick RD, Slinker BK. Myofilament kinetics in isometric twitch dynamics. Ann Biomed Eng. 2001; 29: 384-405. https://doi.org/10.1114/1.1366669.

[43] Yuan CC, Kazmierczak K, Liang J, Ma W, Irving TC, Szczesna-Cordary D. Molecular basis of force-pCa relation in MYL2 cardiomyopathy mice: Role of the super-relaxed state of myosin. Proc Natl Acad Sci USA. 2022; 119: e2110328119. https://doi.org/10.1073/pnas.2110328119.

[44] Walker JS, Li X, Buttrick PM. Analysing force-pCa curves. J Muscle Res Cell Motil. 2010; 31: 59-69. https://doi.org/10.1007/s10974-010-9208-7.

[45] Longobardi S, Sher A, Niederer SA. Quantitative mapping of force-pCa curves to whole-heart contraction and relaxation. J Physiol. 2022; 600: 3497-3516. https://doi.org/10.1113/JP283352.

[46] Bondarenko VE, Szigeti GP, Bett GC, Kim SJ, Rasmusson RL. Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 287: H1378-H1403. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00185.2003.

[47] Shannon TR, Wang F, Puglisi J, Weber C, Bers DM. A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocyte. Biophys J. 2004; 87: 3351-3371. https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047449 [published correction appears in Biophys J. 2012; 102:1996-2001].

[48] O'Hara T, Virág L, Varró A, Rudy Y. Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation. PLoS Comput Biol. 2011;7(5): e1002061. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002061.

ANALYSIS AND COMPARISON OF FIVE MATHEMATICAL MODELS THAT DESCRIBE MYOFILAMENT DYNAMICS DURING CONTRACTION OF VENTRICULAR MYOCYTES

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Matheus Leonardo Alves de Camargo[1], Daisuke Sato[2], José Wilson Magalhães Bassani[3], Rosana Almada Bassani[3], Robson Rodrigues da Silva[1,3]

[1]Research and Technology Center, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brazil
[2]Department of Phamacology, University of California, Davis, CA, Unites States of America
[3]LabNECC, Center for Biomedical Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: *matheus.leonardo675@gmail.com

ORCID's: 0000-0002-4071-8741; 0000-0001-9341-0970; 0000-0003-4202-6420; 0000-0002-6453-1359; 0000-0003-1082-0777

MATERIAL SUPLEMENTAR

EQUAÇÕES DOS MODELOS E PARÂMETROS COM INDICAÇÃO DOS AJUSTES REALIZADOS

*variáveis ajustadas para camundongo em vermelho

**variáveis de ajuste adicionadas em azul

A - Modelo De Negroni & Lascano (1996)

Força de contração total

$$F = F_b + F_p - \alpha \quad \text{(A1)}$$

Força de contração do elemento elástico em paralelo

$$F_p = K * (L - L_0)^5 \quad \text{(A2)}$$

Alongamento da ponte-cruzada

$$\frac{dX}{dt} = B * (L - X - h_c) \quad \text{(A3)}$$

Taxas de variação

$$Q_b = Y_1 * [Ca^{2+}] * [T] - Z_1 * [TCa] \quad \text{(A4)}$$

$$Q_a = Y_2 * [TCa]_{eff} - Z_2 * [TCa^*] \quad \text{(A5)}$$

$$[TCa]_{eff} = [TCa] * e^{-R*(L-L_a)^2} \quad \text{(A6)}$$

$$Q_r = Y_3 * [TCa^*] - Z_3 * [T^*] * [Ca^{2+}] \quad \text{(A7)}$$

$$Q_d = Y_4 * [T^*] \quad \text{(A8)}$$

$$Q_{d1} = Y_4 * \left(\frac{dX}{dt}\right)^2 * [T^*] \quad \text{(A9)}$$

$$Q_{d2} = Y_d * \left(\frac{dX}{dt}\right)^2 * [TCa^*] \quad \text{(A10)}$$

Dinâmica dos miofilamentos

$$\frac{d[TCa]}{dt} = Q_b - Q_a \quad \text{(A11)}$$

$$\frac{d[TCa^*]}{dt} = Q_a - Q_r - Q_{d2} \quad \text{(A12)}$$

$$\frac{d[T^*]}{dt} = Q_r - Q_d - Q_{d1} \quad \text{(A13)}$$

$$T = T_t - [TCa] - [TCa^*] - [T^*] \quad \text{(A14)}$$

Força de contração das pontes-cruzadas

$$F_b = A * ([TCa^*] + [T^*]) - (L - X) \quad \text{(A15)}$$

Parâmetros

Quadro 1

Descrição	Variável	Valor	Valor ajustado	Unidade
Taxa de associação de cálcio com troponina	Y_1	0.039	0.1816	$\mu M*ms^{-1}$
Taxa de dissociação de cálcio com troponina	Z_1	0.03	0.1397	ms^{-1}
Transição de TCa para TCa*	Y_2	0.0013	-	ms^{-1}

Transição de TCa* para TCa	Z_2	0.0013	-	ms^{-1}
Transição de TCa* para T*	Y_3	0.03	0.1397	ms^{-1}
Transição de T* para TCa*	Z_3	1.56	7.2626	$\mu M*ms^{-1}$
Transição de T*para T	Y_4	0.04	-	ms^{-1}
Transição para T dependente do comprimento do sarcômero	Y_d	9000	-	$ms^{-1}*\mu m^2$
Total de sítios de troponina	T_t	70	23	μM
Constante da taxa de variação do alongamento das pontes-cruzadas	B	1.2	0.5	ms^{-1}
Alongamento inicial da ponte-cruzada	h_c	0.005	-	μm
Comprimento de intersecção ótima da ponte-cruzada	L_a	1.17	1.15	μm
Constante para definição do TCa_{eff}	R	20	15	μm^{-2}
Constante da força de contração das pontes-cruzadas	A	1800	-	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}*\mu M^{-1}$
Constante da força de contração do elemento paralelo	K	140000	-	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-5}$
Comprimento inicial do elemento paralelo	L_0	0.97	-	μm

Ajuste de diástole	α	4.13	-	$mN*mm^{-2}$

B - Modelo De Negroni & Lascano (2008)

Força de contração total

$$F_m = F_b + F_p \tag{B1}$$

Força de contração do elemento elástico em paralelo

$$F_p = K_e * (L - L_0)^5 + L_e * (L - L_0) \tag{B2}$$

Alongamento das pontes-cruzadas

$$\frac{dh_w}{dt} = -B * (h_w - h_{wr}) \tag{B3}$$

$$\frac{dh_p}{dt} = -B * (h_p - h_{pr}) \tag{B4}$$

Força de contração das pontes cruzadas

$$F_b = A_w * ([TSCa_3\sim + TS\sim]) * h_w + A_p * ([TSCa_3{}^* + TS^*]) * h_p \tag{B5}$$

Dinâmica dos miofilamentos

$$\frac{d[TSCa_3]}{dt} = Y_b * [TS] * [Ca^{2+}]_i^3 - Z_b * [TSCa_3] + g * [TSCa_3\sim] - f * [TSCa_3]_{eff} \tag{B6}$$

$$\frac{d[TSCa_3\sim]}{dt} = f * [TSCa_3]_{eff} - g * [TSCa_3\sim] + Z_p * [TSCa_3{}^*] - Y_p * [TSCa_3\sim] \tag{B7}$$

$$\frac{d[TSCa_3{}^*]}{dt} = Y_p * [TSCa_3\sim] - Z_p * [TSCa_3{}^*] + Z_r * [TS^*] * [Ca^{2+}]_i^3 - Y_r * [TSCa_3{}^*] \tag{B8}$$

$$\frac{d[TS^*]}{dt} = Y_r * [TSCa_3{}^*] - Z_r * [TS^*] * [Ca^{2+}]_i^3 + Z_q * [TS\sim] - Y_q * [TS^*] \quad \text{(B9)}$$

$$\frac{d[TS\sim]}{dt} = Y_q * [TS^*] - Z_q * [TS\sim] - g_d * [TS\sim] \quad \text{(B10)}$$

$$[TS] = [TS_t] - [TSCa_3] - [TSCa_3\sim] - [TSCa_3{}^*] - [TS^*] - [TS\sim] \quad \text{(B11)}$$

Taxas de transição

$$[TSCa_3]_{eff} = e^{-R(L-L_a)^2} * [TSCa_3] \quad \text{(B12)}$$

$$g = Z_a + Y_v * \left(1 - e^{-\gamma(h_w - h_{wr})^2}\right) \quad \text{(B13)}$$

$$g_d = Y_d + Y_c * (L - L_c)^2 + Y_{vd} * \left(1 - e^{-\gamma(h_w - h_{wr})^2}\right) \quad \text{(B14)}$$

Parâmetros

Quadro 2

Descrição	Variável	Valor	Valor ajustado	Unidade
Constante da força de contração das pontes-cruzadas em estado forte	A_p	2700	7500	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}*\mu M^{-1}$
Constante da força de contração das pontes-cruzadas em estado fraco	A_w	540	1500	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}*\mu M^{-1}$
Constante da taxa de variação do alongamento das pontes-cruzadas	B	0.5	-	ms^{-1}

Constante para desacoplamento das pontes-cruzadas em estado fraco	γ	28000	-	μm^{-2}
Taxa de transição de TS ligado a cálcio para o estado fraco	f	0.0023	-	ms^{-1}
Alongamento inicial da ponte-cruzada no estado forte	h_{pr}	0.006	-	µm
Alongamento inicial da ponte-cruzada no estado fraco	h_{wr}	0.0001	-	µm
Constante da força do elemento paralelo	K_e	105000	10.5	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-5}$
Comprimento inicial do elemento paralelo	L_o	0.97	-	µm
Comprimento de intersecção ótima da ponte-cruzada	L_a	1.15	-	µm
Constante para definição da influência do tamanho do sarcômero na taxa g_d	L_c	1.2	-	µm
Constante da força do elemento paralelo ligada somente a parte geométrica	L_e	10	0.1	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}$
Constante para definição do $TSCa_{eff}$	R	15	-	μm^{-2}
Total de sítios de troponina	TS_t	23	-	µM

Taxa de associação de cálcio com troponina	Y_b	0.1816	-	$\mu M^{-3}*ms^{-1}$
Constante para definição de g_d	Y_c	1	-	$ms^{-1}*\mu m^{-2}$
Constante para definição de g_d	Y_d	0.0333	-	ms^{-1}
Transição de TSCa~ para TSCa*	Y_p	0.1397	-	ms^{-1}
Transição de TS* para TS~	Y_q	0.2328	-	ms^{-1}
Transição de TSCa* para TS*	Y_r	0.1397	-	ms^{-1}
Constante para definição de g	Y_v	1.5	-	ms^{-1}
Constante para definição de g_d	Y_{vd}	1.5	-	ms^{-1}
Constante para definição de g	Z_a	0.0023	-	ms^{-1}
Taxa de dissociação de cálcio com troponina	Z_b	0.1397	-	ms^{-1}
Transição de TSCa* para TSCa~	Z_p	0.2095	-	ms^{-1}
Transição de TS~ para TS*	Z_q	0.3724	-	ms^{-1}
Transição de TS* para TSCa*	Z_r	7.2626	-	$ms^{-1}*\mu m^{-2}$

C – Modelo de Negroni *et al.* (2015)

Força de contração total

$$F_m = F_b + F_p \tag{C1}$$

Força de contração do elemento elástico em paralelo

$$F_p = K_e * (L - L_0)^5 + L_e * (L - L_0) \tag{C2}$$

Alongamento das pontes-cruzadas

$$\frac{dh_w}{dt} = -B_w * (h_w - h_{wr}) \tag{C3}$$

$$\frac{dh_p}{dt} = -B_p * (h_p - h_{pr}) \tag{C4}$$

Força de contração das pontes cruzadas

$$F_b = A_w * ([TSCa_3\sim]) * h_w + A_p * ([TSCa_3{}^* + TS^*]) * h_p \tag{C5}$$

Dinâmica dos miofilamentos

$$\frac{d[TSCa_3]}{dt} = Y_b * [TS] * [Ca^{2+}]_i^3 - Z_b * [TSCa_3] + g * [TSCa_3\sim] - f * [TSCa_3] \tag{C6}$$

$$\frac{d[TSCa_3\sim]}{dt} = f * [TSCa_3] - g * [TSCa_3\sim] + Z_p * [TSCa_3{}^*] - Y_p * [TSCa_3\sim] \tag{C7}$$

$$\frac{d[TSCa_3{}^*]}{dt} = Y_p * [TSCa_3\sim] - Z_p * [TSCa_3{}^*] + Z_r * [TS^*] * [Ca^{2+}]_i^3 - Y_r * [TSCa_3{}^*] \tag{C8}$$

$$\frac{d[TS^*]}{dt} = Y_r * [TSCa_3{}^*] - Z_r * [TS^*] * [Ca^{2+}]_i^3 - g_d * [TS^*] \quad \text{(C9)}$$

$$[TS] = [TS_t] - [TSCa_3] - [TSCa_3\sim] - [TSCa_3{}^*] - [TS^*] \quad \text{(C10)}$$

Taxas de transição

$$f = Y_a * e^{-R_a(L-L_a)^2} \quad \text{(C11)}$$

$$g = Z_a + Y_h \quad \text{(C12)}$$

$$Y_h = F_h * Y_v * \left(1 - e^{-\gamma(h_w - h_{wr})^2}\right) \quad \text{(C13)}$$

$$F_h = 0.1\ para\ h_w > h_{wr}\ ou\ F_h = 1\ para\ h_w < h_{wr} \quad \text{(C14)}$$

$$g_d = Y_d * e^{-Y_c(L-L_c)} \quad \text{(C15)}$$

Quadro 3

Descrição	Variável	Valor	Valor ajustado	Unidade
Constante da força de contração das pontes-cruzadas em estado forte	A_p	2700	7280	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}*\mu M^{-1}$
Constante da força de contração das pontes-cruzadas em estado fraco	A_w	540	1456	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}*\mu M^{-1}$
Constante da força do elemento paralelo	K_e	105000	10.5	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-5}$
Constante da força do elemento paralelo ligada	L_e	10	0.1	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}$

somente a parte geométrica				
Comprimento inicial do elemento paralelo	L_o	0.97	-	µm
Total de sítios de troponina	TSt	23	-	µM
Taxa de associação de cálcio com troponina	Y_b	0.1816	-	$\mu M^{-3}*ms^{-1}$
Transição de TSCa* para TS*	Y_r	0.1397	-	ms^{-1}
Taxa de dissociação de cálcio com troponina	Z_b	0.1397	-	ms^{-1}
Transição de TS* para TSCa*	Z_r	7.2626	-	$\mu M^{-3}*ms^{-1}$
Constante da taxa de variação do alongamento das pontes-cruzadas no estado fraco	B_w	0.35	-	ms^{-1}
Constante da taxa de variação do alongamento das pontes-cruzadas no estado forte	B_p	0.5	-	ms^{-1}
Alongamento inicial da ponte-cruzada no estado forte	h_{pr}	0.006	-	µm
Alongamento inicial da ponte-cruzada no estado fraco	h_{wr}	0.0001	-	µm

Constante para desacoplamento das pontes-cruzadas em estado fraco	γ	28000	-	μm^{-2}
Comprimento de intersecção ótima da ponte-cruzada	L_a	1.15	-	μm
Constante para definição da influência do tamanho do sarcômero na taxa g_d	L_c	1.05	-	μm
Constante para definição da zona efetiva para formação de pontes-cruzadas	R_a	20	15	μm^{-2}
Constante para a taxa de transição de TSCa para TSCa~	Y_a	0.0023	-	ms^{-1}
Constante para a taxa de transição de TS* para TS	Y_c	4	1	ms^{-1}
Constante para a taxa de transição de TS* para TS	Y_d	0.028	0.0333	ms^{-1}
Transição de TSCa~ para TSCa*	Y_p	0.1397	-	ms^{-1}
Constante para a taxa de transição de TSCa~ para TSCa	Y_v	0.9	1.5	ms^{-1}
Constante para a taxa de transição de TSCa~ para TSCa	Z_a	0.0023	-	ms^{-1}

Constante para a taxa de transição de TSCa para TS	Z_p	0.2095	-	ms^{-1}

D – Modelo de Rice *et al.* (1999) como apresentado em Mullins & Bondarenko (2013)

Força de contração total

$$F_{contr} = -73.26 * F_{contrn} \tag{D1}$$

$$F_{contrn} = -\frac{P1 + N1 + 2 * (P2) + 3 * (P3)}{F_{max}} \tag{D2}$$

$$F_{max} = P1_{max} + 2 * (P2_{max}) + 3 * (P3_{max}) \tag{D3}$$

$$P1_{max} = \frac{f_{01} * (2 * g_{minxb}) * (3 * g_{minxb})}{\Sigma} \tag{D4}$$

$$P2_{max} = \frac{f_{01} * f_{12} * (3 * g_{minxb})}{\Sigma} \tag{D5}$$

$$P3_{max} = \frac{f_{01} * f_{12} * f_{23}}{\Sigma} \tag{D6}$$

$$\Sigma = (g_{minxb}) * (2 * g_{minxb}) * (3 * g_{minxb}) + f_{01} * (2 * g_{minxb}) * (3 * g_{minxb}) + f_{01} * f_{12} * (3 * g_{minxb}) + f_{01} * f_{12} * f_{23} \tag{D7}$$

Dinâmica dos miofilamentos

$$\frac{dN0}{dt} = k_{PN} * P0 + g_{10SL} * N1 - k_{NP} * N0 \tag{D8}$$

$$\frac{dN1}{dt} = k_{PN} * P1 - (k_{NP} + g_{10SL}) * N1 \tag{D9}$$

$$\frac{dP0}{dt} = g_{10SL} * P1 + k_{NP} * N0 - (k_{PN} + f_{01}) * P0 \tag{D10}$$

$$\frac{dP1}{dt} = g_{21SL} * P2 + f_{01} * P0 + k_{NP} * N1 - (f_{12} + g_{10SL} + k_{PN}) * P1 \tag{D11}$$

$$\frac{dP2}{dt} = g_{32SL} * P3 + f_{12} * P1 - (f_{23} + g_{21SL}) * P2 \quad \text{(D12)}$$

$$\frac{dP3}{dt} = f_{23} * P2 - g_{32SL} * P3 \quad \text{(D13)}$$

Taxas de transição

$$f_{01} = 3 * f_{XB} \quad \text{(D14)}$$

$$f_{12} = 10 * f_{XB} \quad \text{(D15)}$$

$$f_{23} = 7 * f_{XB} \quad \text{(D16)}$$

$$g_{10SL} = g_{xbSL} \quad \text{(D17)}$$

$$g_{21SL} = 2 * g_{xbSL} \quad \text{(D18)}$$

$$g_{32SL} = 3 * g_{xbSL} \quad \text{(D19)}$$

$$g_{xbSL} = g_{minxb} * (2 - (SL_{norm})^{1.6}) \quad \text{(D20)}$$

$$SL_{norm} = \frac{SL - 1.3\mu m}{2.3\mu m - 1.3\mu m} \quad \text{(D21)}$$

$$SL = 0.8 * F_{contrn} + SL_0 \quad \text{(D22)}$$

$$k_{NP} = k_{PN} * \left(\frac{[LTRPNCa]}{[LTRPNCa]_{tot} * K_{half}}\right)^{Ntm} \quad \text{(D23)}$$

$$Ntm = 5 + 3 * SL_{norm} \quad \text{(D24)}$$

$$K_{half} = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_{Ca}}{1.5\mu M - SL_{norm} * 1.0\mu M}\right)} \quad \text{(D25)}$$

$$K_{Ca} = \frac{k_{ltrpn}^{-}}{k_{ltrpn}^{+}} \quad \text{(D26)}$$

Carregamento de Cálcio

$$\frac{d[LTRPNCa]}{dt} = k^{+}_{ltrpn} * [Ca^{2+}]_i * \{[LTRPNCa]_{tot} - [LTRPNCa]\} - k^{-}_{ltrpn} * [LTRPNCa] \quad \text{(D27)}$$

$$\frac{d[HTRPNCa]}{dt} = k^{+}_{htrpn} * [Ca^{2+}]_i * \{[HTRPNCa]_{tot} - [HTRPNCa]\} - k^{-}_{htrpn} * [HTRPNCa] \quad \text{(D28)}$$

Parâmetros

Quadro 4

Descrição	Variável	Valor	Unidade
Concentração total de sítios de troponina de baixa afinidade	$[LTRPNCa]_{tot}$	70	µM
Concentração total de sítios de troponina de alta afinidade	$[HTRPNCa]_{tot}$	140	µM
Taxa de associação positiva p/ sítios de troponina de alta afinidade	k^{+}_{htrpn}	0.00237	$\mu M^{-1}*ms^{-1}$
Taxa de associação negativa p/ sítios de troponina de alta afinidade	k^{-}_{htrpn}	$3.2*10^{-5}$	ms^{-1}
Taxa de associação positiva p/ sítios de troponina de baixa afinidade	k^{+}_{ltrpn}	0.0327	$uM^{-1}*ms^{-1}$
Taxa de associação negativa p/ sítios de troponina de alta afinidade	k^{-}_{ltrpn}	0.0196	ms^{-1}
Tamanho inicial de sarcômero	SL_0	2.1	µm
Transição do estado permissivo p/ não permissivo	k_{PN}	0.045	ms^{-1}

Transição básica entre os estados fracos p/ estados fortes das pontes cruzadas	f_{XB}	0.1	ms^{-1}
Taxa mínima de desligamento de pontes cruzadas	g_{minxb}	0.14	ms^{-1}

E - Modelo de Rice *et al.* (2008)

Geometria do sarcômero

$$sovr_{ze}(x) = min\left(\frac{length_{thick}}{2}, \frac{x}{2}\right) \quad \text{(E1)}$$

$$sovr_{cle}(x) = max\left(\frac{x}{2} - (x - length_{thin}), \frac{length_{hbare}}{2}\right) \quad \text{(E2)}$$

$$length_{sovr}(x) = sovr_{ze}(x) - sovr_{cle}(x) \quad \text{(E3)}$$

$$SOVF_{thick}(x) = \frac{2 * length_{sovr}(x)}{length_{thick} - length_{hbare}} \quad \text{(E4)}$$

$$SOVF_{thin}(x) = \frac{length_{sovr}(x)}{length_{thin}} \quad \text{(E5)}$$

Regulação da ligação Cálcio-Troponina

$$\frac{dCaTrop_H}{dt} = k_{onT} * [Ca] * (1 - CaTrop_H) - k_{offHT} * CaTrop_H \quad \text{(E6)}$$

$$\frac{dCaTrop_L}{dt} = k_{onT} * [Ca] * (1 - CaTrop_L) - k_{offLT} * CaTrop_L \quad \text{(E7)}$$

$$k_{onT} = k_{on} * Qk_{on}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E8)}$$

$$k_{offHT} = k_{offH} * koffmod_{species} * Qk_{off}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E9)}$$

$$k_{offLT} = k_{offL} * koffmod_{species} * Qk_{off}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E10)}$$

$$Trop_{Regulatory}(x) = \left(1 - SOVF_{thin}(x)\right) * \left(CaTrop_L + SOVF_{thin}(x)\right) * CaTrop_H \quad \text{(E11)}$$

$$permtot = \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{perm_{50}}{Trop_{Regulatory}(x)}\right)^{n_{perm}}}\right)^{0.5} \quad \text{(E12)}$$

$$inversepermtot = min\left(\frac{1}{permtot}, 100\right) \quad \text{(E13)}$$

Taxas de transição

$$k_{n_pT} = k_{n_p} * permtot * Qk_{n_p}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E14)}$$

$$k_{p_nT} = k_{p_n} * inversepermtot * Qk_{p_n}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E15)}$$

$$f_{appT} = f_{app} * xbmod_{species} * Qf_{app}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E16)}$$

$$g_{appT} = g_{app} * g_{app}slmod * xbmod_{species} * Qg_{app}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E17)}$$

$$g_{app}slmod = 1 + \left(1 - SOVF_{thick}(x)\right) * gslmod \quad \text{(E16)}$$

$$h_{fT} = h_f * h_f mod * xbmod_{species} * Qh_f^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E18)}$$

$$h_f mod = e^{-sign(xXB_{PreR}) * hfmdc * \left(\frac{xXB_{PreR}}{x_0}\right)^2} \quad \text{(E19)}$$

$$h_{bT} = h_b * xbmod_{species} * Qh_b^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E20)}$$

$$gxbmd = \begin{cases} e^{\sigma_p * \left(\frac{(x_0 - xXB_{PostR})}{x_0}\right)^2} & if\ xXB_{PostR} < x_0 \\ e^{\sigma_n * \left(\frac{(x_0 - xXB_{PostR})}{x_0}\right)^2} & if\ xXB_{PostR} \geq x_0 \end{cases} \quad \text{(E21)}$$

$$g_{xbT} = g_{xb} * gxbmd * xbmod_{species} * Qg_{xb}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E22)}$$

Dinâmica dos miofilamentos

$$\frac{d}{dt}N_{XB} = -k_{n_pT} * N_{XB} + k_{p_nT} * P_{XB} \quad \text{(E23)}$$

$$\frac{d}{dt}P_{XB} = k_{n_pT} * N_{XB} - \left(k_{p_nT} + f_{appT}\right) * P_{XB} + g_{appT} * XB_{PreR} + g_{xbT} * XB_{PostR} \quad \text{(E24)}$$

$$\frac{d}{dt}XB_{PreR} = f_{appT} * P_{XB} - \left(g_{appT} + h_{fT}\right) * XB_{PreR} + h_{bT} * XB_{PostR} \quad \text{(E25)}$$

$$\frac{d}{dt}XB_{PostR} = h_{fT} * XB_{PreR} - (h_{bT} + g_{xbT}) * XB_{PostR} \quad \text{(E26)}$$

Alongamento das pontes-cruzadas

$$XB_{PreR}^{DutyFract} = \frac{f_{appT} * h_{bT} + f_{appT} * g_{xbT}}{g_{xbT} * h_{fT} + f_{appT} * h_{fT} + g_{appT} * h_{bT} + g_{appT} * g_{xbT} + f_{appT} * h_{bT} + f_{appT} * g_{xbT}} \quad \text{(E27)}$$

$$XB_{PostR}^{DutyFract} = \frac{f_{appT} * h_{fT}}{g_{xbT} * h_{fT} + f_{appT} * h_{fT} + g_{appT} * h_{bT} + g_{appT} * g_{xbT} + f_{appT} * h_{bT} + f_{appT} * g_{xbT}} \quad \text{(E28)}$$

$$\frac{d}{dt}xXB_{PreR} = \frac{1dSL}{2dt} + \frac{\phi}{XB_{PreR}^{DutyFract}} * \left[f_{appT} * (-xXB_{PreR}) + h_{bT} * (xXB_{PostR} - x_0 - xXB_{PreR})\right] \quad \text{(E29)}$$

$$\frac{d}{dt}xXB_{PostR} = \frac{1dSL}{2dt} + \frac{\phi}{XB_{PostR}^{DutyFract}} * \left[h_{fT} * (xXB_{PreR} + x_0 - xXB_{PostR})\right] \quad \text{(E30)}$$

Força ativa original e ajustada

$$XB_{PreR}^{Max} = \frac{f_{app} * h_b + f_{app} * g_{xb}}{g_{xb} * h_f + f_{app} * h_f + g_{app} * h_b + g_{app} * g_{xb} + f_{app} * h_b + f_{app} * g_{xb}} \quad \text{(E31)}$$

$$XB_{PostR}^{Max} = \frac{f_{app} * h_f}{g_{xb} * h_f + f_{app} * h_f + g_{app} * h_b + g_{app} * g_{xb} + f_{app} * h_b + f_{app} * g_{xb}} \quad \text{(E32)}$$

Original

$$F_{active}(x) = SOVF_{thick}(x) * \frac{xXB_{PreR} * XB_{PreR} + xXB_{PostR} * xXB_{PostR}}{x_0 * XB_{PostR}^{Max}} \quad \text{(E33)}$$

Ajustada

$$F_{active} = \left(\alpha * \frac{xXB_{PostR} * xXB_{PostR}}{x_0 * XB_{PostR}^{Max}}\right) + \beta \quad \text{(E34)}$$

Parâmetros

Quadro 5

Descrição	Variável	Valor	Valor Ajustado	Unidade
Tamanho máximo do sarcômero no modelo	SL_{max}	2.4	-	µm

Tamanho mínimo do sarcômero no modelo	SL_{min}	1.4	-	µm
Comprimento do filamento espesso	$length_{thick}$	1.65	-	µm
Comprimento do da parte sem sítios de ligação do filamento espesso	$length_{hbare}$	0.1	-	µm
Comprimento do filamento fino	$length_{thin}$	1.2	-	µm
Temperatura em graus Celsius	TmpC	15-37	25	ºC
Coeficiente Q10 para konT	Qk_{on}	1.5	-	sem unidade
Coeficiente Q10 para koffLT e koffHT	Qk_{off}	1.3	-	sem unidade
Coeficiente Q10 para kn_pT	Qk_{n_p}	1.6	-	sem unidade
Coeficiente Q10 para kp_nT	Qk_{p_n}	1.6	-	sem unidade
Coeficiente Q10 para fappT	Qf_{app}	6.25	-	sem unidade
Coeficiente Q10 para gappT	Qg_{app}	2.5	-	sem unidade
Coeficiente Q10 para hfT	Qh_f	6.25	-	sem unidade
Coeficiente Q10 para hbT	Qh_b	6.25	-	sem unidade
Coeficiente Q10 para gxbT	Qg_{xb}	6.25	-	sem unidade
Constante para associação de Ca-TnC	k_{on}	0.05	-	uM^-1.ms^-1

Constante para dissociação de Ca-TnC para sítios de baixa afinidade	k_{offL}	0.25	-	ms^{-1}
Constante para dissociação de Ca-TnC para sítios de alta afinidade	k_{offH}	0.025	-	ms^{-1}
Constante de meia ativação	$perm_{50}$	0.5	-	sem unidade
Coeficiente de Hill	n_{perm}	15	-	sem unidade
Constante para transição de N para P	k_{n_p}	0.05	-	ms^{-1}
Constante para transição de P para N	k_{p_n}	0.5	-	ms^{-1}
Constante específica para a espécie	$xbmod_{species}$	1	1.33	sem unidade
Constante específica para a espécie	$koffmod_{species}$	1	1.18	sem unidade
Constante para formação de pontes-cruzadas	f_{app}	0.5	-	ms^{-1}
Constante para desligamento de pontes-cruzadas	g_{app}	0.07	-	ms^{-1}
Constante de ajuste do filamento espesso	gslmod	6	-	sem unidade
Constante para transição de PreR para PostR	h_f	2	-	ms^{-1}
Constante para isomerização no estado PreR	hfmdc	5	-	sem unidade
Constante para transição de	h_b	0.4	-	ms^{-1}

PostR para PreR				
Constante para transição de PostR para P	g_{xb}	0.07	-	ms^{-1}
Constante para a velocidade positiva de encurtamento da PTC	σ_p	8	-	sem unidade
Constante para a velocidade negativa de encurtamento da PTC	σ_n	1	-	sem unidade
Distorção média da ponte cruzada após a rotação	x_0	0.007	-	µm
Parâmetro do modelo obtido empiricamente	ϕ	2	-	sem unidade
Parâmetro para ajuste da amplitude	α	$1*10^{-6}$	-	sem unidade
Parâmetros para ajuste da diástole	β	0.1	-	sem unidade

6.2 ATUALIZAÇÃO DO FORCELAB

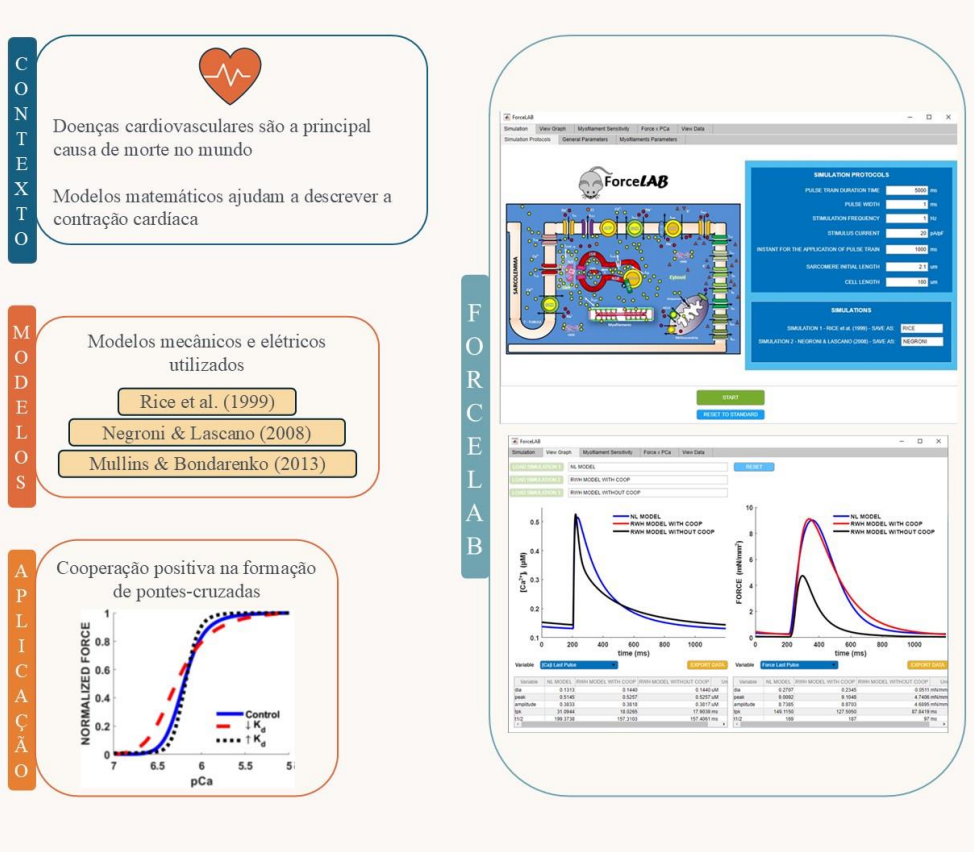
Título: ForceLAB simulator update: a study on the positive cooperativity of cross-bridge formation in ventricular myocyte

Evento: IX Latin American Congress on Biomedical Engineering and XXVIII Brazilian Congress on Biomedical Engineering

Revista: IFMBE Proceedings

Artigo submetido em 08/06/2022

Hipótese: A inclusão do mecanismo de cooperatividade positiva na formação de pontes cruzadas no modelo de Rice *et al.* (1999) é responsável pelo comportamento não paralelo da curva força vs. pCa ao se variar a afinidade do cálcio pela troponina C.



Atualização do simulador ForceLAB: um estudo sobre a cooperatividade positiva na formação de pontes cruzadas em miócitos ventriculares

Matheus Leonardo Alves de Camargo[1[0000-0002-4071-8741], José Wilson Magalhães Bassani[2,3[0000-0003-4202-6420], Rosana Almada Bassani2[0000-0002-6453-1359] and Robson Rodrigues da Silva1,2[0000-0003-1082-0777]

[1] Núcleo de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Brasil
[2] LabNECC/Centro de Engenharia Biomédica, Universidade de Campinas, Campinas, Brasil
[3] Departamento de Engenharia Biomédica/Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade de Campinas, Brasil
matheus.leonardo675@gmail.com

Resumo. As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte no mundo. Compreender os mecanismos que controlam a contração do coração é essencial para lidar com esse problema. Como ferramentas auxiliares, modelos matemáticos têm sido usados para descrever esses fenômenos em nível celular. Modelos elétricos e mecânicos de miócitos ventriculares foram implementados em simuladores computacionais para análise. Um deles é o ForceLAB, no qual dois dos principais modelos de força de contração foram implementados: Rice et al. (1999) (RWH) e Negroni & Lascano (2008) (NL). O objetivo deste artigo é apresentar uma versão atualizada da ferramenta ForceLAB, à qual foram adicionadas funcionalidades, entre elas a possibilidade de exportar valores de variáveis importantes como saída. A nova versão do ForceLAB foi implementada utilizando o App Designer para o desenvolvimento das novas interfaces. Como aplicação, foi testada a influência da cooperatividade positiva entre pontes cruzadas no comportamento incomum da relação Ca^{2+}-força simulada com o modelo RWH. Foram simuladas as formas de onda transientes de contração do tipo twitch da concentração de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]_i$), força desenvolvida e a curva força vs. pCa (onde pCa = -log [Ca2+]i). Os resultados mostraram que o deslocamento não paralelo da curva força vs. pCa com a variação do Ca^{2+} no miofilamento não foi corrigido pela ausência do mecanismo de cooperatividade positiva incluído na formulação do modelo RWH.

Palavras-chave: Modelo Matemático, Contração, Miócito Cardíaco, Cooperatividade de Pontes Cruzadas, Experimentos in silico.

Introdução

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. Em 2019, causaram cerca de 17,9 milhões de óbitos, representando 32% das mortes globais, sendo 85% decorrentes de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral.

Compreender os mecanismos da contração cardíaca é uma tarefa crucial para elucidar a gênese de diversas doenças do coração. Essa compreensão envolve a descrição da dinâmica dos íons Ca^{2+} no miócito ventricular, que desempenha um papel-chave no desenvolvimento da contração. A entrada de Ca^{2+} na célula ocorre por meio dos canais tipo L durante o potencial de ação (PA), desencadeando a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, quando o Ca^{2+} se liga aos canais da organela, os receptores de rianodina. O aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} livre ($[Ca^{2+}]_i$) favorece a ligação do Ca^{2+} à troponina C (TnC), localizada no filamento fino dos sarcômeros, iniciando o processo de contração. A ligação Ca^{2+}-TnC desencadeia uma sequência de alterações conformacionais em proteínas do filamento fino da miofibrila, levando à interação actina-miosina (formação de pontes cruzadas). Diferentes abordagens têm sido utilizadas para modelar essa formação de pontes cruzadas, por exemplo, levando em consideração a cooperatividade entre pontes vizinhas e/ou o comprimento do sarcômero.

A modelagem matemática e computacional é uma ferramenta importante para a compreensão de fenômenos biológicos. É possível, por exemplo, investigar os mecanismos das arritmias cardíacas por meio de simulações da atividade elétrica de células miocárdicas. Para a descrição do fenômeno da contração cardíaca em miócitos ventriculares, dois modelos têm sido amplamente utilizados: o modelo de 1999 de Rice et al. (Rice, Winslow e Hunter – RWH) e o modelo de 2008 de Negroni & Lascano (NL). Esses modelos foram implementados em um simulador desenvolvido recentemente por Silva et al., o ForceLAB. Nesse trabalho, foram apresentadas as funcionalidades do simulador e a comparação entre os dois modelos. O simulador foi inicialmente desenvolvido na versão 2017a do MATLAB, que possui limitações no desenvolvimento de aplicações. Uma das pendências dos testes realizados naquele estudo foi o resultado atípico observado na curva força vs. pCa simulada com o modelo RWH quando a afinidade da interação Ca^{2+}-TnC foi modificada. Uma das hipóteses levantadas foi que esse

comportamento incomum seria decorrente da cooperatividade positiva na formação de pontes cruzadas implementada pelos autores no modelo RWH.

O objetivo do presente artigo foi relatar uma atualização do simulador ForceLAB, apresentando as novas funções e as principais diferenças entre as duas versões da ferramenta. Como aplicação da nova versão do simulador, foi realizado o teste da hipótese anterior sobre o envolvimento da cooperatividade positiva na formação de pontes cruzadas no comportamento incomum da curva simulada com o modelo RWH.

Materiais e Métodos

A. Modelo de Rice et al. de 1999 (RWH). O modelo para estimar a força de contração do miócito proposto por Rice *et al.* (RWH) é baseado na formação de pontes cruzadas entre miosina e actina. A ligação entre essas proteínas ocorre após a exposição do sítio de ligação da miosina no filamento de actina, decorrente do deslocamento da tropomiosina desencadeado pela associação Ca^{2+}-TnC. O modelo RWH descreve 6 estados de permissividade para formação de pontes cruzadas: 2 não permissivos (N0 e N1), e 4 permissivos (P0, P1, P2 e P3). Todos esses estados são descritos no modelo como equações diferenciais acopladas:

$$N0+N1+P0+P1+P2+P3=1 \quad (1)$$

A transição entre os estados N0 e N1 para os estados permissivos depende da associação Ca^{2+}-TnC, que é modelada com base nas constantes de associação e dissociação desses ligantes, k_{on} e k_{off}, respectivamente. Nos estados permissivos, a transição ocorre por meio de parâmetros que prevêem a cooperatividade positiva na formação de pontes cruzadas. A força de contração desenvolvida (F_{contr}), expressa em mN por mm² de área de secção transversal celular, é formulada no modelo RWH como:

$$F_{contr} = \alpha.((P1 + N1 + 2.(P2) + 3.(P3))/(P1_{max} + 2.(P2_{max}) + 3.(P3_{max}))) \quad (2)$$

onde α é um fator de ajuste do modelo.

A Fig. 1A ilustra o esquema de transição entre os estados de formação de pontes cruzadas no modelo RWH. No estudo de Mullins & Bondarenko [16], o modelo RWH foi acoplado ao modelo eletrofisiológico do miócito ventricular de camundongo, previamente desenvolvido por Bondarenko *et al.* [17]. Esses modelos acoplados também foram utilizados no presente estudo.

B. Modelo de Negroni & Lascano 2008 (NL). No modelo NL, a força de contração está diretamente relacionada à interação Ca^{2+}-TnC. Essa ligação é descrita em 6 estados do sistema de troponina (TS): (a) [TS]: estado livre de Ca^{2+}; (b) [TSCa]: Ca^{2+} ligado à TnC sem formação de ponte cruzada; (c) [TSCa~]: Ca^{2+} ligado à TnC levando à formação de ponte cruzada fraca; (d) [TSCa*]: Ca^{2+} ligado à TnC levando à formação de ponte cruzada forte; (e) [TS~]: manutenção de ponte cruzada fraca sem Ca^{2+}-TnC; (f) [TS*]: manutenção de ponte cruzada forte sem Ca^{2+}-TnC. No modelo NL, a força de contração (F, em mN/mm²) é dada por:

$$F = A_w.([TSCa\sim] + [TS\sim]).h_w + A_p.([TSCa*] + [TS*]).h_p \quad (3)$$

onde A_w e A_p são constantes elásticas para os estados de ponte cruzada fraca e forte, respectivamente, e hw e hp indicam o alongamento da ponte cruzada nesses estados. Neste estudo, o modelo NL também foi acoplado ao modelo eletrofisiológico de Bondarenko *et al.* [17].

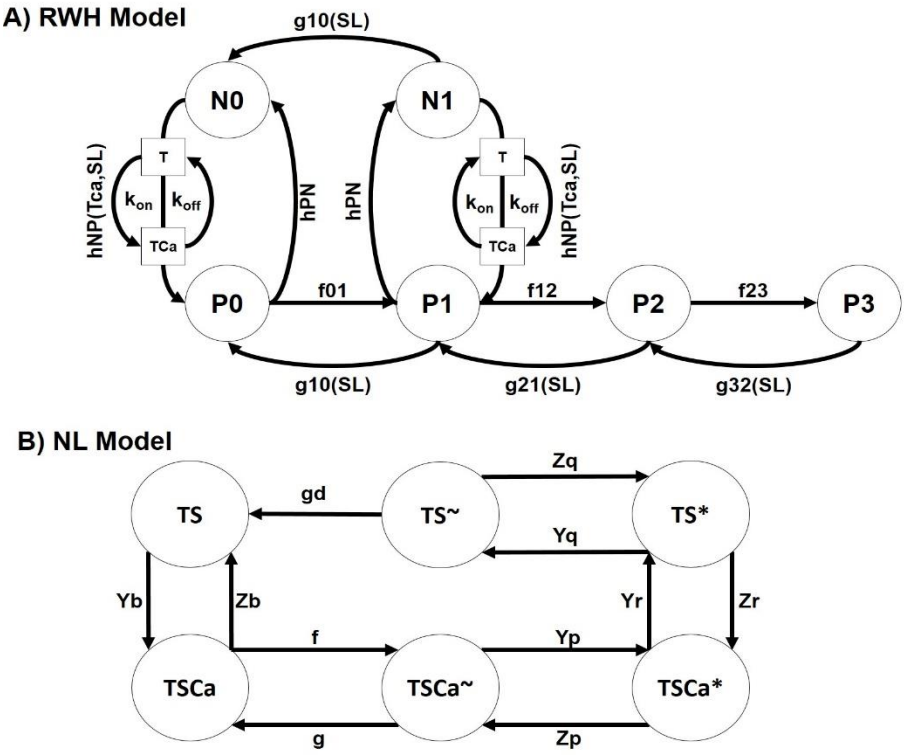


Fig. 1. Diagramas de estados dos modelos implementados no ForceLAB. A) Diagrama de estados do modelo RWH. B) Diagrama de estados do modelo NL.

C. O Simulador ForceLAB 2.0. Para permitir a resolução do sistema de 51 equações diferenciais acopladas e a apresentação gráfica dos resultados das simulações, foi realizada uma atualização no simulador ForceLAB previamente publicado [15]. A nova versão foi desenvolvida utilizando o MATLAB 2019a, com as interfaces criadas por meio do App Designer.

D. Protocolos de Simulação. Utilizando a nova versão da ferramenta ForceLAB, foram simuladas respostas sustentadas à variação na concentração de Ca^{2+} extramiofibrilar e transientes de Ca^{2+} do tipo twitch e contrações evocadas por estímulos elétricos supralimiares, com os modelos RWH e NL, utilizando protocolos previamente empregados [15]: (a) duração total da simulação: 20 s; (b) duração do pulso de estimulação elétrica: 1 ms; (c) frequência de estimulação elétrica: 1 Hz; (d) corrente de estimulação: 20 pA/pF; (e) comprimento inicial do sarcômero: 2,1 µm; (f) comprimento celular: 100 µm. Para o modelo RWH, foram realizadas duas simulações: uma incluindo a cooperatividade positiva para formação de pontes cruzadas, e outra excluindo esse mecanismo. Essa modificação foi realizada alterando os valores assumidos para os parâmetros f_{01}, f_{12} e f_{23}, que controlam as transições entre os estados P0 e P1, P1 e P2, e P2 e P3, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 2.

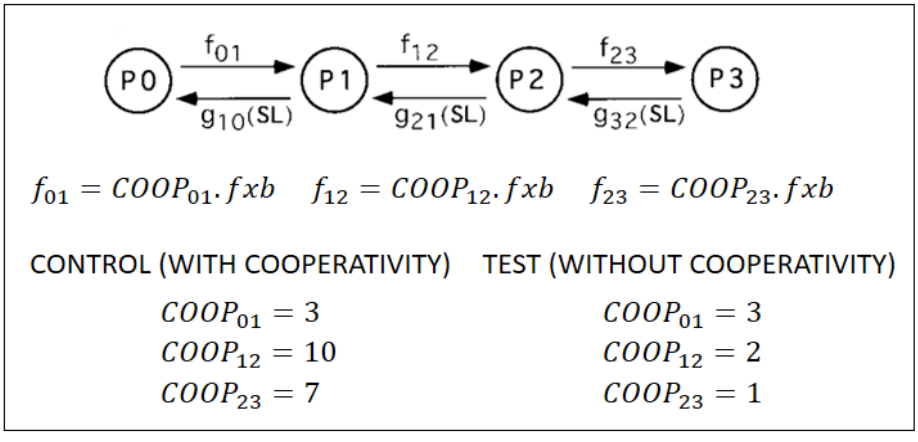


Fig. 2. Ilustração das etapas envolvidas e dos valores assumidos para os parâmetros modificados para testar a influência da cooperatividade positiva na formação de pontes cruzadas sobre a contração simulada com o modelo RWH.

A partir das formas de onda de $[Ca^{2+}]_i$ e força do tipo twitch evocadas em resposta à estimulação elétrica, as seguintes variáveis foram obtidas diretamente no simulador ForceLAB: os valores diastólico (Dia, ou seja, imediatamente antes da aplicação do estímulo) e de pico; a amplitude (Δ, ou seja, a diferença entre os valores de pico e diastólico); e os tempos até o pico (t_{peak}) e de meia queda ($t_{0.5}$). A relação força vs. pCa foi determinada utilizando a força em estado estacionário correspondente a cada valor de pCa (isto é, o logaritmo negativo da concentração molar de Ca^{2+}).

A curva força vs. pCa foi simulada seguindo as mesmas alterações na afinidade da TnC pelo Ca^{2+} testadas em [15], ou seja, aumento e diminuição da constante aparente de dissociação do Ca^{2+} pela TnC (K_d), dividindo-se e multiplicando-se k_{on} por 3, respectivamente. Utilizando o simulador ForceLAB, os valores de pCa_{50} (valor de pCa que corresponde a 50% da força de contração máxima registrada com concentração saturante de Ca^{2+}) e o coeficiente de Hill N_H (constante de inclinação da curva) foram calculados a partir da curva força vs. pCa.

Resultados

A. Atualização do ForceLAB. O principal resultado deste trabalho foi a versão atualizada do simulador ForceLAB, na qual as principais funções da versão original [15] foram recriadas com a adição de novos recursos. As principais funcionalidades implementadas no ForceLAB 2.0 foram:

Tela inicial: inicia a ferramenta e dá acesso à seção "SOBRE", onde são apresentadas informações sobre a ferramenta, as instituições colaboradoras e os autores principais.

Simulação: a primeira aba exibida ao iniciar a ferramenta (Fig. 3) oferece ao usuário a possibilidade de executar simulações do modelo elétrico [16] acoplado aos modelos de contração RWH e NL. O usuário também pode modificar os protocolos de simulação, os parâmetros gerais do modelo elétrico e os principais parâmetros dos dois modelos de força de contração.

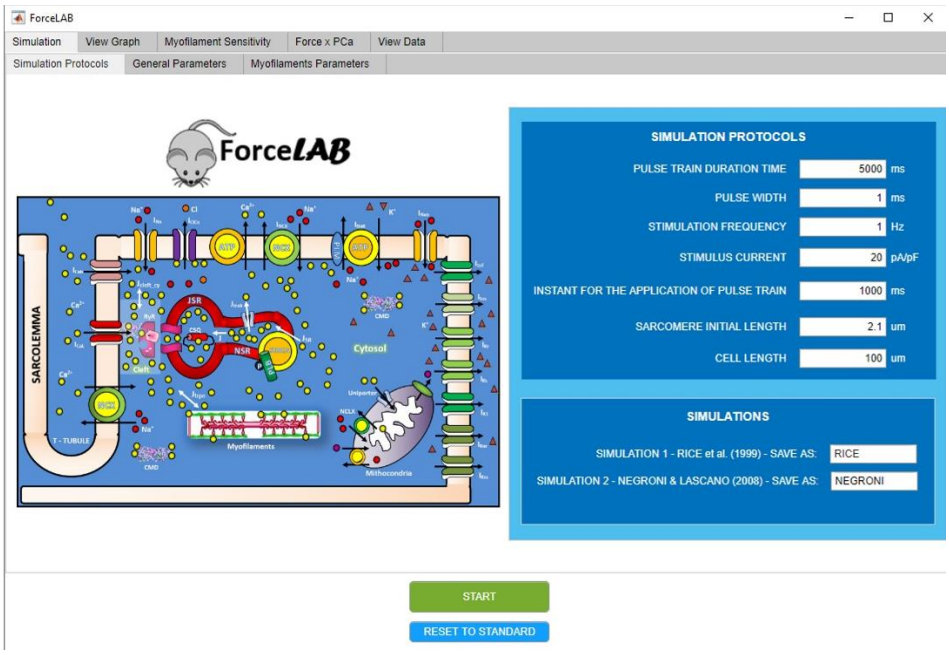


Fig. 3. Aba de simulação do ForceLAB: Acesso aos parâmetros gerais e eletrofisiológicos, além dos parâmetros relacionados aos miofilamentos dos modelos RWH e NL.

Visualizar gráfico: Permite exibir graficamente até 3 das simulações realizadas em cada um dos dois gráficos. As formas de onda que podem ser plotadas são: PA (potencial de ação), $[Ca^{2+}]_i$, $[Ca^{2+}]$ ligado à TnC ($[Ca^{2+}]_b$) e força de contração. Uma das novidades implementadas foi o cálculo automático de valores importantes extraídos das curvas: valores de diástole e pico, Δ, t_{pico}, $t_{0,5}$ e duração do PA em 20%, 50% e 90% da repolarização (APD20, APD50 e APD90, respectivamente). Esses valores são exibidos em tabelas abaixo dos gráficos e podem ser exportados no formato ".xlsx".

Sensibilidade dos miofilamentos: Nesta parte do simulador, é possível realizar testes alterando os parâmetros k_{on} e k_{off} da ligação Ca^{2+}-TnC, além de escolher os protocolos de simulação. As simulações são realizadas para os dois modelos de força de contração implementados, e as curvas do transiente de Ca^{2+} e da contração são plotadas junto com os valores calculados de diástole, pico, Δ, t_{pico} e $t_{0,5}$, que também podem ser exportados como arquivos ".xlsx".

Força vs. pCa: Nesta aba, o usuário pode variar o pCa e obter a força de contração no estado estacionário correspondente. O usuário pode escolher o modelo de contração e o valor de K_d alterando k_{on} e/ou k_{off} ($K_d = k_{off} / k_{on}$). Outras opções disponíveis são os valores iniciais e finais de pCa, o passo de pCa e os protocolos gerais de simulação. Os valores de K_d, pCa_{50} e N_H são calculados e também podem ser exportados como arquivos ".xlsx".

Visualizar dados: Área onde o usuário pode acessar os dados exportados nas outras abas em formato de tabela. Também é possível abrir os arquivos ".xlsx" gerados.

B. Influência da cooperatividade positiva na formação de pontes-cruzadas. Foram realizadas simulações para investigar se, e de que forma, o mecanismo de cooperatividade positiva na formação das pontes cruzadas, presente no modelo RWH, afeta os resultados da simulação. Na Fig. 4, que mostra a tela "Visualizar Gráfico" gerada pelo próprio simulador ForceLAB, é ilustrada a comparação dos transientes de Ca^{2+} do tipo *twitch* e das contrações simuladas com os modelos NL e RWH, este último com e sem cooperatividade. As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores do $[Ca^{2+}]_i$ do *twitch* e da contração, respectivamente, extraídos das curvas mostradas na Fig. 4.

Tabela 1. Variáveis do $[Ca^{2+}]_i$ do tipo *twitch* obtidas com os modelos NL e RWH, este último também sem incluir a cooperatividade positiva na formação das pontes cruzadas (sem coop). São apresentados os valores do $[Ca^{2+}]_i$ diastólico (Dia) e de pico, amplitude do transiente (Δ) e os tempos para pico (t_{pico}) e para meio-decaimento ($t_{0,5}$).

Variável	NL	RWH	RWH (sem coop)
Dia (μM)	0,13	0,14	0,14
Pico (μM)	0,51	0,53	0,53
Δ (μM)	0,38	0,38	0,38
t_{peak} (ms)	31,09	18,03	17,90
$t_{0.5}$ (ms)	199,37	157,31	157,41

Tabela 2. Variáveis da contração obtidas com os modelos NL e RWH, este último também sem incluir a cooperatividade positiva na formação das pontes cruzadas (sem coop). São apresentados os valores da força diastólica (Dia) e de pico, tensão desenvolvida (Δ) e os tempos para pico (t_{pico}) e para meio-decaimento/relaxamento ($t_{0,5}$).

Variáveis	NL	RWH	RWH (sem coop)
Dia (mN/mm^2)	0,27	0,23	0,05
Pico (mN/mm^2)	9,01	9,10	4,74
Δ (mN/mm^2)	8,74	8,87	4,69
t_{peak} (ms)	149,12	127,50	87,84
$t_{0.5}$ (ms)	169	187	97

A Fig. 5 mostra as curvas de força versus pCa obtidas com o modelo RWH sem cooperatividade, considerando o valor original de K_d (controle) e as situações de aumento e diminuição de K_d por um fator de 3. As variáveis correspondentes estão apresentadas na Tabela 3.

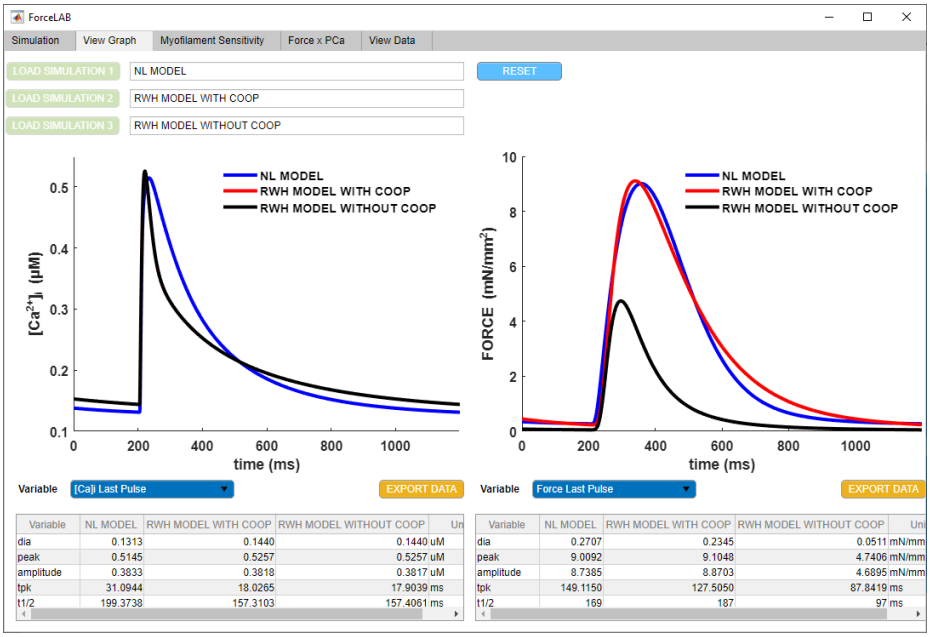


Fig. 4. Curso temporal dos transientes de $[Ca^{2+}]_i$ do tipo *twitch* e das contrações mostrados na aba de visualização de gráficos do ForceLAB. Eles correspondem às formas de onda simuladas com os modelos NL e RWH, este último incluindo ou não a cooperatividade positiva na formação das pontes cruzadas.

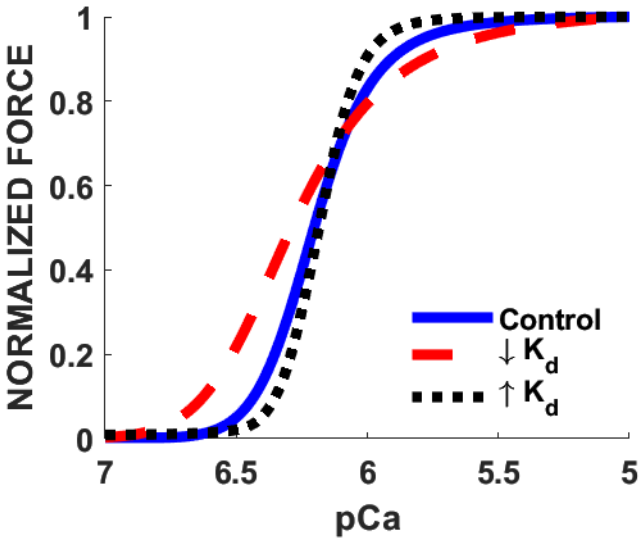


Fig. 5. Relação força versus pCa simulada com o modelo RWH sem o mecanismo de cooperatividade, usando o valor original de K_d (controle), e após seu aumento (seta para cima) e diminuição (seta para baixo) em 3 vezes.

Tabela 3. Parâmetros das curvas força versus pCa mostradas na Fig. 5, sem a cooperatividade positiva das pontes cruzadas, utilizando os valores original (controle), aumentado e diminuído da constante aparente de dissociação (K_d) por um fator de 3. São apresentados os valores do pCa em que a força é metade do máximo (pCa_{50}), o coeficiente de Hill (N_H) e o (K_d).

Variáveis	Controle	K_d↑	K_d↓
pCa_{50}	6,21	6,19	6,29
NH	3,17	3,79	2,31
K_d (μM)	0,60	1,80	0,20

Discussão

A presente atualização do ForceLAB teve como objetivo utilizar os novos recursos da versão MATLAB 2019, especialmente o App Designer. Em relação à usabilidade, o simulador agora possui suas funções agrupadas em uma única tela, onde o usuário acessa os recursos por meio de abas. Essa mudança torna o simulador mais fácil de usar, pois proporciona um ambiente único para as simulações. Uma das principais vantagens em relação à versão anterior [15] é o cálculo automático dos valores das principais variáveis usadas na análise, como os valores diastólicos e de pico, Δ, t_{pico} e $t_{0,5}$ das formas de onda do *twitch*. Assim, a análise dos resultados das simulações ficou muito mais simples, e a função de exportação dos dados em arquivos ".xlsx" assegura o salvamento e armazenamento rápido dos dados.

A remoção da cooperatividade positiva das pontes cruzadas da formulação do modelo RWH não afetou os valores de $[Ca^{2+}]_i$ nem o curso temporal do transiente durante um *twitch*. No entanto, a tensão diastólica ficou quase nula e a força desenvolvida diminuiu em quase 50%, com marcada aceleração no desenvolvimento da contração e no relaxamento. Portanto, a introdução da cooperatividade positiva, que reflete um fenômeno fisiológico [18], é necessária para uma simulação realista da contração tipo *twitch*. Contudo, não foram observadas alterações na relação força versus pCa após a remoção da cooperatividade da formulação do modelo RWH.

Mudanças simétricas (aumento e diminuição pelo mesmo fator), moderadas, em K_d são esperadas para resultar em deslocamentos simétricos e paralelos (para a direita e para a esquerda, respectivamente) nessa relação, como observado com o modelo NL. Entretanto, este não foi o caso com o modelo RWH: a diminuição de K_d também reduziu a inclinação da curva força versus pCa, enquanto o contrário foi observado quando K_d foi aumentado [15]. Infelizmente, a instabilidade do modelo impediu que testássemos o possível papel do mecanismo de cooperatividade positiva da miosina nesse resultado incomum na época. Com a versão 2.0 do ForceLAB, as limitações de software da versão anterior foram superadas, e a instabilidade observada no modelo pôde ser eliminada, o que possibilitou testar a hipótese levantada anteriormente. Contudo, os resultados atuais (Tabela 3 e Fig. 5) mostram que a variação do n_H decorrente das variações no valor de K_d para a interação Ca^{2+}-TnC ainda está presente, também com valores de n_H muito semelhantes aos quando a cooperatividade estava incluída no modelo [15]. Assim, outro aspecto da formulação deve ser responsável pelo padrão estranho da dependência da inclinação da relação força versus pCa pela afinidade do Ca^{2+} pela TnC.

Conclusões

As novas funcionalidades do simulador ForceLAB atualizado tornaram-no mais amigável ao usuário e possibilitam a coleta de dados quantitativos à medida que a simulação avança, permitindo seu registro e armazenamento rápidos. A versão 2.0 do ForceLAB está disponível para download após um breve cadastro no seguinte link: https://forms.gle/9nneEyX9NKDcjiah8.

Com esta versão aprimorada da ferramenta, foi possível descartar a hipótese de que a formulação do mecanismo de cooperatividade positiva das pontes cruzadas seria responsável pelos deslocamentos não paralelos em resposta às variações na afinidade Ca^{2+}-TnC na relação força versus pCa simulada com o modelo RWH. Portanto, são necessários mais estudos para esclarecer a origem desse resultado incomum.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 88887.627770/2021-00, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo nº 2016/18422-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; processo nº 304010/2016-2), Ministério da Saúde/FINEP (Conv. 0113021400, ref. 0441/12) e pela Universidade de Mogi das Cruzes.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

WHO at https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds).

Niederer, S. A., Campbell, K. S., & Campbell, S. G.: A short history of the development of mathematical models of cardiac mechanics. Journal of molecular and cellular cardiology, 127, 11–19 (2019). https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.11.015.

Bers, D. M.: Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, *415*(6868), 198–205 (2002). https://doi.org/10.1038/415198a.

Huxley, H. E.: The mechanism of muscular contraction. Science (New York, N.Y.), 164(3886), 1356–1365 (1969). https://doi.org/10.1126/science.164.3886.1356.

Fuchs, F., & Briggs, F. N.: The site of calcium binding in relation to the activation of myofibrillar contraction. The Journal of general physiology, 51(5), 655–676 (1968). https://doi.org/10.1085/jgp.51.5.655.

Winslow, R. L., Walker, M. A., & Greenstein, J. L.: Modeling calcium regulation of contraction, energetics, signaling, and transcription in the cardiac myocyte. Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine, 8(1), 37–67 (2016). https://doi.org/10.1002/wsbm.1322.

Sutanto, H., & Heijman, J.: Integrative Computational Modeling of Cardiomyocyte Calcium Handling and Cardiac Arrhythmias: Current Status and Future Challenges. Cells, 11(7), 1090 (2022). https://doi.org/10.3390/cells11071090.

Iyer, V., Mazhari, R., & Winslow, R. L.: A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte. Biophysical journal, 87(3), 1507–1525 (2004). https://doi.org/10.1529/biophysj.104.043299.

Hunter, P. J., McNaughton, P. A., & Noble, D.: Analytical models of propagation in excitable cells. Progress in biophysics and molecular biology, 30(2-3), 99–144 (1975). https://doi.org/10.1016/0079-6107(76)90007-9.

Beeler, G. W., & Reuter, H.: Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. The Journal of physiology, 268(1), 177–210 (1977). https://doi.org/10.1113/jphysiol.1977.sp011853.

Yanagihara, K., Noma, A., & Irisawa, H.: Reconstruction of sino-atrial node pacemaker potential based on the voltage clamp experiments. The Japanese journal of physiology, 30(6), 841–857 (1980). https://doi.org/10.2170/jjphysiol.30.841.

Plank, G., Loewe, A., Neic, A., Augustin, C., Huang, Y. L., Gsell, M. A. F., Karabelas, E., Nothstein, M., Prassl, A. J., Sánchez, J., Seemann, G., & Vigmond, E. J.: The openCARP simulation environment for cardiac electrophysiology. Computer methods and programs in biomedicine, 208, 106223 (2021). https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2021.106223.

Rice, J. J., Winslow, R. L., & Hunter, W. C.: Comparison of putative cooperative mechanisms in cardiac muscle: length dependence and dynamic responses. The American journal of physiology, 276(5), H1734–H1754 (1999). https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.276.5.H1734.

Negroni, J. A., & Lascano, E. C.: Simulation of steady state and transient cardiac muscle response experiments with a Huxley-based contraction model. Journal of molecular and cellular cardiology, 45(2), 300–312 (2008). https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.04.012.

Silva, R. R., Filho, O. B. S., Bassani, J. W. M., & Bassani, R. A.: The ForceLAB simulator: Application to the comparison of current models of cardiomyocyte contraction. Computers in biology and medicine, 131, 104240 (2021). https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104240.

Mullins, P. D., & Bondarenko, V. E.: A mathematical model of the mouse ventricular myocyte contraction. PloS one, 8(5), e63141 (2013). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063141.

Bondarenko, V. E., Szigeti, G. P., Bett, G. C., Kim, S. J., & Rasmusson, R. L.: Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 287(3), H1378–H1403 (2004). https://doi.org/10.1152/ajpheart.00185.2003.

Moss, R. L., Razumova, M., & Fitzsimons, D. P.: Myosin crossbridge activation of cardiac thin filaments: implications for myocardial function in health and disease. Circulation research, 94(10), 1290–1300 (2004). https://doi.org/10.1161/01.RES.0000127125.61647.4F.

Digite as informações do autor correspondente:

Autor: Matheus Leonardo Alves de Camargo
Instituto: Universidade de Mogi das Cruzes
Endereço: Av. Dr. Cândido X. de Almeida e Souza, 200
Cidade: Mogi das Cruzes
País: Brasil
Email: matheus.leonardo675@gmail.com

6.3 ESTUDO DE SENSIBILIDADE DOS MIOFILAMENTOS

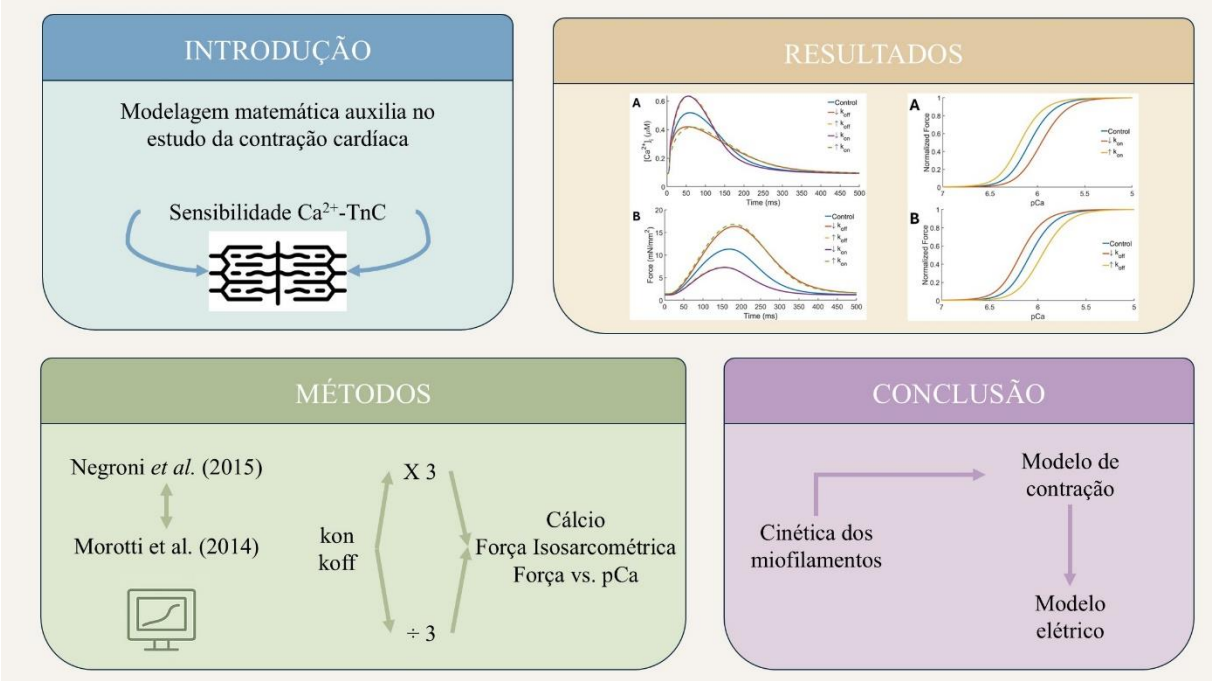
Título: Study on the effect of changing myofilament sensitivity to Ca^{2+} during twitches evoked using the Morotti model of cardiomyocyte electrophysiology

Evento: XXIX Brazilian Congress on Biomedical Engineering

Revista: IFMBE Proceedings

Artigo submetido em 18/07/2024

Hipótese: Mudanças nos parâmetros de ligação Ca^{2+}-TnC alteram a força de contração e os transientes de cálcio, mesmo com afinidade mantida constante e com o modelo de contração acoplado a um modelo elétrico.



Estudo sobre o efeito da alteração da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} durante contrações do tipo twitch evocadas utilizando o modelo de eletrofisiologia de cardiomiócitos de Morotti

M.L.A. Camargo[1], G.G. Silva[1], J.W.M. Bassani[3], R.A. Bassani[3], D. Sato[2] and R.R. Silva[1,3]
[1] Núcleo de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil
[2] Department of Pharmacology, University of California Davis, Davis, California, USA
[3] LabNECC, Centro de Engenharia Biomédica, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

Resumo— **A modelagem matemática é uma ferramenta valiosa para auxiliar na compreensão de fenômenos fisiológicos, como a contração cardíaca. Entre esses modelos, destaca-se o modelo eletrofisiológico do miócito ventricular de camundongo desenvolvido por Morotti *et al.* em 2014. No presente estudo, foi utilizada uma versão mais recente do modelo eletrofisiológico de Morotti, em conjunto com o modelo de Negroni, para investigar o impacto das alterações nas constantes de taxa de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}) do Ca^{2+} com a troponina C (TnC) sobre os transientes de Ca^{2+} e a força de contração durante contrações do tipo *twitch*. Isso permitiu avaliar a sensibilidade do aparato contrátil do cardiomiócito ao Ca^{2+} citosólico. Os cursos temporais da concentração de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) e da força de contração evocadas por um pulso de corrente foram simulados utilizando valores basais de k_{on} e k_{off} obtidos da literatura (condição controle), bem como valores modificados por um fator de 3 (condição teste). A relação entre força tônica e o logaritmo negativo da concentração molar de Ca^{2+} (pCa) também foi simulada nas condições controle e teste. Observou-se aumento da força de contração tipo *twitch*, redução da amplitude do transiente de Ca^{2+} e deslocamento para a esquerda da curva força vs. pCa nas simulações com aumento da afinidade da TnC pelo Ca^{2+}, enquanto o oposto foi observado quando a afinidade foi reduzida. Conclui-se que as alterações qualitativas resultantes da modificação da cinética da interação Ca^{2+}-TnC não dependem do modelo eletrofisiológico utilizado.**
Palavras-Chave— **Contração cardíaca, Miócito ventricular, Modelagem matemática, Miofilamentos, Cálcio.**

Introdução

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade em todo o mundo [1], o que tem motivado diversos estudos voltados à melhor compreensão da função miocárdica. Os miócitos ventriculares estão entre os principais alvos experimentais, uma vez que sua atividade contrátil é o principal determinante da eficiência do bombeamento do sangue pelo coração para a circulação.

Modelos matemáticos e computacionais têm sido utilizados para prever e compreender diversos aspectos da função dos cardiomiócitos, como a atividade elétrica [por exemplo, 2–4], o equilíbrio e os fluxos iônicos [por exemplo, 5,6] e a atividade contrátil [por exemplo, 7–9].

Os modelos matemáticos da função dos miócitos ventriculares são baseados em dados experimentais obtidos de preparações de diferentes espécies animais. Uma das espécies mais utilizadas nesses experimentos é o camundongo, o que assegura uma grande quantidade de informações disponíveis para o desenvolvimento dos modelos. Um modelo importante de miócitos ventriculares de camundongo foi desenvolvido por Morotti e colaboradores, inicialmente aplicado ao estudo da relação entre a concentração intracelular de Na^+ e a ativação da quinase II dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII) na gênese de arritmias [10]. Posteriormente, esse modelo foi utilizado em conjunto com o modelo de contração de Negroni et al. [7] para investigar microdomínios de sinalização, como feito por Surdo et al. [11]. Essa combinação permite uma simulação bastante abrangente dos aspectos funcionais da célula, incluindo o potencial de ação, as principais correntes iônicas, a dinâmica do Ca^{2+}, a ativação dos miofilamentos e o desenvolvimento da contração, o que possibilita a reprodução de condições relacionadas à sinalização regulatória e a estados fisiopatológicos.

Para que a contração cardíaca ocorra, os íons Ca^{2+} devem interagir com os sítios de ligação ao cátion divalente na troponina C (TnC), presente no filamento fino das miofibrilas [12]. Essa interação provoca uma mudança conformacional no complexo da troponina e na tropomiosina, expondo o sítio de ligação da actina à miosina, permitindo o acoplamento das cabeças de miosina (pontes cruzadas) com a actina. Além de determinar a força de contração desenvolvida e o encurtamento celular, a ligação do Ca^{2+} à TnC também afeta a concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$), moldando o transiente de Ca^{2+}, pois a TnC é, juntamente com a calmodulina, um dos principais tampões intracelulares passivos de Ca^{2+} [13].

A interação do Ca^{2+} com a TnC é regida pelas constantes de taxa de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}) do íon no sítio de ligação da TnC. Essas constantes definem a constante de equilíbrio (k_d), que é a razão entre k_{off} e k_{on}, e corresponde à concentração de Ca^{2+} na qual 50% dos sítios da TnC estão ocupados por Ca^{2+}. Alterações em k_d podem ocorrer em condições fisiológicas (por exemplo, variações de temperatura ou pH) e patológicas (por exemplo, mutações em proteínas dos miofilamentos), modificando a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} [14]. Simular tais alterações por

meio de modelos matemáticos de células cardíacas permite prever seu impacto na função celular e também testar quão bem o modelo é capaz de reproduzir alterações observadas em células vivas. Se o modelo reproduzir satisfatoriamente o fenômeno real, ele poderá então ser utilizado para investigar outros aspectos da fisiologia do cardiomiócito.

O presente estudo tem como objetivo investigar como alterações nas constantes k_{on} e k_{off} da TnC afetam os transientes de Ca^{2+} do tipo *twitch* e a força de contração, bem como a relação entre a força em estado estacionário e a concentração de Ca^{2+}, utilizando o modelo de Morotti [10,15] acoplado ao modelo de Negroni do aparato contrátil [7].

Materiais e métodos

O Modelo de Morotti de 2014

O modelo original [10], baseado no modelo de cardiomiócitos de coelho de Soltis & Saucerman [16] e adaptado para corresponder a dados experimentais de miócitos ventriculares de camundongo, foi desenvolvido com o objetivo de investigar a regulação da concentração de Na^{+} pela CaMKII. Ele contém formulações que descrevem as principais correntes iônicas, a variação do potencial de membrana durante o potencial de ação e a regulação beta-adrenérgica dos mecanismos celulares. O modelo também inclui quatro compartimentos para o Ca^{2+}: o retículo sarcoplasmático (RS), a fenda diádica, a subsarcolema e o citosol amplo.

O Modelo de Negroni de 2015

A versão mais recente deste modelo [7] foi baseada em versões propostas anteriormente [17,18]. Embora mantenha o mesmo conceito de dinâmica dos miofilamentos das versões anteriores, ela assume 5 estados para o sistema TnC-Ca^{2+} (em vez de 4 ou 6, como nas outras propostas). Os estados são: TnC sem Ca^{2+} ligado (TS), TnC com Ca^{2+} ligado (TSCa), TnC com Ca^{2+} ligado e formação de ponte cruzada fraca (TSCa~), TnC com Ca^{2+} ligado e formação de ponte cruzada forte (TSCa*) e TnC sem Ca^{2+} ligado com formação de ponte cruzada forte (TS*). Os estados e as taxas de transição entre eles estão representados no esquema da Fig. 1.

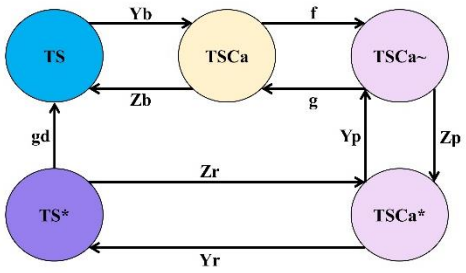


Fig. 1 - Esquema do modelo de Negroni *et al.* [7] (ver detalhes no texto).

O modelo de Negroni *et al.* [7] foi combinado pela primeira vez com o modelo de 2014 de Morotti *et al.* [10] no trabalho de Surdo *et al.* [11]. Uma versão posterior dessa combinação foi apresentada em 2021 por Morotti *et al.* [15], onde esse modelo completo foi comparado aos modelos de miócitos ventriculares de coelho [19] e de humanos [20]. O código utilizado nas simulações foi disponibilizado no material suplementar do estudo mais recente de Morotti *et al.* [15], o que permitiu a implementação do modelo combinado no presente estudo.

Protocolos de Simulação

As simulações foram conduzidas para verificar se, e de que forma, alterações em k_{on} e k_{off} que resultam no mesmo valor de k_d modificam os transientes de Ca^{2+} do tipo *twitch* e as curvas de força de contração desenvolvida. As alterações foram implementadas por meio da modificação de Y_b e Z_b (que representam k_{on} e k_{off}, respectivamente) (Fig. 1) no modelo de Negroni [10], de acordo com os valores indicados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores assumidos para as constantes de taxa de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}), bem como para a constante de equilíbrio (k_d) do sistema Ca^{2+}-troponina C na simulação. Observe que, para alterações recíprocas de mesma magnitude em k_{on} e k_{off}, o valor de k_d permanece inalterado.

Condição	k_{on} (M-1.min-1)	ko_{ff} (min-1)	k_d (M)
Controle	$181{,}6\times10^{6}$	0,1397	$7{,}69\times10^{-10}$
$k_{on}\uparrow$ (×3)	$544{,}8\times10^{6}$	0,1397	$2{,}56\times10^{-10}$
$k_{on}\downarrow$ (÷3)	$60{,}53\times10^{6}$	0,1397	$2{,}31\times10^{-9}$
$k_{off}\uparrow$ (×3)	$181{,}6\times10^{6}$	0,4191	$2{,}31\times10^{-9}$
$k_{off}\downarrow$ (÷3)	$181{,}6\times10^{6}$	0,0466	$2{,}56\times10^{-10}$

As simulações foram realizadas utilizando pulsos de corrente de 1 ms de duração e 20 pA/pF, aplicados a 1 Hz durante 30 segundos para produzir *twitches*. Foram determinados, em condições controle e teste, os valores diastólicos (Dia) e de pico do $[Ca^{2+}]_i$ e da força, bem como suas diferenças (Δ, ou seja, amplitude do transiente e da

contração), além do tempo para pico (t_{pico}) e do tempo de meio-decaimento ($t_{0,5}$) para ambas as formas de onda.

Outra simulação realizada com o modelo investigou a relação entre a força em estado estacionário e o logaritmo negativo da concentração molar de Ca^{2+} (pCa) no meio que banha os miofilamentos. A curva força versus pCa foi obtida para valores de pCa variando de 5 a 7, com incrementos de 0,1. As condições simuladas foram as mesmas apresentadas na Tabela 1. Foram determinados o valor de pCa no qual a força equivale a 50% da força máxima (pCa_{50}) e o coeficiente de Hill (n_H) para comparação.

Todas as simulações foram conduzidas utilizando o software MATLAB R2023b em um computador desktop equipado com processador Intel® Core i9 – 13900k 3 GHz, 128 GB de RAM e placa de vídeo NVIDIA® GeForce RTX 4080.

Resultados

Twitches dos Transientes de Ca^{2+} e Contração

Os transientes de Ca^{2+} do tipo *twitch* e as contrações correspondentes obtidas nas simulações utilizando as constantes mostradas na Tabela 2 estão apresentados na Fig. 2. Os parâmetros dessas formas de onda estão apresentados na Tabela 2.

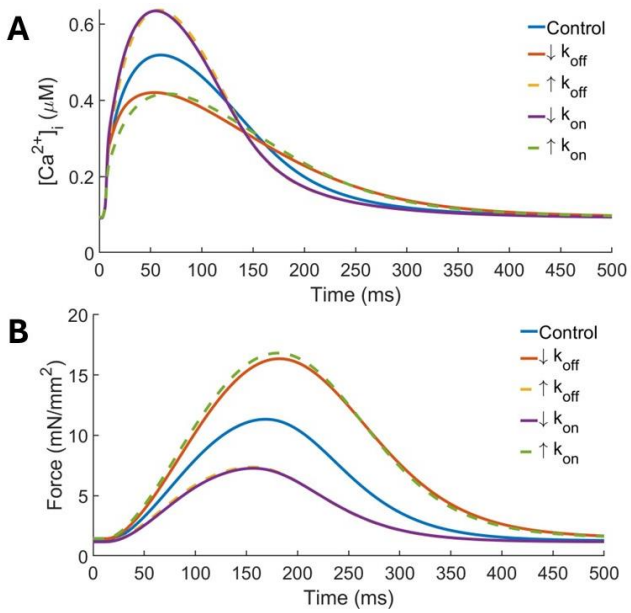


Fig. 2 - Transientes de Ca^{2+} do tipo *twitch* (A) e contrações fásicas (B) simuladas utilizando os valores apresentados na Tabela 1 para as constantes de taxa de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}) do Ca^{2+}-troponina C.

Alterações que resultam na diminuição de K_d (ou seja, aumento da afinidade da TnC pelo Ca^{2+}) aumentam a amplitude da contração, enquanto reduzem a amplitude do transiente de Ca^{2+}, de forma consistente com uma maior "sequestro" de Ca^{2+} pela TnC. O contrário foi observado quando o resultado final foi o aumento de K_d (ou seja, diminuição da afinidade da TnC pelo Ca^{2+}), ou seja, transiente de Ca^{2+} maior e amplitude da contração menor devido à diminuição da ligação do Ca^{2+} à TnC. Os resultados foram relativamente similares para alterações em K_d decorrentes de uma dada alteração em k_{on} ou da alteração recíproca de mesma magnitude em k_{off}. Isso indica que essas formas de onda (transiente de Ca^{2+} e contração) dependem mais da afinidade do que da cinética da interação TnC-Ca^{2+}.

Tabela 2 – Variáveis descritivas do transiente de Ca^{2+} do tipo *twitch* e da contração para as formas de onda simuladas apresentadas na Fig. 2.

	Dados	Controle	Diminuição k_d		Aumento k_d	
			k_{on} ↑ (×3)	k_{off} ↓ (÷3)	k_{on} ↓ (÷3)	k_{off} ↑ (×3)
$[Ca^{2+}]_i$	Dia (μM)	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
	Pico (μM)	0,52	0,42	0,42	0,64	0,64
	$\Delta[Ca^{2+}]_i$ (μM)	0,43	0,33	0,33	0,55	0,55
	t_{peak} (ms)	60,54	65,7	53,45	54,61	56,25
	$t_{0.5}$ (ms)	97,31	124,83	129,01	80,93	78,33
Contraction force	Dia (mN/mm^2)	1,30	1,48	1,52	1,27	1,29
	Pico (mN/mm^2)	11,61	17,13	16,66	7,5	7,59
	ΔF (mN/mm^2)	10,31	15,65	15,14	6,23	6,31
	t_{peak} (ms)	153,7	169,3	164,6	137,2	137,2
	$t_{0.5}$ (ms)	90	104	108	84	84

Curva Força vs. pCa

A simulação da curva força em estado estacionário versus pCa está apresentada na Fig. 3. Os parâmetros dessas curvas estão apresentados na Tabela 3.

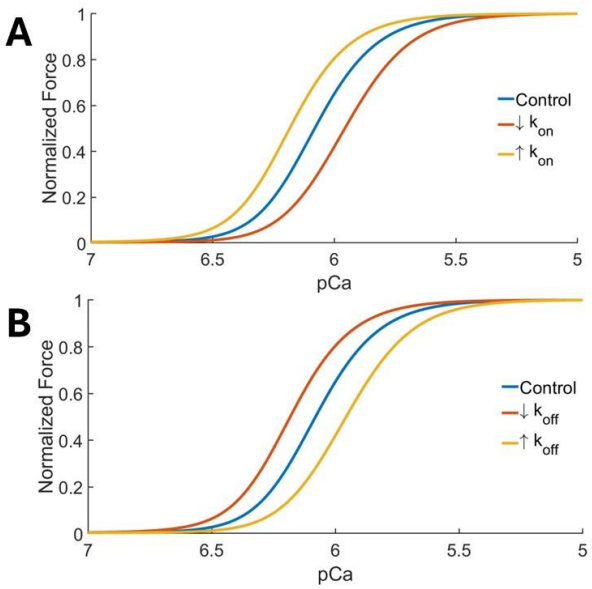


Fig. 3 – Força desenvolvida em estado estacionário em função do logaritmo negativo da concentração molar de Ca^{2+} (pCa) no meio que banha os miofilamentos, utilizando os valores das constantes de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}) do complexo troponina C-Ca^{2+} mostrados na Tabela 1.

Tabela 3 – Parâmetros das curvas força versus pCa mostradas na Fig. 3: o logaritmo negativo da concentração de Ca^{2+} na qual 50% dos sítios de ligação ao Ca^{2+} na TnC estão ocupados (pCa_{50}) e o coeficiente de Hill da curva (n_H).

Dados	Controle	Diminuição k_d		Aumento k_d	
		k_{on} ↑ (×3)	k_{off} ↓ (÷3)	k_{on} ↓ (÷3)	k_{off} ↑ (×3)
pCa_{50}	6,09	6,19	6,19	5,96	5,96
n_H	3,12	3,19	3,19	2,94	2,94

Como esperado, alterações que representam k_{on} ou k_{off} e que resultam no aumento de k_d (menor afinidade TnC-Ca^{2+}) causaram um deslocamento paralelo para a direita na curva força versus pCa, com aumento em pCa, enquanto alterações opostas que causam diminuição de k_d (maior afinidade TnC-Ca^{2+}) provocaram um deslocamento semelhante na curva força versus pCa na direção contrária, com redução em pCa.

O acoplamento entre o modelo elétrico do miócito ventricular de camundongo de Morotti *et al.* [10] e o modelo de força contrátil de Negroni *et al.* [7] demonstrou ser capaz de reproduzir a relação entre a dinâmica dos miofilamentos e o $[Ca^{2+}]_i$ esperada a partir das variações na afinidade dos miofilamentos pelo Ca^{2+}. Resultados similares foram obtidos utilizando outro modelo de eletrofisiologia, o de Bondarenko *et al.* [21], também de miócitos ventriculares de camundongo [8], e um modelo de contração bastante similar, também proposto pelo laboratório de Negroni [22].

Essa similaridade não é surpreendente, pois a) ambos os modelos eletrofisiológicos foram formulados com base em dados experimentais da mesma espécie e tipo celular. O modelo elétrico pode ser desenvolvido com base nas características eletrofisiológicas e do transporte de Ca^{2+} de diferentes espécies, resultando em diferentes formas de onda do potencial de ação e transientes de Ca^{2+} com amplitude e curso temporal variados. Contudo, os fenômenos mecânicos dependentes da interação do Ca^{2+} com os miofilamentos dependem exclusivamente da formulação e dos parâmetros do modelo de contração empregado, como observado em nosso estudo anterior [8]. Isso fica evidenciado pelas curvas força versus pCa quase idênticas obtidas utilizando os modelos de contração propostos por Negroni e colaboradores em um trabalho anterior [8] e no presente estudo.

Conclusões

O uso de diferentes modelos de eletrofisiologia pode modificar a resposta elétrica e os parâmetros do transiente de Ca^{2+}, mas essencialmente não afeta a modulação da atividade contrátil (desenvolvimento de força) pelas alterações na cinética da interação TnC-Ca^{2+}, que dependem essencialmente da formulação e dos parâmetros do modelo que descreve a interação do Ca^{2+} com os miofilamentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; bolsa 2016/18422-7), do Programa Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE; Código Financeiro 88881.846611/2023-01) e do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do CNPq e da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC).

Conflito de interesses

Os autores declaram que não possuem conflito de interesses.

Referências

1. Dattani S, Spooner F, Ritchie H and Roser M (2023) Causes of Death. Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/causes-of-death' [Online Resource]
2. Cairns SP, Leader JP, Higgins A, Renaud JM. The peak force-resting membrane potential relationships of mouse fast- and slow-twitch muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 2022;322(6):C1151-C1165. doi:10.1152/ajpcell.00401.2021

3. Cheng H, Charles I, James AF, Abdala AP, Hancox JC. Delayed Ventricular Repolarization and Sodium Channel Current Modification in a Mouse Model of Rett Syndrome. Int J Mol Sci. 2022;23(10):5735. Published 2022 May 20. doi:10.3390/ijms23105735
4. Bassani RA, Altamirano J, Puglisi JL, Bers DM. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} reloading in ventricular myocytes. *J Physiol* 2004; 559: 591-607, doi 10.1113/jphysiol.2004.067959
5. Bischof H, Burgstaller S, Vujic N, et al. Purification and Application of Genetically Encoded Potassium Ion Indicators for Quantification of Potassium Ion Concentrations within Biological Samples. Curr Protoc Chem Biol. 2019;11: e71. doi:10.1002/cpch.71
6. Bassani RA, Ricardo RA, Bassani JWM. Estimation of the fractional sarcoplasmic Ca^{2+} release in intact cardiomyocytes using integrated Ca^{2+} fluxes. *Gen Physiol Biophys* 2012; 31: 401-408,, doi: 10.4149/gpb_2012_042
7. Negroni JA, Morotti S, Lascano EC, et al. β-adrenergic effects on cardiac myofilaments and contraction in an integrated rabbit ventricular myocyte model. J Mol Cell Cardiol. 2015; 81:162-175. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.02.014
8. Silva RR, Souza Filho OB, Bassani JWM, Bassani RA. The ForceLAB simulator: application to the comparison of current models of cardiomycyte contraction. *Computers Med Biol* 2021; 131:104240, doi: 10.1016/j.compbiomed.2021.104240
9. Rice JJ, Wang F, Bers DM, de Tombe PP. Approximate model of cooperative activation and crossbridge cycling in cardiac muscle using ordinary differential equations. *Biophys J* 2008; 95: 2368-2390, doi: 10.1529/biophysj.107.119487
10. Morotti S, Edwards AG, McCulloch AD, Bers DM, Grandi E. A novel computational model of mouse myocyte electrophysiology to assess the synergy between Na+ loading and CaMKII. J Physiol. 2014;592:1181-1197. doi:10.1113/jphysiol.2013.266676
11. Surdo NC, Berrera M, Koschinski A, et al. FRET biosensor uncovers cAMP nano-domains at β-adrenergic targets that dictate precise tuning of cardiac contractility. Nat Commun. 2017; 8:15031. doi:10.1038/ncomms15031
12. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002;415(6868):198-205. doi:10.1038/415198a
13. Smith GL, Eisner DA. Calcium buffering in the heart in health and disease. Circulation 2019; 139: 2358-2371. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.039329
14. Chung JH, Biesiadecki BJ, Ziolo MT, Davis JP, Janssen PM. Myofilament Calcium Sensitivity: Role in Regulation of In vivo Cardiac Contraction and Relaxation. Front Physiol. 2016; 7:562. doi:10.3389/fphys.2016.00562
15. Morotti S, Liu C, Hegyi B, et al. Quantitative cross-species translators of cardiac myocyte electrophysiology: Model training, experimental validation, and applications. Sci Adv. 2021;7(47): eabg0927. doi:10.1126/sciadv. abg0927
16. Soltis A, Saucerman JJ Synergy between CaMKII substrates and β-adrenergic signaling in regulation of cardiac myocyte Ca2+ handling. Biophys J 2010 99:2038-2047. doi: 10.1016/j.bpj.2010.08.016
17. Negroni JA, Lascano EC. A cardiac muscle model relating sarcomere dynamics to calcium kinetics. J Mol Cell Cardiol. 1996;28(5):915-929. doi:10.1006/jmcc.1996.0086
18. Negroni JA, Lascano EC. Simulation of steady state and transient cardiac muscle response experiments with a Huxley-based contraction model. J Mol Cell Cardiol. 2008;45(2):300-312. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.04.012
19. Bartos DC, Morotti S, Ginsburg KS, Grandi E, Bers DM. Quantitative analysis of the Ca2+ -dependent regulation of delayed rectifier K+ current IKs in rabbit ventricular myocytes. J Physiol. 2017;595(7):2253-2268. doi:10.1113/JP273676
20. Moreno JD, Yang PC, Bankston JR, et al. Ranolazine for congenital and acquired late INa-linked arrhythmias: in silico pharmacological screening. Circ Res. 2013;113(7): e50-e61. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301971
21. Bondarenko VF, Szigeti GP, Bett GCL, Kim SJ, Rasmusson RI. Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 287: H1378-H1403; doi: 10.1152/ ajpheart.00185.2003
22. Negroni JA, Lascano EC. A cardiac muscle model rating sarcomere dynamics to calcium kinetics. J Mol Cell Cardiol 1996; 28: 915-929; doi: 10.1006/jmcc.1996.0086

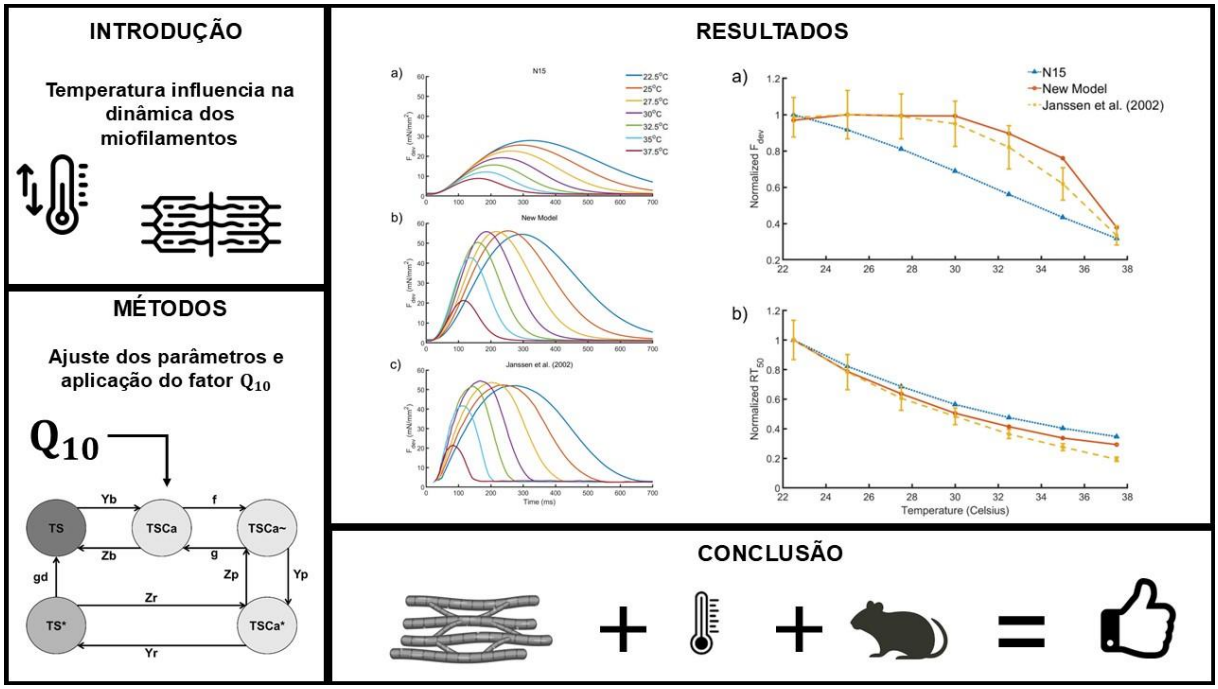
Autor para correspondência: Matheus Leonardo Alves de Camargo
Instituto: Universidade de Mogi das Cruzes
Endereço: Av. Dr. Cândido X. de Almeida e Souza, 200
Cidade: Mogi das Cruzes
País: Brasil
E-mail: matheus.leonardo675@gmail.com

6.4 NOVO MODELO PROPOSTO

Título: A computational model for temperature effects on myofilament dynamics in rodent ventricular myocytes

Revista para submissão: Annals of Biomedical Engineering

Hipótese: A inclusão de ajustes de temperatura, por meio do coeficiente Q10, nos parâmetros de transição do modelo de dinâmica dos miofilamentos permite simular com precisão os efeitos da temperatura na força de contração e na sensibilidade ao cálcio em miócitos ventriculares de roedores, reproduzindo os dados experimentais observados em diferentes faixas térmicas.



UM MODELO COMPUTACIONAL PARA OS EFEITOS DA TEMPERATURA NA DINÂMICA DOS MIOFILAMENTOS EM MIÓCITOS VENTRICULARES DE ROEDORES

Matheus Leonardo Alves de Camargo[1*], Daisuke Sato[2], José Wilson Magalhães Bassani[3], Rosana Almada Bassani[3], Robson Rodrigues da Silva[1,3]

[1]Núcleo de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brasil

[2]Department of Pharmacology, University of California, Davis, CA, Unites States of America

[3]LabNECC, Centro de Engenharia Biomédica, Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Autor Correspondente: [*]matheus.leonardo675@gmail.com

ORCID's: 0000-0002-4071-8741; 0000-0001-9341-0970; 0000-0003-4202-6420; 0000-0002-6453-1359; 0000-0003-1082-0777

Agradecimentos: Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES; código de financiamento 88887.627770/2021-00 e 88881.846611/2023-01), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo 2016/18422-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; bolsa nº 30400/2016-2), Ministério da Saúde/FINEP (Convênio 0113021400, ref. 0441/12) e Universidade de Mogi das Cruzes.

RESUMO

Objetivo: O relaxamento do músculo cardíaco é influenciado tanto pela remoção de cálcio (Ca^{2+}) do citosol quanto pela desativação das pontes cruzadas actina-miosina nos miofilamentos. A predominância desses mecanismos varia com a temperatura. Em temperaturas subfisiológicas, a remoção de Ca^{2+} é o principal fator limitante, enquanto em temperaturas fisiológicas, a cinética dos miofilamentos desempenha um papel determinante. **Métodos:** Para investigar essa dinâmica, um novo modelo de cinética dos miofilamentos acoplado a um modelo elétrico de miócitos ventriculares de roedores foi calibrado com dados experimentais. O novo modelo incorpora o coeficiente Q_{10} nos sete parâmetros que determinam as taxas de transição entre os estados cinéticos dos miofilamentos, permitindo a simulação da força contrátil em diferentes temperaturas. **Resultados:** O novo modelo replicou com sucesso o comportamento não linear da força desenvolvida. Para temperaturas entre 22,5 °C e 32,5 °C, a força gerada variou entre 50,36 mN/mm² e 56,20 mN/mm², em concordância com os dados experimentais relatados por Janssen *et al.*, que variaram de 51,69 mN/mm² a 54,53 mN/mm². Em temperatura fisiológica (37,5 °C), foi observada uma redução na força desenvolvida, com o novo modelo fornecendo um valor de 21,29 mN/mm², próximo ao valor experimental de 21,57 mN/mm². O uso de um método de simulação por população demonstrou comportamento qualitativamente semelhante às observações experimentais. Por fim, o modelo reproduziu a relação entre temperatura e sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}, conforme descrito experimentalmente. **Conclusão:** O modelo computacional recém-desenvolvido simula de forma eficaz a influência da temperatura na dinâmica dos miofilamentos em miócitos ventriculares de roedores, incorporando as interações entre cálcio, força e temperatura.

Palavras-chave: Contração cardíaca, Modelagem matemática, Miofilamentos, Temperatura, Relaxamento cardíaco.

INTRODUÇÃO

O relaxamento do músculo cardíaco é um processo complexo regulado por dois principais mecanismos: a remoção de íons cálcio (Ca^{2+}) do citosol e a dissociação das pontes cruzadas actina-miosina nos miofilamentos [1, 2]. A predominância de um desses mecanismos como fator limitante para o relaxamento depende da temperatura, alterando a dinâmica desse processo sob condições subfisiológicas e fisiológicas [3].

Em temperaturas subfisiológicas (por exemplo, 22,5 °C), a remoção de Ca^{2+} do citosol ($[Ca^{2+}]_i$) é o principal fator limitante. Após a contração, o Ca^{2+} é reabsorvido pelo retículo sarcoplasmático (RS) por meio da bomba SERCA e extrusado para o meio extracelular pelo trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX). Contudo, a eficiência desses mecanismos diminui em baixas temperaturas, prolongando a ligação do Ca^{2+} à troponina C (TnC) e retardando a desativação dos miofilamentos [3, 4].

Em temperatura fisiológica (37,5 °C), como em ratos e outros mamíferos, a remoção do Ca^{2+} ocorre significativamente mais rápido devido ao aumento da atividade da SERCA e do NCX. Nessa condição, a dissociação do Ca^{2+} da TnC deixa de ser o fator limitante para o relaxamento. Em vez disso, a limitação passa a ser a cinética de descolamento das pontes cruzadas actina-miosina, que ocorre em uma taxa relativamente mais lenta que a remoção do Ca^{2+} [5].

Janssen *et al.* [6] demonstraram essa transição no fator limitante para o relaxamento ao analisar diferentes temperaturas. Entre 22,5 °C e 30 °C, o tempo para alcançar 50% do relaxamento (RT_{50}) é prolongado devido à lenta remoção do Ca^{2+}. A 37,5 °C, o RT_{50} é reduzido, mas a análise do plano de fase (força vs. Ca^{2+}) indica que, mesmo com baixos níveis de $[Ca^{2+}]_i$, o relaxamento muscular não ocorre imediatamente, ressaltando o papel limitante da cinética dos miofilamentos. Assim, os dados experimentais indicam que: (a) em baixas temperaturas (22,5 °C e 30 °C), o relaxamento é principalmente limitado pela remoção de Ca^{2+}; (b) em temperatura fisiológica (37,5 °C), a dissociação das pontes cruzadas torna-se o principal fator limitante.

Para descrever matematicamente essas diferenças no relaxamento cardíaco, diversos modelos computacionais foram desenvolvidos. O modelo de

dinâmica dos miofilamentos proposto por Negroni *et al.* [7] (N15) tem sido amplamente utilizado para representar a mecânica celular em acoplamentos bidirecionais com modelos elétricos.

No estudo original, o N15 foi integrado ao modelo de Soltis-Saucerman [8] para miócitos ventriculares de coelho, incluindo sinalização β-adrenérgica. Posteriormente, Muangkram *et al.* [9] utilizaram esse modelo para investigar o consumo de ATP durante o acoplamento excitação-contração em mamíferos. Além disso, Surdo *et al.* [10] acoplaram-no a um modelo elétrico de miócitos ventriculares de camundongos, fornecendo insights sobre sinalização compartimentalizada (cAMP/PKA) na contração cardíaca.

Silva *et al.* [11] compararam uma versão anterior do modelo N15 [12] — que mantém a maior parte das características do modelo atual — com o modelo de Rice *et al.* [13], ambos acoplados ao modelo eletrofisiológico Mullins-Bondarenko [14] para miócitos ventriculares de camundongos. Os resultados demonstraram que o modelo de Negroni [12] reproduziu os dados experimentais com maior precisão e melhor ajuste às observações experimentais em comparação com o modelo de Rice [13], indicando uma representação mais fiel da dinâmica dos miofilamentos nas condições analisadas. Contudo, apesar de seu bom desempenho em testes anteriores, o modelo de Negroni [12] carece de parâmetros ou equações que considerem a influência da temperatura na dinâmica dos miofilamentos.

Em seu estudo de 2008, Rice *et al.* [15] introduziram um modelo de dinâmica dos miofilamentos incorporando o coeficiente Q_{10} nas equações de taxa de transição entre estados das pontes cruzadas. O coeficiente Q_{10} é uma constante que descreve a sensibilidade das taxas de reações bioquímicas e fisiológicas à temperatura. Especificamente, ele indica o quanto um processo biológico acelera ou desacelera com um aumento de 10 °C na temperatura [16]. O modelo desenvolvido por Rice *et al.* [15], baseado nessa formulação, reproduziu com sucesso os dados experimentais de De Tombe & Stienen [17] em músculo de rato a diferentes temperaturas subfisiológicas. Além disso, quando acoplado a um modelo elétrico de coelho, foi capaz de simular força isométrica em temperatura fisiológica (37 °C). No entanto, validações

sistemáticas avaliando força isométrica em diferentes temperaturas, como as realizadas por Janssen *et al.* [6], não foram efetuadas.

Assim, este estudo propõe o desenvolvimento de um novo modelo computacional para reproduzir *twitches* de força isométrica em diferentes temperaturas, em conformidade com os dados experimentais de Janssen et al. [6]. A característica distintiva deste modelo reside na incorporação explícita da influência da temperatura na dinâmica dos miofilamentos, aspecto não diretamente abordado em abordagens anteriores. Para esse propósito, o modelo N15 [7] foi selecionado como modelo base, acoplado ao modelo de miócito ventricular de Morotti *et al.* [18], escolhido com base nos testes conduzidos por Silva *et al.* [11]. A implementação da influência térmica foi realizada utilizando o coeficiente Q_{10} e ajustes nos parâmetros de relaxamento e desenvolvimento de força.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelo de Negroni *et al.* (2015)

O modelo matemático utilizado neste estudo foi o N15, que descreve a dinâmica dos miofilamentos com base em cinco estados distintos do Sistema Troponina (TS): (a) estado de ligação sem Ca^{2+} (TS); (b) estado ligado ao Ca^{2+} (TSCa); (c) estado de formação de ponte cruzada fraca ligada ao Ca^{2+} (TSCa~); (d) estado de formação de ponte cruzada forte ligada ao Ca^{2+} (TSCa*); e (e) estado de formação de ponte cruzada forte na ausência de ligação ao Ca^{2+}.

O modelo baseia-se na cooperatividade dos sítios de ligação de Ca^{2+} na troponina, considerando que cada TS consiste em uma unidade regulatória (RU) contendo três sítios de ligação de Ca^{2+}. A ligação de Ca^{2+} a um sítio promove a ligação nos sítios adjacentes. Para simplificar esse fenômeno, assume-se que cada TS está sempre saturado por três íons de Ca^{2+}.

Os estados descritos anteriormente são representados no modelo por meio de equações diferenciais acopladas, que são parametrizadas pelas taxas de transição ilustradas no diagrama da Figura 1.

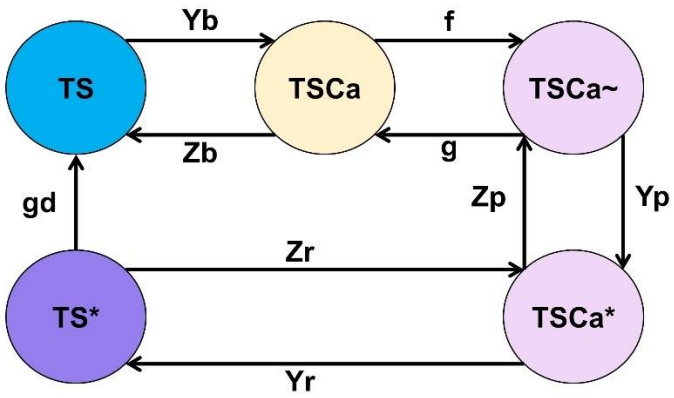


Figura 1. Diagrama dos estados dos miofilamentos e taxas de transição usadas para calcular a força de contração no modelo N15.

Os estados associados à formação das pontes cruzadas determinam a força contrátil, conforme especificado na Equação 1.

$$F_b = A_w * ([TSCa_3\sim]) * h_w + A_p * ([TSCa_3{}^* + TS^*]) * h_p \quad (1)$$

Onde A_w e A_p são constantes relacionadas ao número de pontes cruzadas nos estados fraco e forte, respectivamente, e h_w e h_p indicam a elongação média das pontes cruzadas nesses estados.

O modelo descrito no artigo original foi integrado ao modelo Soltis-Saucerman [8], desenvolvido para miócitos ventriculares de coelhos, que representa as correntes iônicas responsáveis pela geração do potencial de ação (PA), $[Ca^{2+}]_i$ e sinalização beta-adrenérgica. No presente estudo, o modelo de Morotti *et al.* [18] foi escolhido como estímulo para o modelo mecânico, pois é baseado em camundongos, proporcionando maior compatibilidade com os dados experimentais em ratos relatados por Janssen *et al.* [6].

Para garantir a calibração do modelo para diferentes faixas de temperatura, foram feitos ajustes em parâmetros fundamentais. A constante A_p foi adaptada para três faixas específicas de temperatura (Tabela 1), permitindo uma melhor calibração do modelo às variações térmicas. O parâmetro A_w, cuja formulação já seguia a relação $A_w = A_p / 5$, permaneceu inalterado.

Tabela 1. Ajustes adicionais no modelo N15: adaptações no parâmetro responsável pelas alterações na amplitude da força conforme a faixa de temperatura.

Parâmetro	Valor Original	Valor Ajustado	Temperatura	Unidade
A_p	$1008*10^4$	$1144{,}08*10^5$	22,5°C – 30°C	$mN/mm^2/\mu m/mM$
		$1209{,}6*10^5$	30°C – 35°C	$mN/mm^2/\mu m/mM$
		$7056*10^4$	35 °C – 37,5°C	$mN/mm^2/\mu m/mM$

Fator para Ajuste de Temperatura

Nos modelos matemáticos de miócitos ventriculares, o fator Q_{10} ajusta os parâmetros de reação ou fluxos iônicos que dependem da temperatura. O valor típico do Q_{10} para processos biológicos geralmente varia entre 2 e 3, o que significa que, em média, uma reação bioquímica tende a dobrar ou triplicar sua velocidade com um aumento de 10°C [3].

Para ajustar as taxas de transição da dinâmica dos miofilamentos no modelo N15, foi usada a seguinte Equação 2:

$$F_T = Q_{10}^{\left(\frac{T-T_{REF}}{10}\right)} \quad (2)$$

Onde T representa a variável temperatura e T_{REF} é a temperatura de referência em °C. No modelo, adotou-se T_{REF} = 37,5°C [6].

Esse ajuste exponencial permite que o modelo reflita melhor a fisiologia do miócito ventricular ao simular como os processos dependentes de temperatura (como o transporte iônico e o ciclo do Ca^{2+}) variam em função da temperatura. Essa abordagem é comum em modelos de eletrofisiologia celular, pois as taxas enzimáticas e os fluxos iônicos no coração são altamente sensíveis a variações de temperatura.

Reformular a expressão com uma divisão por 10 no expoente permite que o modelo represente as taxas dependentes da temperatura como uma função

contínua da temperatura, em vez de restringi-las a intervalos fixos de 10°C. Isso é importante para a precisão do modelo em condições experimentais e fisiológicas. Assim, se $T - T_{REF} = 10$, o expoente será 1, aplicando diretamente o fator Q_{10}. Se $T - T_{REF} = 20$, o expoente será 2, aplicando $(Q_{10})^2$.

Neste estudo, o coeficiente Q_{10} foi aplicado aos parâmetros relacionados à dinâmica dos miofilamentos (Tabela 2), seguindo a abordagem utilizada no modelo de Rice *et al.* [15], que já incorpora esse tipo de ajuste térmico. Para isso, foi estabelecida uma correspondência entre os parâmetros do modelo de Rice *et al.* [15] e os presentes no modelo N15, seguida de ajustes empíricos para calibrar o novo modelo.

Tabela 2. Parâmetros e constantes dos miofilamentos usados para ajuste de temperatura, com seus respectivos valores de Q_{10}.

Parâmetros de Transição	Equação	Const.	Valor	Unidade	Q_{10}	Valor
Yb	-	Yb	0,1816•	$\mu M^{-3} ms^{-1}$	Q_{kon}	1,5♦
Zb	-	Zb	0,1397•	ms^{-1}	Q_{koff}	1,3♦
f	$f = Ya * e^{-Ra*(L-La)^2}$	Ya	0,0023•	ms^{-1}	Q_{fapp}	2,5*
g	$g = Za + Yh$	Za	0,0161*	ms^{-1}	Q_{gapp}	2,5♦
Yp	-	Yp	0,1397•	ms^{-1}	Q_{hf}	2,5*
Zp	-	Zp	0,2095•	ms^{-1}	Q_{hb}	2,5*
gd	$gd = Yd * e^{-Yc*(L-Lc)}$	Yd	0,196*	ms^{-1}	Q_{gxb}	2,5*

* Adjusted Values ♦Rice *et al.* (2008) • Negroni *et al.* (2015)

Protocolos de Simulação

As simulações realizadas para a análise do *twitch* de força foram conduzidas usando protocolos ajustados para garantir a precisão e a estabilidade das variáveis simuladas. A corrente de estímulo aplicada foi de 9,5

pA/pF, seguindo o padrão do modelo de Morotti *et al.* [18], assegurando consistência com os parâmetros originalmente definidos. A frequência de estimulação foi mantida em 0,5 Hz, de acordo com o protocolo descrito por Janssen *et al.* [6], e o tempo total de simulação foi definido em 120 segundos, considerado suficiente para permitir a completa estabilização das variáveis fisiológicas.

As simulações foram realizadas para diferentes temperaturas, abrangendo os valores de 22,5°C, 25°C, 27,5°C, 30°C, 32,5°C, 35°C e 37,5°C, reproduzindo as condições térmicas empregadas no experimento original de Janssen *et al.* [6]. Esse protocolo foi projetado para avaliar de forma abrangente o impacto da temperatura na dinâmica da contração e relaxamento muscular.

Com base no protocolo descrito acima, foram realizados três testes:

Teste 1 – Simulação de Twitch Único: Os *twitches* de contração foram simulados utilizando os parâmetros de referência do novo modelo para cada temperatura analisada no estudo de Janssen *et al.* [6], permitindo a comparação com os dados experimentais e com o modelo sob condições controle. Os valores coletados incluíram força diastólica (F_{dia}), força máxima (F_{dev}), amplitude (ΔF), tempo até o pico (t_{peak}) e tempo para 50% de relaxamento após o pico (RT_{50}).

Teste 2 – Simulação com Tamanho de Amostra (n): Com base no método descrito por Sobie *et al.* [19], foram realizadas 10 simulações para cada uma das 7 temperaturas, nas quais 21 parâmetros do modelo de Morotti *et al.* [18] foram alterados aleatoriamente seguindo uma distribuição lognormal. Esse tipo de simulação é usado para aproximar os dados que seriam obtidos experimentalmente. O tamanho da amostra adotado neste estudo foi n = 10, em conformidade com Janssen *et al.* [6]. Para definir o intervalo da distribuição lognormal, o parâmetro σ deve ser especificado, sendo que o aumento de σ resulta em maior dispersão dos fatores que multiplicam os parâmetros. Para este estudo, foi adotado σ = 0,01. A metodologia completa está detalhada no artigo de Sobie *et al.* [19]. Os parâmetros utilizados na análise (Tabela 3), que foram

submetidos às perturbações, foram os mesmos empregados no estudo de Morotti *et al.* [20]. Durante as simulações, foram coletados os valores médios de F_{dia}, F_{dev}, ΔF, t_{peak} e RT_{50}.

Tabela 3. Definição dos parâmetros do modelo de Morotti *et al.* (2014) variáveis para a construção das populações de modelos.

Parâmetro	Descrição	Valor	Unidade
G_{Na}	Max conductance of fast Na^+ current (I_{Na})	10	mS/pF
G_{NaL}	Max conductance of late Na^+ current (I_{NaL})	0.013	mS/pF
G_{NaB}	Max conductance of background Na^+ current (I_{NaB})	0.0014	mS/pF
V_{NKA}	Max velocity of Na^+/K^+ ATPase current (I_{NaK})	5	µA/µF
G_{tof}	Max conductance of transient outward K^+ current (I_{tof})	0.44	mS/pF
G_{Kr}	Max conductance of rapid delayed rectifying K^+ current (I_{Ks})	0.03	mS/pF
$G_{K,slow1}$	Max conductance of ultra-rapidly activating and slowly inactivating K^+ current, 4-AP sensitive component ($I_{K,slow1}$)	0.176	mS/pF

$G_{K,slow2}$	Max conductance of ultra-rapidly activating and slowly inactivating K^+ current, TEA sensitive component ($I_{K,slow2}$)	0.14	mS/pF
G_{ss}	Max conductance of non inactivating steady-state K^+ current (I_{ss})	0.15	mS/pF
G_{Kp}	Max conductance of plateau K^+ current (I_{Kp})	0.001	mS/pF
G_{K1}	Max conductance of inwardly rectifying K^+ current (I_{K1})	0.3	mS/pF
G_{ClCa}	Max conductance of Ca^{2+}-activated Cl^- current (I_{ClCa})	0.109625	mS/pF
G_{ClB}	Max conductance of background Cl^- current (I_{ClB})	0.009	mS/pF
G_{CaL}	Max conductance of L-type Ca^{2+} current (I_{CaL})	1.65	mS/pF
G_{CaB}	Max conductance of background Ca^{2+} current (I_{CaB})	0.00075	mS/pF
V_{NCX}	Max velocity of Na^+/Ca^{2+} exchanger current (I_{NCX})	1.5	µA/µF

V_{PMCA}	Max velocity of plasma membrane Ca^{2+} ATPase current (I_{PMCA})	0.0673	μA/μF
V_{SERCA}	Max velocity of sarcoplasmatic reticulum Ca^{2+} ATPase flux (J_{up})	0.00038	mM/ms
V_{Rel}	Max velocity of ryanodine receptor Ca^{2+} flux (J_{Rel})	25	1/ms
V_{Leak}	Max velocity of ryanodine receptor Ca^{2+} leak (J_{Leak})	0.000011	1/ms

Teste 3 – Simulação da Curva Força vs. pCa: O teste força vs. pCa consiste em fixar a concentração intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) em um valor específico e, em seguida, avaliar a força máxima de contração gerada pelo miócito. A concentração $[Ca^{2+}]_i$ é expressa em termos de pCa, definida como o logaritmo negativo de $[Ca^{2+}]_i$. Este ensaio é utilizado para determinar a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}. As simulações foram realizadas para valores de pCa variando de 5,0 a 7,0, em incrementos de 0,1. As temperaturas simuladas foram 22,5°C, 27,5°C, 32,5°C e 37,5°C. A relação entre força e pCa foi modelada por uma função sigmoidal, descrita pela Equação 3 [21]:

$$F = \frac{F_{max}}{1 + 10^{(pCa - pCa_{50}).n_H}} \quad (3)$$

Onde F_{max} é a força máxima, pCa_{50} é o valor de pCa no qual a força é metade do valor máximo, e n_H é o coeficiente de Hill da curva. Os valores de pCa_{50} e do coeficiente de Hill foram coletados como parâmetros da curva. Além disso, a

curva força vs. $[Ca^{2+}]_i$ foi construída para os valores de pCa previamente descritos, sem normalizar a força pelo valor máximo.

Configuração para as Simulações

Os modelos foram implementados no MATLAB R2019a e resolvidos utilizando a função ode15s. As simulações foram realizadas em um computador desktop (Dell, OptiPlex 7050) com Windows 10 (64 bits) e processador Dual Core Intel® Core™ i7 (CPU 7700, 3,60 GHz).

RESULTADOS

Efeito da Temperatura no Novo Modelo de Contração

O novo modelo foi simulado em sete temperaturas diferentes, correspondentes às utilizadas nos experimentos de Janssen *et al.* [6]. Os *twitches* de contração isométrica simulados com e sem o ajuste do modelo, comparados com os dados experimentais de Janssen *et al.* [6], estão ilustrados na Figura 2. A Figura 3 apresenta os valores experimentais e simulados de F_{dev} e RT_{50}, normalizados em relação ao valor máximo. Os dados experimentais de F_{dev} e RT_{50} correspondem aos resultados médios obtidos nos testes conduzidos por Janssen *et al.* [6].

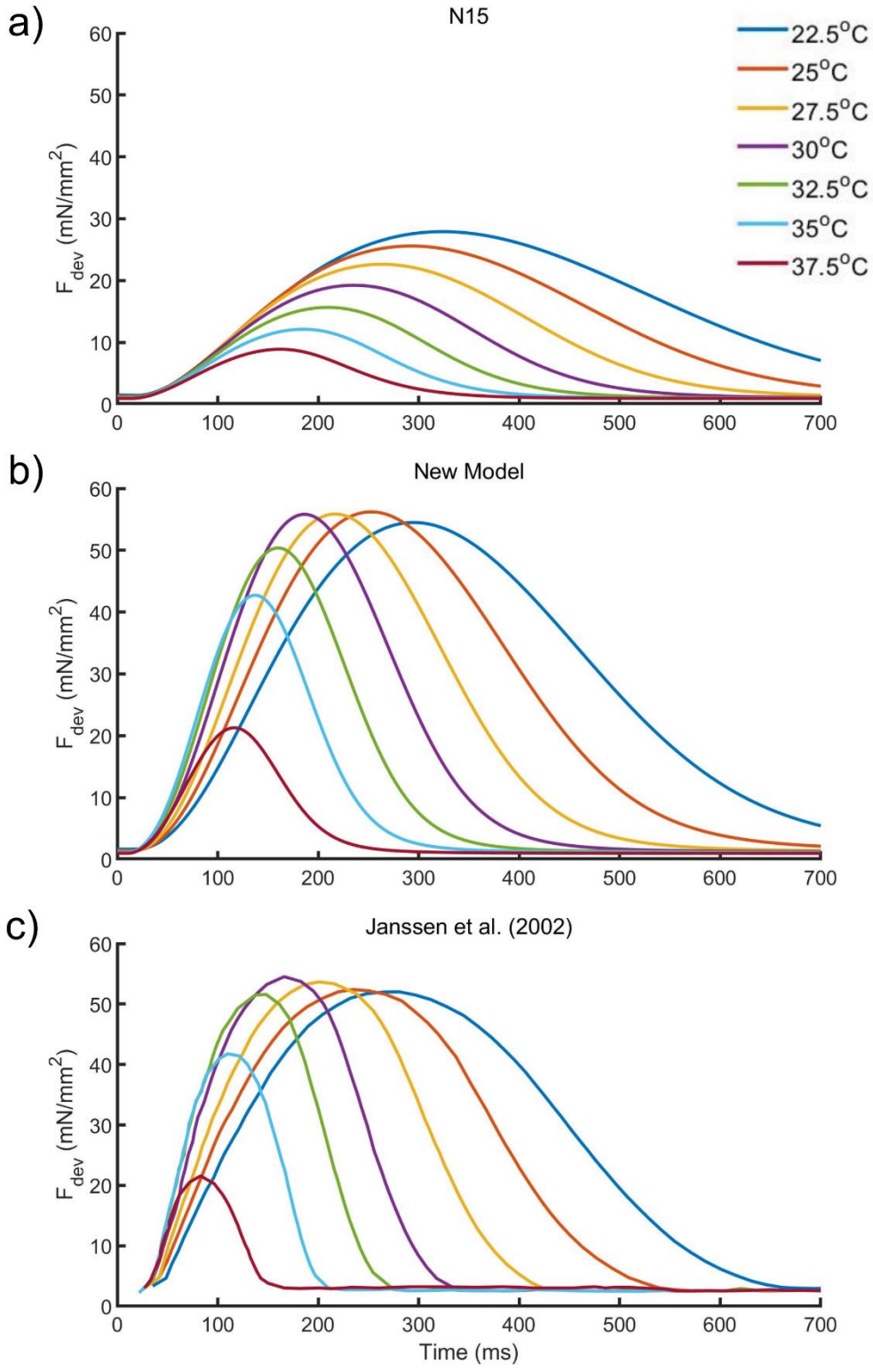


Figura 2. a) Simulação dos twitches usando o modelo N15 em diferentes temperaturas, considerando uma frequência de estimulação de 0,5 Hz. b) Resultados da simulação para o novo modelo sob o mesmo protocolo. c) Dados experimentais obtidos por Janssen *et al.* [6].

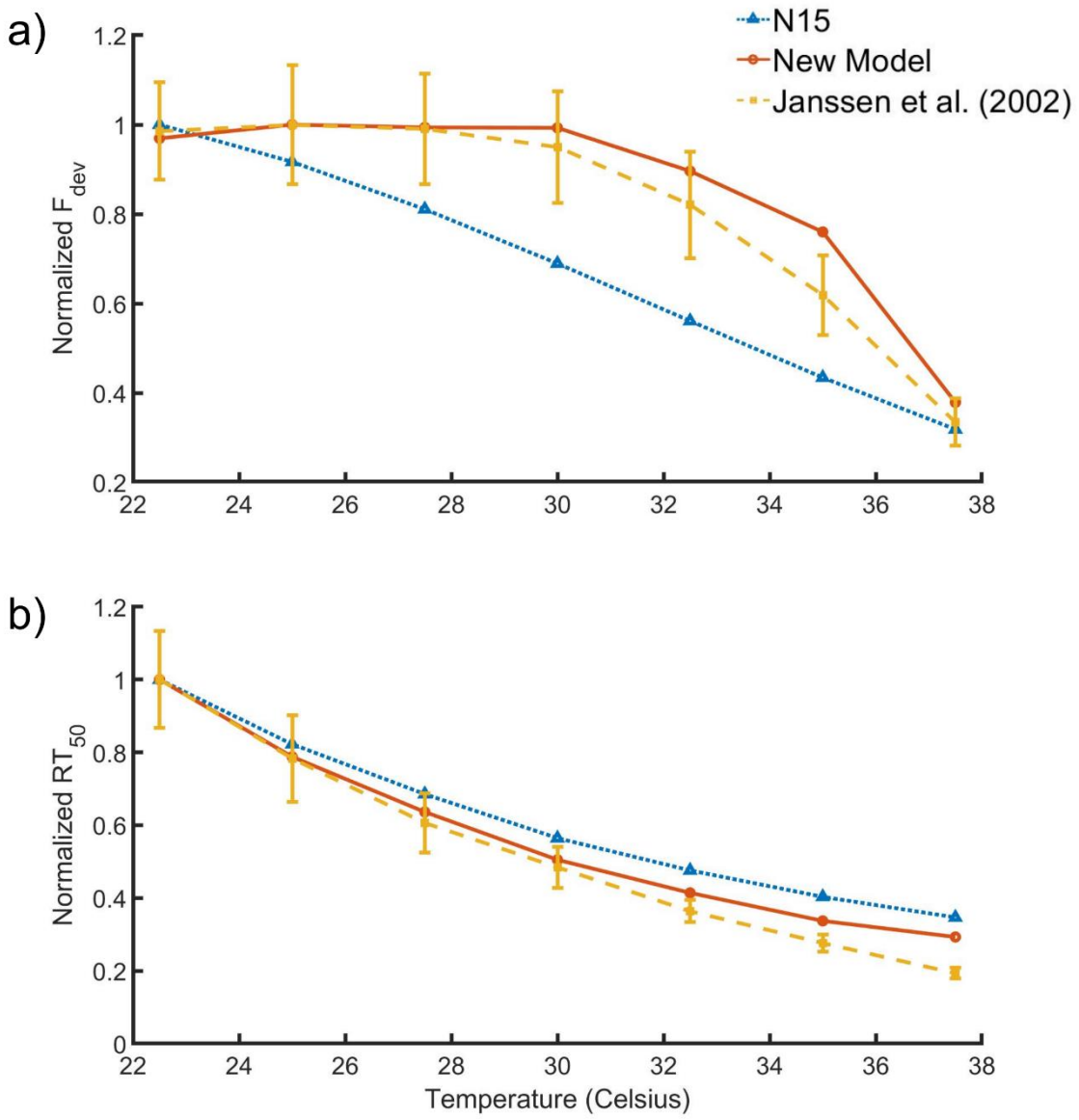


Figura 3. a) Comparação da força desenvolvida (F_{dev}) entre a simulação pelo modelo N15, o novo modelo e os dados experimentais. b) Mesma comparação para o tempo de relaxamento (RT_{50}).

A Figura 4 mostra a comparação entre os *twitches* gerados para cada temperatura pelo modelo N15, pelo novo modelo e os dados experimentais de Janssen *et al.* [6]. Essa análise facilita a visualização do desempenho do modelo sob diferentes condições térmicas. Os dados quantitativos desse teste estão apresentados na Tabela 4.

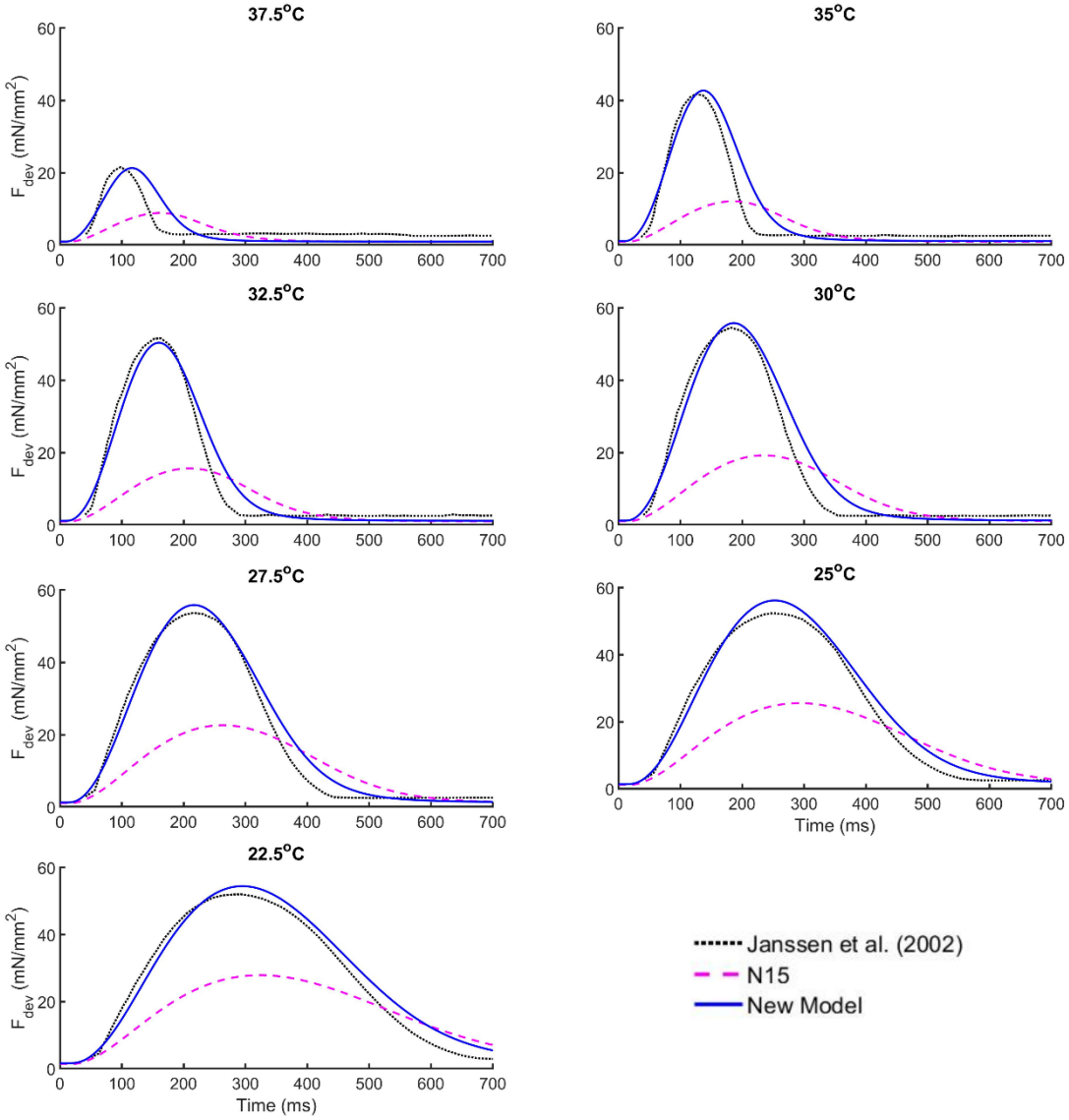


Figura 4. *Twitches* de contração isolados simulados para cada temperatura (37,5°C, 35°C, 32,5°C, 30°C, 27,5°C, 25°C e 22,5°C), considerando o modelo N15, o novo modelo e os dados experimentais.

Tabela 4. Quantitative data from the simulations and experiments illustrated in Figure 4.

Temperatura °C	Condição	F_{dia} (mN/mm²)	F_{dev} (mN/mm²)	ΔF (mN/mm²)	t_{peak} (ms)	RT_{50} (ms)
22.5	N15	1,46	27,90	26,46	323,59	248,00
	Novo Modelo	1,64	54,48	52,84	294,71	198,00
	Experimento	2,40	52,05	49,67	290,10	186,10
25	N15	1,21	25,58	24,36	292,38	204,00
	Novo Modelo	1,40	56,20	54,80	253,59	156,00
	Experimento	2,51	52,40	49,89	230,90	147,90
27.5	N15	1,10	22,62	21,53	262,03	170,00
	Novo Modelo	1,26	55,89	54,63	216,99	126,00
	Experimento	2,02	53,66	51,64	218,10	110,90
30	N15	1,02	19,24	18,21	234,78	140,00
	Novo Modelo	1,20	55,80	54,60	186,03	100,00
	Experimento	2,46	54,53	52,08	182,40	83,70
32.5	N15	0,98	15,65	14,68	209,11	118,00
	Novo Modelo	1,14	50,36	49,22	159,11	82,00
	Experimento	2,43	51,69	49,25	159,10	64,80
35	N15	0,94	12,12	11,18	184,72	100,00
	Novo Modelo	1,11	42,71	41,60	136,41	66,76
	Experimento	2,43	41,81	39,37	127,60	54,70
37.5	N15	0,92	8,88	7,97	161,56	86,00
	Novo Modelo	0,98	21,29	20,31	115,51	58,00
	Experimento	2,46	21,57	19,11	96,80	41,20

Simulação de contrações em *twitches* com alteração aleatória dos parâmetros biofísicos

A aplicação do protocolo descrito no Teste 2 resultou nas contrações em *twitches* ilustradas na Figura 5. Os resultados médios de F_{dev} e RT_{50}, comparados aos dados experimentais de Janssen *et al.* [6], são apresentados na Figura 6.

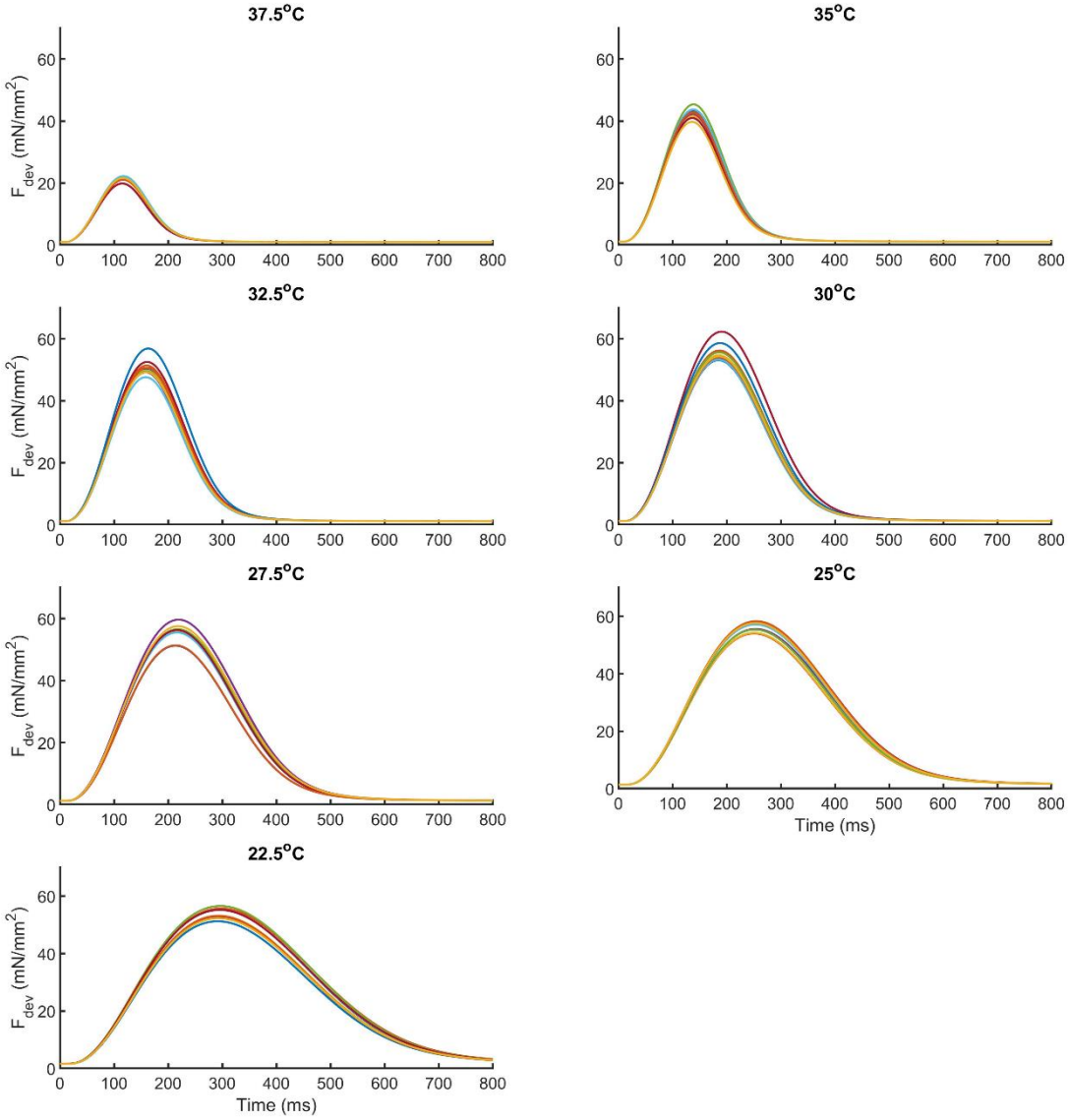


Figura 5. Contrações em *twitches* resultantes da aplicação do protocolo de simulação baseado em população no novo modelo. São ilustrados *twitches* isolados para cada temperatura (n = 10).

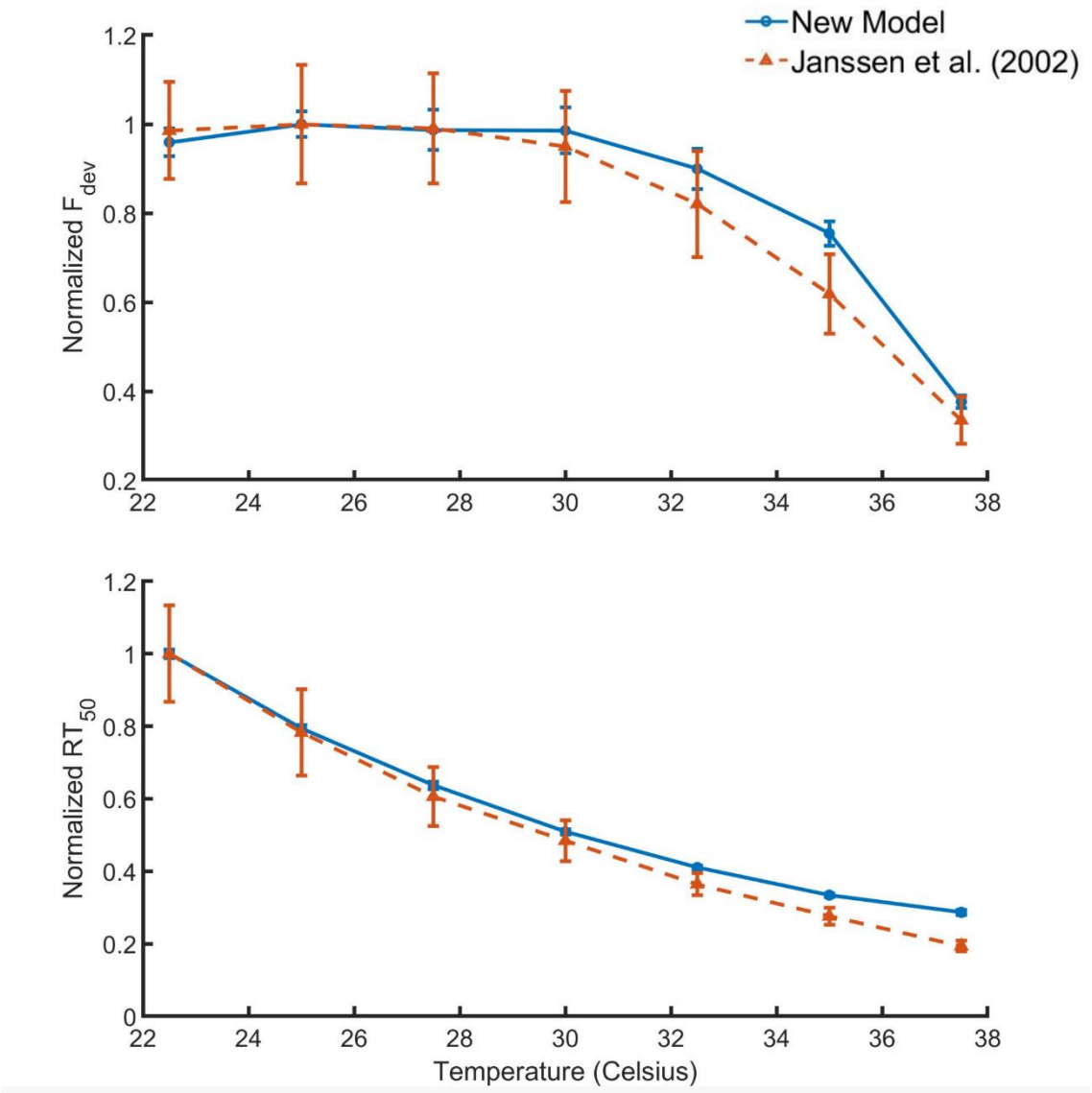


Figura 6. Comparação entre os valores médios de F_{dev} e RT_{50} dos *twitches* simulados e os dados experimentais de Janssen *et al.* [6].

Influência da Temperatura na Sensibilidade dos Miofilamentos

A influência do Ca^{2+} nos miofilamentos foi analisada utilizando os protocolos descritos no Teste 3. Essas análises foram conduzidas no novo modelo proposto em quatro temperaturas distintas (22,5°C, 27,5°C, 32,5°C e 37,5°C). A Figura 7 ilustra os resultados obtidos. Os dados quantitativos do teste força vs. pCa estão apresentados na Tabela 5.

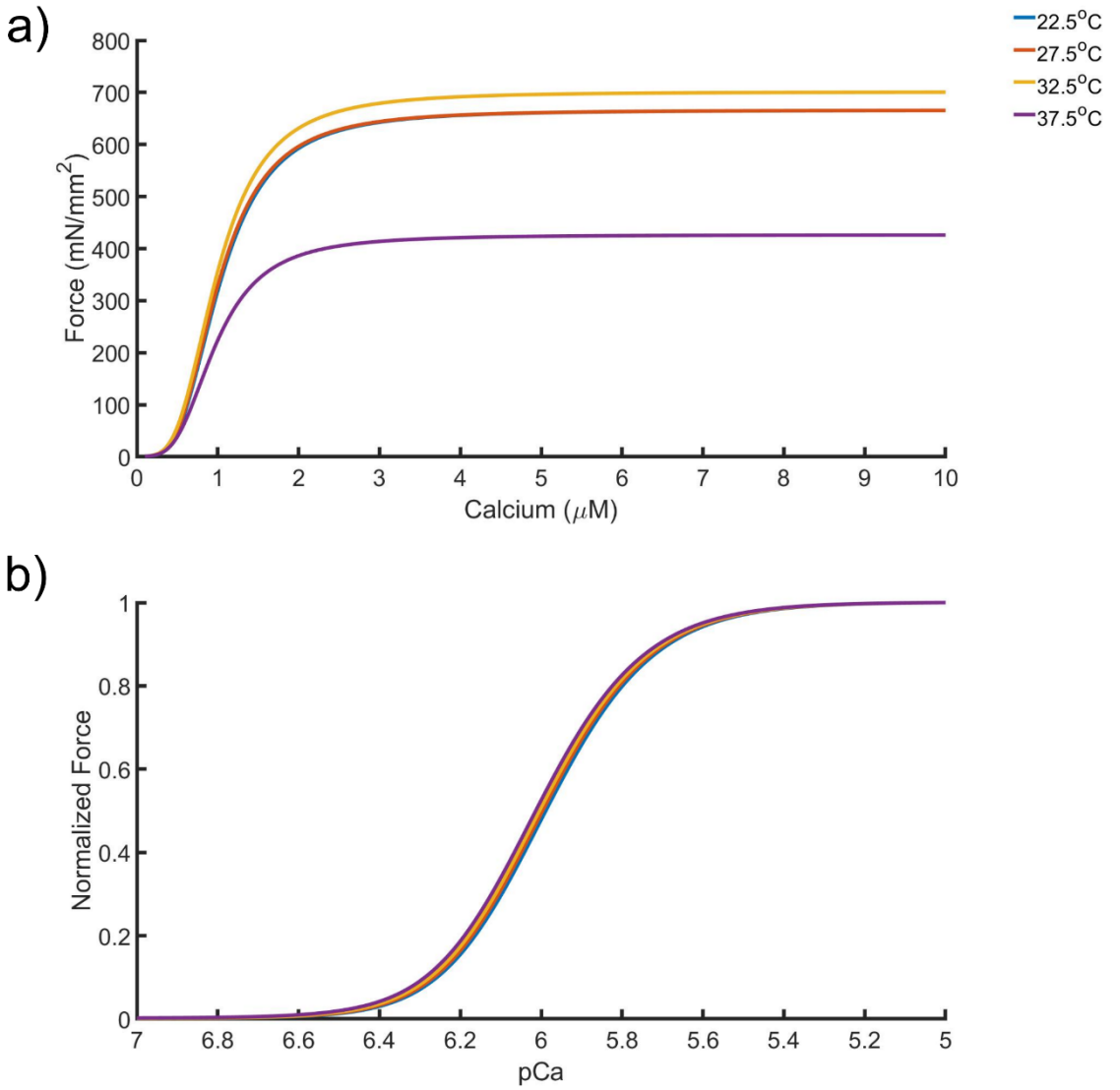


Figura 7. a) Simulação da curva força vs. $[Ca^{2+}]_i$ para as temperaturas 22,5°C, 27,5°C, 32,5°C e 37,5°C. b) Simulação da curva força vs. pCa para as mesmas temperaturas do teste anterior.

Tabela 5. Dados relacionados aos testes de força vs. pCa. As variáveis apresentadas são: a constante de dissociação de equilíbrio (K_d), pCa_{50} e n_H.

Temperatura (°C)	**22.5**	**27.5**	**32.5**	**37.5**
K_d (μM)	0,94	0,88	0,82	0,76
pCa_{50}	5,99	6	6	6,01
n_H	3,36	3,35	3,35	3,32

DISCUSSÃO

Comparação dos *twitches* de contração gerados pelo modelo N15, pelo novo modelo e pelos dados experimentais.

Resultados do Teste 1, no qual foi realizada uma única simulação para cada uma das sete temperaturas, indicam que a conformação dos *twitches* de contração isométrica no novo modelo apresenta correspondência significativa com os dados experimentais. Conforme ilustrado na Figura 2, observa-se que a redução da temperatura resulta em um aumento de F_{dev}, em concordância com os achados de Janssen *et al.* [6].

Esse padrão de resposta da força surgiu exclusivamente devido à implementação da influência da temperatura sobre os miofilamentos no modelo N15. A relevância desse efeito fica evidente na comparação entre o novo modelo e o N15 nas Figuras 2 e 3, onde a temperatura afeta apenas os parâmetros do modelo elétrico de Morotti *et al.* [18].

No modelo de Rice *et al.* [15], o coeficiente Q_{10} foi definido como 6,25 para os parâmetros associados aos miofilamentos, exceto para um dos parâmetros relacionados ao relaxamento (g_{app}), que foi fixado em 2,5. A padronização dos valores de Q_{10} tem como objetivo manter a distribuição relativa dos estados aproximadamente constante com a variação da temperatura. Embora essa abordagem represente uma simplificação, ela reproduz de forma consistente as mudanças induzidas pela temperatura nos *twitches* de contração [15].

Nas simulações apresentadas, todos os parâmetros da cinética dos miofilamentos foram ajustados para um valor uniforme de 2,5, determinado empiricamente com base na calibração do modelo aos dados experimentais reportados por Janssen *et al.* [6]. Por outro lado, os valores de Q_{10} para k_{on} e k_{off}, conforme usados em Rice *et al.* [15], foram mantidos, permitindo a adequada representação do comportamento da sensibilidade ao Ca^{2+} dos miofilamentos observado experimentalmente [22].

Ao analisar os valores de F_{dev} nos dados experimentais (Tabela 4), observa-se um aumento progressivo até 30°C. A partir dessa temperatura, os valores diminuem gradualmente até 35°C, seguido por uma queda mais

acentuada em 37,5°C, onde F_{dev} cai de 41,81 mN/mm² para 21,57 mN/mm². Nos testes iniciais, nos quais o coeficiente Q_{10} foi aplicado aos parâmetros dos miofilamentos, o modelo reproduziu qualitativamente o comportamento observado nos dados experimentais, mas falhou em captar a queda abrupta da força de contração próxima à faixa fisiológica.

Para manter a abordagem de padronizar o valor de Q_{10} nos parâmetros da cinética dos miofilamentos, foi necessário ajustar o parâmetro A_p, que representa a constante elástica da força gerada pelas pontes cruzadas. Essa modificação funciona como uma simplificação para capturar a não linearidade observada nos testes de força exercida pelas pontes cruzadas em temperaturas próximas ao valor fisiológico [23].

O novo modelo proposto demonstra concordância geral com os dados experimentais de Janssen *et al.* [6] ao simular o relaxamento, exceto para os valores de RT_{50} a 35°C e 37,5°C. Essa divergência é evidente na Figura 2, onde os valores simulados de RT_{50} para essas temperaturas estão fora do desvio padrão dos dados experimentais.

Um aspecto digno de nota é o baixo desvio padrão observado em temperaturas mais altas nos dados experimentais de Janssen *et al.* [6]. Esse comportamento sugere uma menor variabilidade na duração dos *twitches* de força em temperaturas elevadas. Uma possível explicação para esse fenômeno é que, em temperaturas mais baixas, o $[Ca^{2+}]_i$ e a interação entre as proteínas actina, miosina e tropomiosina, que regulam o processo contrátil, apresentam maior complexidade, resultando em uma variabilidade mais pronunciada [24].

Em contraste, em temperaturas mais altas, essa variabilidade é reduzida devido à maior uniformidade do processo de desprendimento das pontes cruzadas, que se torna o fator predominante no relaxamento muscular independentemente da ativação pelo Ca^{2+} [25].

Simulação de População do Novo Modelo

Utilizando o novo modelo proposto, foi realizada uma simulação baseada na metodologia desenvolvida por Sobie *et al.* [19]. Esse tipo de simulação

permite a emulação computacional de um experimento convencional. Essa metodologia foi empregada por Morotti *et al.* [20] para analisar a sensibilidade de variáveis, como potencial de ação (PA) e $[Ca^{2+}]i$, a mudanças em parâmetros biofísicos utilizando um modelo adaptado para humanos, coelhos e camundongos.

Essa metodologia também é utilizada em simulações de tecido cardíaco, onde o acoplamento de modelos matemáticos de miócitos permite a representação das interações celulares e a propagação das ondas de excitação no miocárdio. Para representar as condições fisiológicas de forma mais realista, a variabilidade estocástica dos parâmetros é incorporada à modelagem. Essa variabilidade reflete a heterogeneidade celular presente no tecido cardíaco e possibilita avaliar a robustez dos padrões de propagação elétrica e a suscetibilidade do tecido a arritmias sob diferentes condições fisiopatológicas [26–28].

A metodologia empregada neste estudo teve como objetivo replicar as condições experimentais descritas por Janssen *et al.* [6]. Para isso, foi adotado o mesmo número de amostras experimentais (n = 10). Devido ao tamanho reduzido da amostra, foi escolhido um fator de variabilidade igualmente baixo (σ = 0,01) na distribuição logarítmica normalizada. Como resultado, os valores médios das simulações coincidiram estreitamente com aqueles obtidos na simulação convencional, enquanto a baixa variabilidade imposta gerou um desvio padrão também reduzido.

Relações Força-Cálcio e Força-pCa

A análise da relação entre o desenvolvimento da força contrátil e a concentração intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) permite avaliar a capacidade do modelo proposto em reproduzir o comportamento dos miofilamentos em resposta aos diferentes estímulos e mecanismos envolvidos na contração e relaxamento. Nas curvas força versus $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 6a), observou-se que, para as temperaturas mais baixas avaliadas (22,5°C e 27,5°C), as curvas apresentam comportamento qualitativamente semelhante. À medida que a temperatura aumentou para 32,5°C, houve um aumento no valor de saturação da força em

relação ao $[Ca^{2+}]_i$. Esse comportamento é comparável ao relatado por De Tombe *et al.* [17]; contudo, naquele estudo, a relação entre temperatura e saturação da força foi observada apenas sob condições abaixo de 30°C.

No novo modelo proposto, a força máxima gerada diminuiu quando a temperatura foi elevada para 37,5°C (Figura 6a), comportamento que ainda não foi descrito experimentalmente. Porém, é importante destacar que Harrison & Bers [22] investigaram a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} em miócitos ventriculares de coelho até a temperatura de 36°C e relataram um aumento da força máxima gerada pelo estímulo de Ca^{2+} à medida que a temperatura aumentava. Portanto, é possível que a diminuição da força máxima observada a 37,5°C no presente modelo seja devido a alguma limitação ou imprecisão na parametrização adotada.

A análise das curvas força versus pCa, utilizadas para avaliar a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}, revelou que os valores de pCa_{50} e os coeficientes de Hill (Tabela 4) apresentaram variações mínimas entre as diferentes condições de temperatura. Esse resultado indica que a relação entre temperatura e sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} no novo modelo proposto é reduzida, em acordo com os achados de Harrison & Bers [22], que, ao investigarem miócitos ventriculares de coelho, observaram alterações na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} apenas em temperaturas mais baixas (1°C e 8°C).

Além disso, Gillis *et al.* [29] analisaram a influência da temperatura na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} em músculo estriado bovino, reportando valores de pCa_{50} de 4,97 ± 0,04 (n = 8), 5,29 ± 0,04 (n = 10) e 5,42 ± 0,02 (n = 8) para temperaturas de 7°C, 21°C e 37°C, respectivamente. Esses resultados reforçam a hipótese de que a temperatura exerce influência limitada na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}, consistente com os achados do presente estudo.

Limitações

O novo modelo proposto tem como objetivo simular a dinâmica dos miofilamentos em diferentes temperaturas. Para isso, utiliza os dados experimentais de Janssen *et al.* [6] como referência para a calibração do modelo base, N15. Inicialmente, a calibração foi realizada para uma frequência de 0,5 Hz. Contudo, um dos objetivos deste estudo sobre os efeitos da temperatura na dinâmica dos miofilamentos é, eventualmente, simular condições mais próximas da contração *in vivo* em roedores. Para alcançar essa meta, será necessário calibrar o modelo para frequências próximas a 10 Hz. Resultados preliminares, não apresentados neste estudo, indicam que, para frequências acima de 5 Hz, o modelo apresenta valores diastólicos significativamente elevados em comparação com as condições de repouso observadas experimentalmente.

Outro fator limitante na análise é a disponibilidade de dados experimentais para a calibração do modelo. Experimentos em roedores sob temperaturas próximas às fisiológicas, como os de Janssen *et al.* [6], requerem técnicas de medição de força que preservem a integridade do tecido, especialmente em altas frequências. Contudo, devido à complexidade desses métodos, o número de estudos experimentais nessa área é limitado, o que restringe a quantidade de dados disponíveis para o desenvolvimento e aprimoramento de modelos computacionais.

Assim, estudos futuros devem continuar investigando a influência da temperatura na dinâmica dos miofilamentos. Portanto, o próximo objetivo é calibrar o modelo para representar a contração do miócito sob condições de temperatura fisiológica e altas frequências em roedores.

DECLARAÇÕES

Contribuição do Autores

Matheus Leonardo Alves de Camargo realizou os ajustes e os testes do modelo proposto e escreveu o manuscrito. Daisuke Sato contribuiu com a ideia central do estudo, orientou as etapas iniciais do desenvolvimento do modelo e participou da revisão da seção de modelagem matemática. Jose Wilson

Magalhães Bassani e Rosana Almada Bassani revisaram os aspectos fisiológicos do manuscrito. Robson Rodrigues da Silva auxiliou no desenvolvimento do novo modelo, contribuiu com ideias para os testes e para o código de simulação, além de realizar uma revisão geral do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram a versão final do manuscrito.

Declaração de Disponibilidade de Dados

Todos os scripts MATLAB e dados utilizados neste estudo estão armazenados no repositório OSF e podem ser acessados por meio do seguinte link: https://osf.io/fm5dr/.

Declaração de Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflitos financeiros ou pessoais com terceiros relacionados a este estudo.

REFERÊNCIAS

[1] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002;415(6868):198-205. doi:10.1038/415198a

[2] Stehle R, Solzin J, Iorga B, Poggesi C. Insights into the kinetics of Ca2+-regulated contraction and relaxation from myofibril studies. Pflugers Arch. 2009;458(2):337-357. doi:10.1007/s00424-008-0630-2

[3] Puglisi JL, Bassani RA, Bassani JW, Amin JN, Bers DM. Temperature and relative contributions of Ca transport systems in cardiac myocyte relaxation. Am J Physiol. 1996;270(5 Pt 2):H1772-H1778. doi:10.1152/ajpheart.1996.270.5.H1772

[4] Bassani RA, Bassani JW. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca2+ pump with thapsigargin to estimate the contribution of Na+-Ca2+ exchange to ventricular myocyte relaxation. Braz J Med Biol Res. 2003;36(12):1717-1723. doi:10.1590/s0100-879x2003001200014

[5] Stull LB, Leppo MK, Marbán E, Janssen PM. Physiological determinants of contractile force generation and calcium handling in mouse myocardium. J Mol Cell Cardiol. 2002;34(10):1367-1376. doi:10.1006/jmcc.2002.2065

[6] Janssen PM, Stull LB, Marbán E. Myofilament properties comprise the rate-limiting step for cardiac relaxation at body temperature in the rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;282(2):H499-H507. doi:10.1152/ajpheart.00595.2001

[7] Negroni JA, Morotti S, Lascano EC, *et al.* β-adrenergic effects on cardiac myofilaments and contraction in an integrated rabbit ventricular myocyte model. J Mol Cell Cardiol. 2015;81:162-175. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.02.014

[8] Soltis AR, Saucerman JJ. Synergy between CaMKII substrates and β-adrenergic signaling in regulation of cardiac myocyte Ca(2+) handling. Biophys J. 2010;99(7):2038-2047. doi:10.1016/j.bpj.2010.08.016

[9] Muangkram Y, Noma A, Amano A. A new myofilament contraction model with ATP consumption for ventricular cell model. J Physiol Sci. 2018;68(5):541-554. doi:10.1007/s12576-017-0560-x

[10] Surdo NC, Berrera M, Koschinski A, *et al.* FRET biosensor uncovers cAMP nano-domains at β-adrenergic targets that dictate precise tuning of cardiac contractility. Nat Commun. 2017;8:15031. Published 2017 Apr 20. doi:10.1038/ncomms15031

[11] Silva RR, Filho OBS, Bassani JWM, Bassani RA. The ForceLAB simulator: Application to the comparison of current models of cardiomyocyte contraction. Comput Biol Med. 2021;131:104240. doi:10.1016/j.compbiomed.2021.104240

[12] Negroni JA, Lascano EC. Simulation of steady state and transient cardiac muscle response experiments with a Huxley-based contraction model. J Mol Cell Cardiol. 2008;45(2):300-312. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.04.012

[13] Rice JJ, Winslow RL, Hunter WC. Comparison of putative cooperative mechanisms in cardiac muscle: length dependence and dynamic responses. Am J Physiol. 1999;276(5):H1734-H1754. doi:10.1152/ajpheart.1999.276.5.H1734

[14] Mullins PD, Bondarenko VE. A mathematical model of the mouse ventricular myocyte contraction. PLoS One. 2013;8(5):e63141. Published 2013 May 9. doi:10.1371/journal.pone.0063141

[15] Rice JJ, Wang F, Bers DM, de Tombe PP. Approximate model of cooperative activation and crossbridge cycling in cardiac muscle using ordinary differential equations. Biophys J. 2008;95(5):2368-2390. doi:10.1529/biophysj.107.119487

[16] Bennett AF. Thermal dependence of muscle function. Am J Physiol. 1984;247(2 Pt 2):R217-R229. doi:10.1152/ajpregu.1984.247.2.R217

[17] de Tombe PP, Stienen GJ. Impact of temperature on cross-bridge cycling kinetics in rat myocardium. J Physiol. 2007;584(Pt 2):591-600. doi:10.1113/jphysiol.2007.138693

[18] Morotti S, Edwards AG, McCulloch AD, Bers DM, Grandi E. A novel computational model of mouse myocyte electrophysiology to assess the synergy between Na+ loading and CaMKII. J Physiol. 2014;592(6):1181-1197. doi:10.1113/jphysiol.2013.266676

[19] Sobie EA. Parameter sensitivity analysis in electrophysiological models using multivariable regression. Biophys J. 2009;96(4):1264-1274. doi:10.1016/j.bpj.2008.10.056

[20] Morotti S, Liu C, Hegyi B, *et al.* Quantitative cross-species translators of cardiac myocyte electrophysiology: Model training, experimental validation, and applications. Sci Adv. 2021;7(47):eabg0927. doi:10.1126/sciadv.abg0927

[21] Walker JS, Li X, Buttrick PM. Analysing force-pCa curves. J Muscle Res Cell Motil. 2010;31(1):59-69. doi:10.1007/s10974-010-9208-7

[22] Harrison SM, Bers DM. Influence of temperature on the calcium sensitivity of the myofilaments of skinned ventricular muscle from the rabbit. *J Gen Physiol*. 1989;93(3):411-428. doi:10.1085/jgp.93.3.411

[23] Ranatunga KW. Endothermic force generation in fast and slow mammalian (rabbit) muscle fibers. Biophys J. 1996;71(4):1905-1913. doi:10.1016/S0006-3495(96)79389-X

[24] Kieu TT, Awinda PO, Tanner BCW. Omecamtiv Mecarbil Slows Myosin Kinetics in Skinned Rat Myocardium at Physiological Temperature. Biophys J. 2019;116(11):2149-2160. doi:10.1016/j.bpj.2019.04.020

[25] Fujita H, Kawai M. Temperature effect on isometric tension is mediated by regulatory proteins tropomyosin and troponin in bovine myocardium. *J Physiol*. 2002;539(Pt 1):267-276. doi:10.1113/jphysiol.2001.013220

[26] De Waard S, Hinnen H, Kucera JP. Stochastic and alternating pacing paradigms to assess the stability of cardiac conduction. J Mol Cell Cardiol. 2024;197:20-33. doi:10.1016/j.yjmcc.2024.10.007

[27] Xia X, Hu M, Zhou W, Jin Y, Yao X. Engineering cardiology with miniature hearts. Mater Today Bio. 2025;31:101505. Published 2025 Jan 21. doi:10.1016/j.mtbio.2025.101505

[28] Sato D, Bartos DC, Ginsburg KS, Bers DM. Depolarization of cardiac membrane potential synchronizes calcium sparks and waves in tissue. Biophys J. 2014;107(6):1313-1317. doi:10.1016/j.bpj.2014.07.053

[29] Gillis TE, Marshall CR, Xue XH, Borgford TJ, Tibbits GF. Ca(2+) binding to cardiac troponin C: effects of temperature and pH on mammalian and salmonid isoforms. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000;279(5):R1707-R1715. doi:10.1152/ajpregu.2000.279.5.R1707

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 DISCUSSÃO

Este estudo resultou no desenvolvimento de um novo modelo para a descrição da dinâmica dos miofilamentos, incorporando a modulação térmica da contração isométrica em miócitos ventriculares. A validação do modelo foi realizada com base nos dados experimentais reportados por Janssen *et al.* (2002). A proposta apresentada possibilita a simulação de *twitches* de contração do miócito ventricular de roedores em um intervalo de temperatura de 22,5°C a 37,5°C. O desenvolvimento deste modelo foi viabilizado pelas demais etapas do trabalho, que contribuíram para o aprofundamento do conhecimento sobre os modelos preexistentes, os quais serviram de base para a nova abordagem.

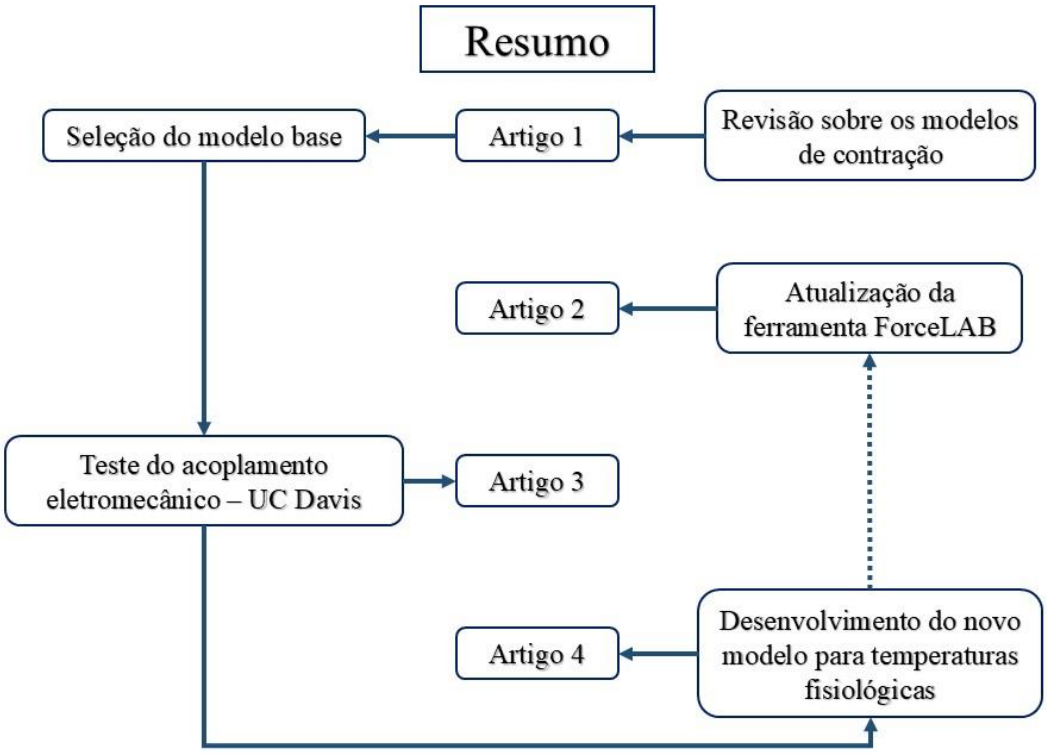
A primeira etapa da pesquisa consistiu em uma revisão crítica dos modelos existentes para a dinâmica dos miofilamentos e a contração de células musculares. Essa análise resultou na consolidação do Estado da Arte apresentado neste estudo, bem como no artigo da seção 6.1, que comparou os modelos de Rice *et al.* (1999, 2008) e Negroni *et al.* (1996, 2008, 2015). A partir das conclusões desse artigo, foram identificados os aspectos positivos e limitações de cada modelo, levando à escolha do modelo N15 como referência para a construção da nova formulação.

Adicionalmente, no trabalho de Silva *et al.* (2021), foi apresentada a ferramenta computacional ForceLAB, que oferece uma interface para simulações comparativas entre os modelos R99 e NL08 acoplados ao modelo de miócito ventricular de camundongo MB13. A seção 6.2 descreve as melhorias implementadas na ferramenta, incluindo a introdução de uma nova interface gráfica que facilita a visualização dos resultados. Inicialmente, o objetivo desta etapa era implementar os modelos analisados, bem como o novo modelo proposto; no entanto, o desenvolvimento deste último demandou mais tempo do que o previsto, o que acabou adiando essa tarefa.

A próxima etapa foi uma série de testes destinados a avaliar a resposta do modelo N15, acoplado ao modelo de Morotti *et al.* (2014), às variações na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}. Essa fase foi conduzida no âmbito do Programa de Doutorado-Sanduíche no Exterior (PDSE), em colaboração com o

Department of Pharmacology da UC Davis. Sob a supervisão do Dr. Daisuke Sato, foram realizadas simulações que buscavam reproduzir as condições *in vivo* da contração dos miócitos ventriculares de roedores. Entretanto, ao submeter o modelo N15 acoplado ao modelo de Morotti *et al.* (2014) a altas frequências, observou-se um aumento da força diastólica incompatível com os dados experimentais de Janssen *et al.* (2002). Observou-se que na faixa de 0 a 6 Hz a resposta do modelo apresentou dados de acordo com os observados na literatura (JANSSEN; STULL E MARBAN, 2002), contudo acima dessa faixa percebe-se um aumento exponencial no valor da força na diástole. Tal achado indicou a necessidade de ajustes no modelo para sua adaptação à temperatura fisiológica, motivando, assim, a formulação do novo modelo. Um resumo das etapas realizadas durante o desenvolvimento dessa pesquisa é apresentado na Figura 18.

Figura 18 – Resumo das etapas realizadas no trabalho. Setas contínuas indicam atividades executadas; setas tracejadas representam etapas planejadas, mas não realizadas.



Essa nova proposta de modelagem, apresentada neste trabalho, é especialmente relevante diante da crescente importância de estratégias de tradução entre espécies na modelagem cardíaca. A metodologia proposta por Morotti *et al.* (2021) permite a criação de tradutores entre modelos animais e humanos, possibilitando a extrapolação de respostas celulares com base em características comuns. No entanto, para que essa translação seja eficaz, é essencial que os modelos base consigam representar os dados experimentais em condições fisiológicas. Nesse sentido, o modelo aqui proposto representa um avanço importante ao oferecer uma base mais realista para a modelagem da contração em roedores, possibilitando o uso futuro de estratégias de tradução interespécies com maior robustez.

Um modelo específico para roedores que responda às variações de temperatura pode contribuir significativamente para o estudo de diversas cardiopatias. Algumas arritmias, como a Síndrome do QT Longo e a Síndrome de Brugada, têm origem genética; no entanto, eventos críticos à saúde do paciente costumam depender de gatilhos adicionais, como o aumento da temperatura corporal (NAKAJIMA *et al.*, 2015). Há também evidências de que a redução da temperatura corporal pode proteger o tecido cardíaco contra lesões isquêmicas, embora essa abordagem ainda apresente limitações, como o risco de fibrilação ventricular (YAMADA *et al.*, 2021). Assim, um modelo matemático capaz de reproduzir os efeitos da temperatura pode contribuir para maior agilidade e precisão na investigação desses fenômenos.

Além disso, o estudo da ação de antiarrítmicos também pode se beneficiar com a adição do novo modelo. Fármacos como milrinona e isoprenalina, por exemplo, apresentam risco aumentado de arritmias ventriculares durante episódios de hipotermia (SELLI *et al.*, 2023). Já em situações de hipertermia, bloqueadores dos canais de sódio podem ter sua eficácia reduzida (EL-BATTRAWY *et al.*, 2016). O modelo proposto contempla tanto a mecânica quanto a eletrofisiologia da célula cardíaca, por meio do acoplamento com o modelo de Morotti *et al.* (2014), ajustado para variações de temperatura. Com isso, torna-se possível uma análise mais completa da ação farmacológica sobre os diferentes mecanismos envolvidos na contração do miócito ventricular.

Por fim, a abordagem multiescala na simulação computacional da contração cardíaca já contempla, em alguns estudos, os efeitos da temperatura. O trabalho

de Belhamadia e Grenier (2019), por exemplo, apresenta uma simulação bidimensional da propagação do potencial de ação em tecido cardíaco sob diferentes temperaturas. De forma mais abrangente, Molinari *et al.* (2022) propõem um modelo tridimensional multiescala do coração capaz de detectar fibrilações induzidas por hipertermia. O novo modelo desenvolvido neste trabalho pode ampliar essas simulações ao incorporar explicitamente a influência dos miofilamentos sob variações térmicas. Essa integração pode ser viabilizada por meio de simplificações do modelo contrátil completo, seguindo a mesma lógica empregada para acoplar modelos elétricos entre diferentes escalas.

A escolha por roedores como foco do modelo se deve à ampla utilização desses animais em protocolos experimentais, especialmente em estudos que envolvem manipulação genética, farmacologia e modelagem de doenças cardíacas (JIA *et al.*, 2020). Contudo, a alta frequência cardíaca desses animais, associada à sensibilidade da contração, ao cálcio e à temperatura, representa um desafio adicional para os modelos computacionais. Reproduzir com fidelidade a fisiologia de camundongos e ratos é, portanto, fundamental para garantir a translação dos resultados experimentais para a compreensão do funcionamento cardíaco em humanos (GATTONI *et al.*, 2016).

7.2 CONCLUSÃO

Em síntese, a contribuição de cada etapa para o desenvolvimento do modelo proposto pode ser descrita da seguinte forma: o artigo da seção 6.1 proporcionou um aprofundamento na compreensão dos modelos da dinâmica dos miofilamentos e permitiu a escolha da estrutura de base mais adequada; a atualização da ferramenta ForceLAB consolidou uma plataforma essencial para futuras simulações e estudos relacionados aos modelos de contração muscular, embora essa etapa não esteja totalmente concluída; o artigo da seção 6.3, fruto da colaboração internacional, forneceu contribuições determinantes que direcionaram o refinamento do modelo, culminando na formulação final aqui apresentada. Dessa forma, o novo modelo apresentado na seção 6.4 demonstrou sua capacidade de reproduzir os dados de Janssen *et al.* (2002), capturando com precisão as variações nos *twitches* de contração em função da

temperatura, consolidando sua relevância para a modelagem da dinâmica dos miofilamentos.

7.3 IMPACTOS E TRABALHOS FUTUROS

A revisão comparativa dos modelos de Negroni *et al.* (1996, 2008, 2015) e Rice *et al.* (1999, 2008), apresentada na seção 6.1, estabelece uma base de conhecimento fundamental para pesquisadores que pretendam utilizar esses modelos. Esse estudo proporciona uma análise das diferenças entre as abordagens e das condições em que a aplicação de um modelo pode ser mais adequada em comparação ao outro.

A atualização da ferramenta computacional ForceLAB introduz uma nova interface e funcionalidades adicionais, permitindo a simulação e comparação dos modelos NL08 e R99. Essa melhoria visa, no futuro, estabelecer a plataforma como um repositório para outros modelos de dinâmica dos miofilamentos, além de servir como a principal ferramenta para a simulação do novo modelo proposto.

Os testes realizados para verificar o acoplamento bidirecional entre os modelos de Morotti *et al.* (2014) para miócito ventricular de camundongo e o N15 para dinâmica dos miofilamentos, apresentados na seção 6.3, resultaram de uma série de simulações conduzidos com esses modelos para a obtenção do novo modelo proposto. Os resultados obtidos têm como objetivo fornecer uma descrição detalhada do comportamento desse acoplamento, permitindo que futuros pesquisadores que utilizem essa modelagem compreendam as características do modelo ao representar a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}.

O novo modelo proposto demonstrou capacidade de reproduzir os dados experimentais de Janssen *et al.* (2002) relacionados às variações de temperatura, em uma frequência de estimulação de 0,5 Hz. Nesse contexto, é importante destacar a principal limitação dessa abordagem: a escassez de dados experimentais focados na obtenção de contrações isométricas em diferentes temperaturas. Essa limitação decorre de desafios técnicos que dificultam a realização de experimentos em temperaturas elevadas. Por esse motivo, o presente trabalho utilizou exclusivamente os dados de Janssen *et al.* (2002) para validação do modelo.

Como continuidade deste projeto, pretende-se ajustar o modelo para simular altas frequências de estimulação, compatíveis com condições fisiológicas em roedores, que variam entre 5 Hz e 12 Hz. Esse ajuste permitirá aplicar a metodologia de tradução entre espécies desenvolvida por Morotti *et al.* (2021), possibilitando avaliar seu potencial de extrapolação para modelos humanos. Além disso, este novo modelo será incorporado à próxima versão da ferramenta ForceLAB, com o objetivo de ampliar sua disseminação e oferecer à comunidade científica um recurso robusto para simulação da contração isométrica de miócitos ventriculares de roedores em condições fisiológicas.

REFERÊNCIAS

ABOELKASSEM, Y.; BONILLA, J. A.; MCCABE, K. J.; CAMPBELL, S. G. Contributions of Ca2+-Independent Thin Filament Activation to Cardiac Muscle Function. **Biophysical journal**, v. 109, n. 10, p. 2101–2112, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.028>. Acesso em: 11 jul. 2025.

ALDAY, A.; ALONSO, H.; GALLEGO, M.; URRUTIA, J.; LETAMENDIA, A.; CALLOL, C.; CASIS, O. Ionic Channels Underlying the Ventricular Action Potential in Zebrafish Embryo. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 84, p. 26–31, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2014.03.011>. Acesso em: 11 jul. 2025.

ALLEN, D. G.; KENTISH, J. C. The Cellular Basis of the Length-Tension Relation in Cardiac Muscle. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 17, n. 9, p. 821–840, 1985. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2828(85)80097-3>. Acesso em: 11 jul. 2025.

BARAN, D.; OGINO, K.; STENNETT, R.; SCHNELLBACHER, M.; ZWAS, D.; MORGAN, J. P.; BURKHOFF, D. Interrelating of Ventricular Pressure and Intracellular Calcium in Intact Hearts. **The American journal of physiology**, v. 273, n. 3 Pt 2, p. H1509-22, 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.3.H1509>. Acesso em: 11 jul. 2025.

BARCLAY, C. J.; CURTIN, N. A. The Legacy of A. V. Hill's Nobel Prize Winning Work on Muscle Energetics. **The journal of physiology**, v. 600, n. 7, p. 1555–1578, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/JP281556>. Acesso em: 11 jul. 2025.

BELHAMADIA, Y.; GRENIER, J. Modeling and Simulation of Hypothermia Effects on Cardiac Electrical Dynamics. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0216058, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0216058>. Acesso em: 11 jul. 2025.

BERS, D. M. Cardiac Excitation-Contraction Coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198–205, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/415198a>. Acesso em: 11 jul. 2025.

BERS, D. M.; DESPA, S. Cardiac Excitation–Contraction Coupling. *Em*: **Encyclopedia of Biological Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 379–383.

BLACKWELL, D. J.; SCHMECKPEPER, J.; KNOLLMANN, B. C. Animal Models to Study Cardiac Arrhythmias. **Circulation research**, v. 130, n. 12, p. 1926–1964,

2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.320258>. Acesso em: 11 jul. 2025.

BONDARENKO, V. E.; SZIGETI, G. P.; BETT, G. C. L.; KIM, S.-J.; RASMUSSON, R. L. Computer Model of Action Potential of Mouse Ventricular Myocytes. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 287, n. 3, p. H1378-403, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00185.2003>. Acesso em: 11 jul. 2025.

BURKHOFF, D. Explaining Load Dependence of Ventricular Contractile Properties with a Model of Excitation-Contraction Coupling. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 26, n. 8, p. 959–978, 1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jmcc.1994.1117>. Acesso em: 11 jul. 2025.

CAMPBELL, K. Rate Constant of Muscle Force Redevelopment Reflects Cooperative Activation as Well as Cross-Bridge Kinetics. **Biophysical journal**, v. 72, n. 1, p. 254–262, 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495(97)78664-8>. Acesso em: 11 jul. 2025.

CAMPBELL, K. B.; RAZUMOVA, M. V.; KIRKPATRICK, R. D.; SLINKER, B. K. Myofilament Kinetics in Isometric Twitch Dynamics. **Annals of biomedical engineering**, v. 29, n. 5, p. 384–405, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1114/1.1366669>. Acesso em: 11 jul. 2025.

CAMPBELL, K. S. Dynamic Coupling of Regulated Binding Sites and Cycling Myosin Heads in Striated Muscle. **The journal of general physiology**, v. 143, n. 3, p. 387–399, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.201311078>. Acesso em: 11 jul. 2025.

CAMPBELL, S. G.; LIONETTI, F. V.; CAMPBELL, K. S.; MCCULLOCH, A. D. Coupling of Adjacent Tropomyosins Enhances Cross-Bridge-Mediated Cooperative Activation in a Markov Model of the Cardiac Thin Filament. **Biophysical journal**, v. 98, n. 10, p. 2254–2264, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.010>. Acesso em: 11 jul. 2025.

CHUNG, C. S.; HOOPES, C. W.; CAMPBELL, K. S. Myocardial Relaxation Is Accelerated by Fast Stretch, Not Reduced Afterload. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 103, p. 65–73, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.01.004>. Acesso em: 11 jul. 2025.

CHUNG, J.-H.; BIESIADECKI, B. J.; ZIOLO, M. T.; DAVIS, J. P.; JANSSEN, P. M. L. Myofilament Calcium Sensitivity: Role in Regulation of in Vivo Cardiac Contraction

and Relaxation. **Frontiers in physiology**, v. 7, p. 562, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2016.00562>. Acesso em: 11 jul. 2025.

COSTANZO, Linda S. **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

COUTU, P.; METZGER, J. M. Genetic Manipulation of Calcium-Handling Proteins in Cardiac Myocytes. II. Mathematical Modeling Studies. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 288, n. 2, p. H613-31, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00425.2004>. Acesso em: 11 jul. 2025.

DE TOMBE, P. P.; LITTLE, W. C. Inotropic Effects of Ejection Are Myocardial Properties. **The American journal of physiology**, v. 266, n. 3 Pt 2, p. H1202-13, 1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.3.H1202>. Acesso em: 11 jul. 2025.

DOBRUNZ, L. E.; BACKX, P. H.; YUE, D. T. Steady-State [Ca2+]i-Force Relationship in Intact Twitching Cardiac Muscle: Direct Evidence for Modulation by Isoproterenol and EMD 53998. **Biophysical journal**, v. 69, n. 1, p. 189–201, 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(95)79889-7>. Acesso em: 11 jul. 2025.

EDWARDS, A. G.; LOUCH, W. E. Species-Dependent Mechanisms of Cardiac Arrhythmia: A Cellular Focus. **Clinical medicine insights. Cardiology**, v. 11, p. 1179546816686061, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/1179546816686061>. Acesso em: 11 jul. 2025.

EISENBERG, E.; HILL, T. L. A Cross-Bridge Model of Muscle Contraction. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 33, n. 1, p. 55–82, 1978. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/0079-6107(79)90025-7>. Acesso em: 11 jul. 2025.

EISNER, D. A.; CALDWELL, J. L.; KISTAMÁS, K.; TRAFFORD, A. W. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. **Circulation research**, v. 121, n. 2, p. 181–195, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310230>. Acesso em: 11 jul. 2025.

EL-BATTRAWY, I.; LANG, S.; ZHAO, Z.; AKIN, I.; YÜCEL, G.; MEISTER, S.; PATOCSKAI, B.; BEHNES, M.; RUDIC, B.; TÜLÜMEN, E.; LIEBE, V.; TIBURCY, M.; DWORACEK, J.; ZIMMERMANN, W.-H.; UTIKAL, J.; WIELAND, T.; BORGGREFE, M.; ZHOU, X.-B. Hyperthermia Influences the Effects of Sodium Channel Blocking Drugs in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0166143, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0166143>. Acesso em: 11 jul. 2025.

FOROUZANDEHMEHR, M.; KOIVUMÄKI, J. T.; HYTTINEN, J.; PACI, M. A Mathematical Model of hiPSC Cardiomyocytes Electromechanics. **Physiological reports**, v. 9, n. 22, p. e15124, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14814/phy2.15124>. Acesso em: 11 jul. 2025.

GARCIA-ELIAS, A.; BENITO, B. Ion Channel Disorders and Sudden Cardiac Death. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030692>. Acesso em: 11 jul. 2025.

GARG, P.; GARG, V.; SHRESTHA, R.; SANGUINETTI, M. C.; KAMP, T. J.; WU, J. C. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as Models for Cardiac Channelopathies: A Primer for Non-Electrophysiologists: A Primer for Non-Electrophysiologists. **Circulation research**, v. 123, n. 2, p. 224–243, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311209>. Acesso em: 11 jul. 2025.

GATTONI, S.; RØE, Å. T.; FRISK, M.; LOUCH, W. E.; NIEDERER, S. A.; SMITH, N. P. The Calcium-Frequency Response in the Rat Ventricular Myocyte: An Experimental and Modelling Study. **The journal of physiology**, v. 594, n. 15, p. 4193–4224, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/JP272011>. Acesso em: 11 jul. 2025.

GORDON, A. M.; HUXLEY, A. F.; JULIAN, F. J. The Variation in Isometric Tension with Sarcomere Length in Vertebrate Muscle Fibres. **The journal of physiology**, v. 184, n. 1, p. 170–192, 1966. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1966.sp007909>. Acesso em: 11 jul. 2025.

GRAY, B. F.; GONDA, I. The Sliding Filament Model of Muscle Contraction. I. Quantum Mechanical Formalism. **Journal of theoretical biology**, v. 69, n. 1, p. 167–185, 1977a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/0022-5193(77)90394-0>. Acesso em: 11 jul. 2025.

GRAY, B. F.; GONDA, I. The Sliding Filament Model of Muscle Contraction. II. The Energetic and Dynamical Predictions of a Quantum Mechanical Transducer Model. **Journal of theoretical biology**, v. 69, n. 1, p. 187–230, 1977b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/0022-5193(77)90395-2>. Acesso em: 11 jul. 2025.

GRAY, R. A.; PATHMANATHAN, P. Patient-Specific Cardiovascular Computational Modeling: Diversity of Personalization and Challenges. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 11, n. 2, p. 80–88, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12265-018-9792-2>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HARRY, J. D.; WARD, A. W.; HEGLUND, N. C.; MORGAN, D. L.; MCMAHON, T. A. Cross-Bridge Cycling Theories Cannot Explain High-Speed Lengthening Behavior in Frog Muscle. **Biophysical journal**, v. 57, n. 2, p. 201–208, 1990. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82523-6>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HIBBERD, M. G.; JEWELL, B. R. Calcium- and Length-Dependent Force Production in Rat Ventricular Muscle. **The journal of physiology**, v. 329, n. 1, p. 527–540, 1982. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014317>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HILL, A. V. The Energy Degraded in the Recovery Processes of Stimulated Muscles. **The journal of physiology**, v. 46, n. 1, p. 28–80, 1913. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1913.sp001578>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HILL, A. V. Methods of Analysing the Heat Production of Muscle. **Proceedings. Biological sciences**, v. 124, n. 835, p. 114–136, 1937. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1937.0077>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HILL, A. V. The Heat of Shortening and the Dynamic Constants of Muscle. **Proceedings. Biological sciences**, v. 126, n. 843, p. 136–195, 1938. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1938.0050>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HILL, T. L. Two Elementary Models for the Regulation of Skeletal Muscle Contraction by Calcium. **Biophysical journal**, v. 44, n. 3, p. 383–396, 1983. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495(83)84312-4>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HONDA, H.; KOIWA, Y.; SHIRATO, K. Theoretical Treatment of Striated Muscle: Dynamic Extension of Four-State Model. **Heart and vessels**, v. 11, n. 1, p. 44–53, 1996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/bf01744599>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HONDA, H.; NAYA, T.; KOIWA, Y. Cardiac Twitch Properties Simulated by Three-States Model. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 193, n. 4, p. 259–277, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.193.259>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HUNTER, P. J.; MCCULLOCH, A. D.; TER KEURS, H. E. Modelling the Mechanical Properties of Cardiac Muscle. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 69, n. 2–3, p. 289–331, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6107(98)00013-3>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HUXLEY, A. F. Muscle Structure and Theories of Contraction. **Progress in biophysics and biophysical chemistry**, v. 7, p. 255–318, 1957. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/s0096-4174(18)30128-8>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HUXLEY, A. F. Muscular Contraction. **The journal of physiology**, v. 243, n. 1, p. 1–43, 1974. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1974.sp010740>. Acesso em: 11 jul. 2025.

HUXLEY, A. F.; SIMMONS, R. M. Proposed Mechanism of Force Generation in Striated Muscle. **Nature**, v. 233, n. 5321, p. 533–538, 1971. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/233533a0>. Acesso em: 11 jul. 2025.

IZAKOV VYA; KATSNELSON, L. B.; BLYAKHMAN, F. A.; MARKHASIN, V. S.; SHKLYAR, T. F. Cooperative Effects Due to Calcium Binding by Troponin and Their Consequences for Contraction and Relaxation of Cardiac Muscle under Various Conditions of Mechanical Loading. **Circulation research**, v. 69, n. 5, p. 1171–1184, 1991. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.69.5.1171>. Acesso em: 11 jul. 2025.

JANSSEN, P. M.; HUNTER, W. C. Force, Not Sarcomere Length, Correlates with Prolongation of Isosarcometric Contraction. **The American journal of physiology**, v. 269, n. 2 Pt 2, p. H676-85, 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.2.H676>. Acesso em: 11 jul. 2025.

JANSSEN, P. M. L.; STULL, L. B.; MARBÁN, E. Myofilament Properties Comprise the Rate-Limiting Step for Cardiac Relaxation at Body Temperature in the Rat. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 282, n. 2, p. H499-507, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00595.2001>. Acesso em: 11 jul. 2025.

JIA, T.; WANG, C.; HAN, Z.; WANG, X.; DING, M.; WANG, Q. Experimental Rodent Models of Cardiovascular Diseases. **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 7, p. 588075, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2020.588075>. Acesso em: 11 jul. 2025.

JOUKAR, S. A Comparative Review on Heart Ion Channels, Action Potentials and Electrocardiogram in Rodents and Human: Extrapolation of Experimental Insights to Clinic. **Laboratory animal research**, v. 37, n. 1, p. 25, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s42826-021-00102-3>. Acesso em: 11 jul. 2025.

JULIAN, F. J. Activation in a Skeletal Muscle Contraction Model with a Modification for Insect Fibrillar Muscle. **Biophysical journal**, v. 9, n. 4, p. 547–570, 1969.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495(69)86403-9>. Acesso em: 11 jul. 2025.

JULIAN, F. J.; SOLLINS, K. R.; SOLLINS, M. R. A Model for the Transient and Steady-State Mechanical Behavior of Contracting Muscle. **Biophysical journal**, v. 14, n. 7, p. 546–562, 1974. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495(74)85934-5>. Acesso em: 11 jul. 2025.

KAESE, S.; VERHEULE, S. Cardiac Electrophysiology in Mice: A Matter of Size. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 345, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2012.00345>. Acesso em: 11 jul. 2025.

KATSNELSON, L. B.; IZAKOV VYA; MARKHASIN, V. S. Heart Muscle: Mathematical Modelling of the Mechanical Activity and Modelling of Mechanochemical Uncoupling. **General physiology and biophysics**, v. 9, n. 3, p. 219–243, 1990.

KAWAI, M.; SAEKI, Y.; ZHAO, Y. Crossbridge Scheme and the Kinetic Constants of Elementary Steps Deduced from Chemically Skinned Papillary and Trabecular Muscles of the Ferret. **Circulation research**, v. 73, n. 1, p. 35–50, 1993. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.73.1.35>. Acesso em: 11 jul. 2025.

KING, E. L.; ALTMAN, C. A Schematic Method of Deriving the Rate Laws for Enzyme-Catalyzed Reactions. **The journal of physical chemistry**, v. 60, n. 10, p. 1375–1378, 1956. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/j150544a010>. Acesso em: 11 jul. 2025.

KONHILAS, J. P.; IRVING, T. C.; DE TOMBE, P. P. Frank-Starling Law of the Heart and the Cellular Mechanisms of Length-Dependent Activation. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 445, n. 3, p. 305–310, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-002-0902-1>. Acesso em: 11 jul. 2025.

LANDESBERG, A.; SIDEMAN, S. Coupling Calcium Binding to Troponin C and Cross-Bridge Cycling in Skinned Cardiac Cells. **The American journal of physiology**, v. 266, n. 3 Pt 2, p. H1260-71, 1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.3.H1260>. Acesso em: 11 jul. 2025.

LANDESBERG, A.; SIDEMAN, S. Regulation of Energy Consumption in Cardiac Muscle: Analysis of Isometric Contractions. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 276, n. 3, p. H998–H1011, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1999.276.3.H998>. Acesso em: 11 jul. 2025.

LASCANO, E. C.; SAID, M.; VITTONE, L.; MATTIAZZI, A.; MUNDIÑA-WEILENMANN, C.; NEGRONI, J. A. Role of CaMKII in Post Acidosis Arrhythmias: A Simulation Study Using a Human Myocyte Model. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 60, p. 172–183, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.04.018>. Acesso em: 11 jul. 2025.

LONGOBARDI, S.; SHER, A.; NIEDERER, S. A. Quantitative Mapping of Force-pCa Curves to Whole-Heart Contraction and Relaxation. **The journal of physiology**, v. 600, n. 15, p. 3497–3516, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/JP283352>. Acesso em: 11 jul. 2025.

LOOKIN, O.; BALAKIN, A.; PROTSENKO, Y. Differences in Effects of Length-Dependent Regulation of Force and Ca2+ Transient in the Myocardial Trabeculae of the Rat Right Atrium and Ventricle. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 10, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24108960>. Acesso em: 11 jul. 2025.

LYMN, R. W.; TAYLOR, E. W. Mechanism of Adenosine Triphosphate Hydrolysis by Actomyosin. **Biochemistry**, v. 10, n. 25, p. 4617–4624, 1971. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/bi00801a004>. Acesso em: 11 jul. 2025.

MCCABE, K. J.; ABOELKASSEM, Y.; TEITGEN, A. E.; HUBER, G. A.; MCCAMMON, J. A.; REGNIER, M.; MCCULLOCH, A. D. Predicting the Effects of dATP on Cardiac Contraction Using Multiscale Modeling of the Sarcomere. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 695, n. 108582, p. 108582, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2020.108582>. Acesso em: 11 jul. 2025.

MIJAILOVICH, S. M.; FREDBERG, J. J.; BUTLER, J. P. On the Theory of Muscle Contraction: Filament Extensibility and the Development of Isometric Force and Stiffness. **Biophysical journal**, v. 71, n. 3, p. 1475–1484, 1996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495(96)79348-7>. Acesso em: 11 jul. 2025.

MOLINARI, L.; ZALTIERI, M.; MASSARONI, C.; FILIPPI, S.; GIZZI, A.; SCHENA, E. Multiscale and Multiphysics Modeling of Anisotropic Cardiac RFCA: Experimental-Based Model Calibration via Multi-Point Temperature Measurements. **Frontiers in physiology**, v. 13, p. 845896, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.845896>. Acesso em: 11 jul. 2025.

MOROTTI, S.; EDWARDS, A. G.; MCCULLOCH, A. D.; BERS, D. M.; GRANDI, E. A Novel Computational Model of Mouse Myocyte Electrophysiology to Assess the Synergy between Na+ Loading and CaMKII: CaMKII-Na+-Ca2+-CaMKII Feedback in Cardiac Myocytes. **The journal of physiology**, v. 592, n. 6, p. 1181–1197, 2014.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2013.266676>. Acesso em: 11 jul. 2025.

MOROTTI, S.; LIU, C.; HEGYI, B.; NI, H.; FOGLI ISEPPE, A.; WANG, L.; PRITONI, M.; RIPPLINGER, C. M.; BERS, D. M.; EDWARDS, A. G.; GRANDI, E. Quantitative Cross-Species Translators of Cardiac Myocyte Electrophysiology: Model Training, Experimental Validation, and Applications. **Science advances**, v. 7, n. 47, p. eabg0927, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abg0927>. Acesso em: 11 jul. 2025.

MUANGKRAM, Y.; NOMA, A.; AMANO, A. A New Myofilament Contraction Model with ATP Consumption for Ventricular Cell Model. **The journal of physiological sciences: JPS**, v. 68, n. 5, p. 541–554, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12576-017-0560-x>. Acesso em: 11 jul. 2025.

MULLINS, P. D.; BONDARENKO, V. E. A Mathematical Model of the Mouse Ventricular Myocyte Contraction. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63141, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063141>. Acesso em: 11 jul. 2025.

MULLINS, P. D.; BONDARENKO, V. E. Mathematical Model for B1-Adrenergic Regulation of the Mouse Ventricular Myocyte Contraction. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 318, n. 2, p. H264–H282, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00492.2019>. Acesso em: 11 jul. 2025.

NAKAJIMA, T.; KANEKO, Y.; KURABAYASHI, M. Unveiling Specific Triggers and Precipitating Factors for Fatal Cardiac Events in Inherited Arrhythmia Syndromes. **Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 79, n. 6, p. 1185–1192, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-15-0322>. Acesso em: 11 jul. 2025.

NEGRONI, J. A.; LASCANO, E. C. A Cardiac Muscle Model Relating Sarcomere Dynamics to Calcium Kinetics. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 28, n. 5, p. 915–929, 1996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jmcc.1996.0086>. Acesso em: 11 jul. 2025.

NEGRONI, J. A.; LASCANO, E. C. Simulation of Steady State and Transient Cardiac Muscle Response Experiments with a Huxley-Based Contraction Model. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 45, n. 2, p. 300–312, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.04.012>. Acesso em: 11 jul. 2025.

NEGRONI, J. A.; MOROTTI, S.; LASCANO, E. C.; GOMES, A. V.; GRANDI, E.; PUGLISI, J. L.; BERS, D. M. B-Adrenergic Effects on Cardiac Myofilaments and

Contraction in an Integrated Rabbit Ventricular Myocyte Model. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 81, p. 162–175, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.014>. Acesso em: 11 jul. 2025.

NERBONNE, J. M. Studying Cardiac Arrhythmias in the Mouse--a Reasonable Model for Probing Mechanisms? **Trends in cardiovascular medicine**, v. 14, n. 3, p. 83–93, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2003.12.006>. Acesso em: 11 jul. 2025.

NIEDERER, S. A.; CAMPBELL, K. S.; CAMPBELL, S. G. A Short History of the Development of Mathematical Models of Cardiac Mechanics. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 127, p. 11–19, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.11.015>. Acesso em: 11 jul. 2025.

NIEDERER, S. A.; LUMENS, J.; TRAYANOVA, N. A. Computational Models in Cardiology. **Nature reviews. Cardiology**, v. 16, n. 2, p. 100–111, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-018-0104-y>. Acesso em: 11 jul. 2025.

NOBLE, D.; VARGHESE, A.; KOHL, P.; NOBLE, P. Improved Guinea-Pig Ventricular Cell Model Incorporating a Diadic Space, IKr and IKs, and Length- and Tension-Dependent Processes. **The Canadian journal of cardiology**, v. 14, n. 1, p. 123–134, 1998.

ODENING, K. E.; GOMEZ, A.-M.; DOBREV, D.; FABRITZ, L.; HEINZEL, F. R.; MANGONI, M. E.; MOLINA, C. E.; SACCONI, L.; SMITH, G.; STENGL, M.; THOMAS, D.; ZAZA, A.; REMME, C. A.; HEIJMAN, J. ESC Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology Position Paper: Relevance, Opportunities, and Limitations of Experimental Models for Cardiac Electrophysiology Research. **Europace: European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology: journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology**, v. 23, n. 11, p. 1795–1814, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/europace/euab142>. Acesso em: 11 jul. 2025.

PANERAI, R. B. A Model of Cardiac Muscle Mechanics and Energetics. **Journal of biomechanics**, v. 13, n. 11, p. 929–940, 1980. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/0021-9290(80)90163-3>. Acesso em: 11 jul. 2025.

PETERSON, J. N.; HUNTER, W. C.; BERMAN, M. R. Estimated Time Course of Ca2+ Bound to Troponin C during Relaxation in Isolated Cardiac Muscle. **The American journal of physiology**, v. 260, n. 3 Pt 2, p. H1013-24, 1991. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1991.260.3.H1013>. Acesso em: 11 jul. 2025.

PIRONET, A.; DESAIVE, T.; KOSTA, S.; LUCAS, A.; PAEME, S.; COLLET, A.; PRETTY, C. G.; KOLH, P.; DAUBY, P. C. A Multi-Scale Cardiovascular System Model Can Account for the Load-Dependence of the End-Systolic Pressure-Volume Relationship. **Biomedical engineering online**, v. 12, n. 1, p. 8, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1475-925X-12-8>. Acesso em: 11 jul. 2025.

PUGLISI, J. L.; WANG, F.; BERS, D. M. Modeling the Isolated Cardiac Myocyte. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 85, n. 2–3, p. 163–178, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.12.003>. Acesso em: 11 jul. 2025.

PURVES, K. et al. **Vida**: a ciência da Biologia. 8° ed. [S.l.]: Artmed, 2009.

RASSIER, D. E. Sarcomere Mechanics in Striated Muscles: From Molecules to Sarcomeres to Cells. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 313, n. 2, p. C134–C145, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00050.2017>. Acesso em: 11 jul. 2025.

RASSIER, D. E.; MACINTOSH, B. R.; HERZOG, W. Length Dependence of Active Force Production in Skeletal Muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 86, n. 5, p. 1445–1457, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/jappl.1999.86.5.1445>. Acesso em: 11 jul. 2025.

RAZUMOVA, M. V.; BUKATINA, A. E.; CAMPBELL, K. B. Stiffness-Distortion Sarcomere Model for Muscle Simulation. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 87, n. 5, p. 1861–1876, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/jappl.1999.87.5.1861>. Acesso em: 11 jul. 2025.

RAZUMOVA, M. V.; BUKATINA, A. E.; CAMPBELL, K. B. Different Myofilament Nearest-Neighbor Interactions Have Distinctive Effects on Contractile Behavior. **Biophysical journal**, v. 78, n. 6, p. 3120–3137, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/s0006-3495(00)76849-4>. Acesso em: 11 jul. 2025.

RHODES, S. S.; CAMARA, A. K. S.; ALDAKKAK, M.; HEISNER, J. S.; STOWE, D. F. Stretch-Induced Increase in Cardiac Contractility Is Independent of Myocyte Ca2+ While Block of Stretch Channels by Streptomycin Improves Contractility after Ischemic Stunning. **Physiological reports**, v. 3, n. 8, p. e12486, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14814/phy2.12486>. Acesso em: 11 jul. 2025.

RHODES, S. S.; ROPELLA, K. M.; AUDI, S. H.; CAMARA, A. K. S.; KEVIN, L. G.; PAGEL, P. S.; STOWE, D. F. Cross-Bridge Kinetics Modeled from Myoplasmic [Ca2+] and LV Pressure at 17 Degrees C and after 37 Degrees C and 17 Degrees C Ischemia. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**,

v. 284, n. 4, p. H1217-29, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00816.2002>. Acesso em: 11 jul. 2025.

RICE, J. J.; DE TOMBE, P. P. Approaches to Modeling Crossbridges and Calcium-Dependent Activation in Cardiac Muscle. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 85, n. 2–3, p. 179–195, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.011>. Acesso em: 11 jul. 2025.

RICE, J. J.; STOLOVITZKY, G.; TU, Y.; DE TOMBE, P. P. Ising Model of Cardiac Thin Filament Activation with Nearest-Neighbor Cooperative Interactions. **Biophysical journal**, v. 84, n. 2 Pt 1, p. 897–909, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74907-8>. Acesso em: 11 jul. 2025.

RICE, J. J.; WANG, F.; BERS, D. M.; DE TOMBE, P. P. Approximate Model of Cooperative Activation and Crossbridge Cycling in Cardiac Muscle Using Ordinary Differential Equations. **Biophysical journal**, v. 95, n. 5, p. 2368–2390, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.119487>. Acesso em: 11 jul. 2025.

ROBINSON, J. M.; WANG, Y.; KERRICK, W. G. L.; KAWAI, R.; CHEUNG, H. C. Activation of Striated Muscle: Nearest-Neighbor Regulatory-Unit and Cross-Bridge Influence on Myofilament Kinetics. **Journal of molecular biology**, v. 322, n. 5, p. 1065–1088, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00855-0>. Acesso em: 11 jul. 2025.

SCHWARTZ, P. J.; ACKERMAN, M. J.; ANTZELEVITCH, C.; BEZZINA, C. R.; BORGGREFE, M.; CUNEO, B. F.; WILDE, A. A. M. Inherited Cardiac Arrhythmias. **Nature reviews. Disease primers**, v. 6, n. 1, p. 58, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-020-0188-7>. Acesso em: 11 jul. 2025.

SELLI, A. L.; GHASEMI, M.; WATTERS, T.; BURTON, F.; SMITH, G.; DIETRICHS, E. S. Proarrhythmic Changes in Human Cardiomyocytes during Hypothermia by Milrinone and Isoprenaline, but Not Levosimendan: An Experimental in Vitro Study. **Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine**, v. 31, n. 1, p. 61, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13049-023-01134-5>. Acesso em: 11 jul. 2025.

SHIELS, H. A.; WHITE, E. The Frank-Starling Mechanism in Vertebrate Cardiac Myocytes. **The journal of experimental biology**, v. 211, n. Pt 13, p. 2005–2013, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.003145>. Acesso em: 11 jul. 2025.

SHIM, E. B.; AMANO, A.; TAKAHATA, T.; SHIMAYOSHI, T.; NOMA, A. The Cross-Bridge Dynamics during Ventricular Contraction Predicted by Coupling the Cardiac Cell Model with a Circulation Model. **The journal of physiological sciences: JPS**, v. 57, n. 5, p. 275–285, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2170/physiolsci.RP006007>. Acesso em: 11 jul. 2025.

SHIMIZU, J.; TODAKA, K.; BURKHOFF, D. Load Dependence of Ventricular Performance Explained by Model of Calcium-Myofilament Interactions. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 282, n. 3, p. H1081-91, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00498.2001>. Acesso em: 11 jul. 2025.

SILVA, R. R.; BAPTISTA DE SOUZA FILHO, O.; BASSANI, J. W. M.; BASSANI, R. A. The ForceLAB Simulator: Application to the Comparison of Current Models of Cardiomyocyte Contraction. **Computers in biology and medicine**, v. 131, n. 104240, p. 104240, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104240>. Acesso em: 11 jul. 2025.

STERN, M. D.; LAKATTA, E. G. Excitation-Contraction Coupling in the Heart: The State of the Question. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, n. 12, p. 3092–3100, 1992. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.6.12.1325933>. Acesso em: 11 jul. 2025.

SYS, S. U.; BRUTSAERT, D. L. Determinants of Force Decline during Relaxation in Isolated Cardiac Muscle. **The American journal of physiology**, v. 257, n. 5 Pt 2, p. H1490-7, 1989. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1989.257.5.H1490>. Acesso em: 11 jul. 2025.

TAYLOR, T. W.; SUGA, H. Variable Crossbridge Cycling-ATP Coupling Accounts for Cardiac Mechanoenergetics. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 332, p. 775–82; discussion 782-3, 1993. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-2872-2_68>. Acesso em: 11 jul. 2025.

URTHALER, F.; WALKER, A. A.; REEVES, R. C.; HEFNER, L. L. Estimates of Beat to Beat Handling of Activator Calcium Using Measurements of [Ca2+]i in Aequorin Loaded Ferret Cardiac Muscle. **Cardiovascular research**, v. 28, n. 1, p. 40–46, 1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/28.1.40>. Acesso em: 11 jul. 2025.

WALKER, J. S.; LI, X.; BUTTRICK, P. M. Analysing Force-pCa Curves. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 31, n. 1, p. 59–69, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-010-9208-7>. Acesso em: 11 jul. 2025.

WANG, Y. P.; FUCHS, F. Length, Force, and Ca(2+)-Troponin C Affinity in Cardiac and Slow Skeletal Muscle. **The American journal of physiology**, v. 266, n. 4 Pt 1, p. C1077-82, 1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.4.C1077>. Acesso em: 11 jul. 2025.

WANNENBURG, T.; JANSSEN, P. M. L.; FAN, D.; DE TOMBE, P. P. The Frank-Starling Mechanism Is Not Mediated by Changes in Rate of Cross-Bridge Detachment. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 273, n. 5, p. H2428–H2435, 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.5.H2428>. Acesso em: 11 jul. 2025.

WASHIO, T.; OKADA, J.-I.; SUGIURA, S.; HISADA, T. Approximation for Cooperative Interactions of a Spatially-Detailed Cardiac Sarcomere Model. **Cellular and molecular bioengineering**, v. 5, n. 1, p. 113–126, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12195-011-0219-2>. Acesso em: 11 jul. 2025.

WILLIAMS, G.; MIRAMS, G. R. A Web Portal for In-Silico Action Potential Predictions. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 75, p. 10–16, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2015.05.002>. Acesso em: 11 jul. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2017. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)>. Acesso em: 11 jul. 2025.

YAMADA, K. P.; KARIYA, T.; AIKAWA, T.; ISHIKAWA, K. Effects of Therapeutic Hypothermia on Normal and Ischemic Heart. **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 8, p. 642843, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2021.642843>. Acesso em: 11 jul. 2025.

YUAN, C.-C.; KAZMIERCZAK, K.; LIANG, J.; MA, W.; IRVING, T. C.; SZCZESNA-CORDARY, D. Molecular Basis of Force-pCa Relation in MYL2 Cardiomyopathy Mice: Role of the Super-Relaxed State of Myosin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 8, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2110328119>. Acesso em: 11 jul. 2025.

YUE, D. T. Intracellular [Ca2+] Related to Rate of Force Development in Twitch Contraction of Heart. **The American journal of physiology**, v. 252, n. 4 Pt 2, p. H760-70, 1987. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1987.252.4.H760>. Acesso em: 11 jul. 2025.

ZAHALAK, G. I. A Distribution-Moment Approximation for Kinetic Theories of Muscular Contraction. **Mathematical biosciences**, v. 55, n. 1–2, p. 89–114, 1981. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/0025-5564(81)90014-6>. Acesso em: 11 jul. 2025.

ZAHALAK, G. I.; MA, S. P. Muscle Activation and Contraction: Constitutive Relations Based Directly on Cross-Bridge Kinetics. **Journal of biomechanical engineering**, v. 112, n. 1, p. 52–62, 1990. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1115/1.2891126>. Acesso em: 11 jul. 2025.

ZOU, G.; PHILLIPS, G. N., Jr. A Cellular Automaton Model for the Regulatory Behavior of Muscle Thin Filaments. **Biophysical journal**, v. 67, n. 1, p. 11–28, 1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80475-8>. Acesso em: 11 jul. 2025.

ANEXO A: CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO DO CLAIB & CBEB 2022

Certificate



IX Latin American Congress on Biomedical Engineering
XXVIII Brazilian Congress on Biomedical Engineering

Matheus Leonardo A. Camargo

presented the article **ForceLAB Simulator Update: a Study on the Positive Cooperativity of Cross-Bridge Formation in Ventricular Myocyte,** authored by Matheus Leonardo A. Camargo, José Wilson M. Bassani, Rosana A. Bassani and Robson Rodrigues Silva

in the *"IX Latin American Congress on Biomedical Engineering"* and *"XXVIII Brazilian Congress on Biomedical Engineering"*, October 24th to 28th, 2022, Florianópolis, Santa Catarina - Brazil.

Dr. Helio Schechtman
President
Brazilian Society of Biomedical Engineering
SBEB

Dr. Elliot Vernet
President
Latin American Regional Council on Biomedical Engineering
CORAL

Dr. Renato Garcia Ojeda
Congress President
Institute of Biomedical Engineering
IEB-UFSC

Consejo Regional de Ingeniería Biomédica para América Latina

SBEB

IEB UFSC

IFMBE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

ANEXO B: REGISTRO DO SOFTWARE FORCELAB

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS

Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512023001669-1**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1° de janeiro subsequente à data de 06/10/2022, em conformidade com o §2°, art. 2° da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

Título: ForceLAB 2.0

Data de publicação: 06/10/2022

Titular(es): MATHEUS LEONARDO ALVES DE CAMARGO

Autor(es): JOSÉ WILSON MAGALHÃES BASSANI; ROSANA ALMADA BASSANI; ROBSON RODRIGUES DA SILVA; MATHEUS LEONARDO ALVES DE CAMARGO; OSIAS BAPTISTA DE SOUZA FILHO

Linguagem: MATLAB

Campo de aplicação: SD-09

Tipo de programa: SM-01

Algoritmo hash: SHA-512

Resumo digital hash:
b37e2eba36bef5cb9156aee95058137cee33452e7eb34ce6db50feecc8650b121742a277d49e2ddeedcfdae1a59f367c81eaa08b3ebdedda0cd8a980828dfbf2

Expedido em: 20/06/2023

Aprovado por:
Carlos Alexandre Fernandes Silva
Chefe da DIPTO

ANEXO C: CARTA CONVITE DO PROF. DR. DONALD BERS

UC DAVIS
UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Donald M. Bers, Ph.D.
Distinguished Professor & Joseph Silva
Endowed Chair for Cardiovascular Research
Phone: 530-752-6517
Fax: 530-752-7710
dmbers@ucdavis.edu

Chair, Department of Pharmacology
UC Davis School of Medicine
Genome Building Rm 3513
451 E. Health Sciences Dr.
Davis, CA 95616-8636
Pharmacology Home Page

March 30th, 2023

TO: Matheus Leonardo Alves de Camargo
RE: Research Visit to Dr. Daisuke Sato Laboratory

Dear Matheus,

We are pleased to invite you to further your research skills and knowledge in Dr. Sato's laboratory here at the University of California, Davis, Department of Pharmacology. Dr. Daisuke Sato will be your research mentor during your self-funded, non UCD title visit from November 1st, 2023 to April 31st, 2024.

You will work directly with Dr. Sato and other members of his laboratory, such as postdoctoral scholars, junior specialists, and students. Research in the Sato Lab focuses on Mathematical modeling of action potential and calcium cycling. His lab uses various techniques for the high-performance computing to understand how molecular level properties are linked to organ level phenomena in the heart. You will learn how to investigate heart disease mechanisms using mathematical models, especially in the areas of cardiac electrophysiology, excitation-coupling coupling, and mechanical feedbacks in heart cells and tissue. Then, once you can perform computer simulations independently, you will spend the duration of your visit performing simulations to develop a new electromechanical model for mouse ventricular myocyte. During your stay, you will have regular meetings with Dr. Sato, and other Sato lab members to assess your progress.

We hope you enjoy your stay and can use your experience at UC Davis toward completing your thesis.

Sincerely,

Donald M. Bers, Ph.D.
Distinguished Professor and
Joseph Silva Endowed Chair

ANEXO D: CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO DO CBEB 2024



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE

O trabalho intitulado STUDY ON THE EFFECT OF CHANGING MYOFILAMENT SENSITIVITY TO CA2+ DURING TWITCHES EVOKED USING THE MOROTTI MODEL OF CARDIOMYOCYTE ELECTROPHYSIOLOGY de autoria de MATHEUS CAMARGO, GUILHERME SILVA, JOSE BASSANI, ROSANA BASSANI, DAISUKE SATO, ROBSON SILVA, foi apresentado na Sessão de COMUNICAÇÃO ORAL durante o XXIX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, realizado pela SBEB - Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica, no período de 2 a 6 de setembro de 2024.

Ribeirão Preto, 6 de setembro de 2024

Dr Antonio Adilton Oliveira Carneiro
Presidente do Congresso Brasileiro
de Engenharia Biomédica

SBEB

ANEXO E: MENÇÃO HONROSA DO CBEB 2024



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE

o trabalho intitulado
"Study on the effect of changing myofilament sensitivity to Ca2+ during twitches evoked using the Morotti model of cardiomyocyte electrophysiology"

MATHEUS CAMARGO, GUILHERME SILVA, JOSE BASSANI, ROSANA BASSANI, DAISUKE SATO, ROBSON SILVA

recebeu a Menção Honrosa do **Prêmio SBEB Sérgio Santos Mühlen** durante o **XXIX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, realizado pela SBEB - Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica, no período de 2 a 6 de setembro de 2024.

Ribeirão Preto, 6 de setembro de 2024

Dr Antonio Adilton Oliveira Carneiro
Presidente do Congresso Brasileiro
de Engenharia Biomédica

SBEB

APÊNDICE A: ARTIGO DE REVISÃO E COMPARAÇÃO DOS MODELOS DE RICE E NEGRONI

ANALYSIS AND COMPARISON OF FIVE MATHEMATICAL MODELS THAT DESCRIBE MYOFILAMENT DYNAMICS DURING CONTRACTION OF VENTRICULAR MYOCYTES

Matheus Leonardo Alves de Camargo[1*], Daisuke Sato[2], José Wilson Magalhães Bassani[3], Rosana Almada Bassani[3], Robson Rodrigues da Silva[1,3]

[1]Research and Technology Center, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brazil
[2]Department of Phamacology, University of California, Davis, CA, Unites States of America
[3]LabNECC, Center for Biomedical Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: [*]matheus.leonardo675@gmail.com

ORCID's: 0000-0002-4071-8741; 0000-0001-9341-0970; 0000-0003-4202-6420; 0000-0002-6453-1359; 0000-0003-1082-0777

ABSTRACT

Purpose: Cardiac contraction occurs in sarcomeres, where actin and myosin myofilaments interact. Calcium (Ca^{2+}) binding to troponin C (TnC) facilitates actin-myosin cross-bridge formation, leading to sarcomere shortening and contraction. Mathematical models describing myofilament dynamics have been developed based on various formulations and experimental data. This study compares five models: two by Rice *et al.* (R99, R08) and three by Negroni *et al.* (NL96, NL08, N15), focusing on twitch and steady-state contractions, including sarcomere length (SL) dependence and Ca^{2+} sensitivity. **Methods:** Models were simulated in MATLAB R2019a using the ode15s solver for coupled differential equations. A uniform parametric Ca^{2+} transient representing a twitch contraction limited analysis to myofilament-specific features. Isosarcometric contraction forces were measured at varying SL, and force-pCa relationships (negative logarithm of cytosolic Ca^{2+} concentration) were evaluated. **Results:** More recent models better represented cardiomyocyte contraction. Variations in twitch timecourse, SL dependence, and steady-state force response to changes in TnC affinity for Ca^{2+} were linked to differences in the formulation of contraction processes and species-specific data. **Conclusion:** This study highlights the need for contraction models with customizable species-dependent parameters, enabling greater simulation flexibility and alignment with experimental data.

Keywords: Cardiac contraction, Ventricular myocyte, Mathematical modeling, Myofilaments, Calcium.

INTRODUCTION

The main function of the heart is to pump blood to circulation and thus, to all tissues of the body. This process is primarily driven by the synchronized contraction of myocardial cells that form the ventricular chambers. The contractile organelle in these cells is the myofibril, formed by elemental units: the sarcomeres. The latter are disposed in series and are composed of filaments constituted of protein complexes with an interwoven organization. Actin and myosin are the main components of the sarcomere thin and thick filaments, respectively, and their interaction is essential for contraction [1]. The myosin heads that project onto the thin filaments and bind to actin form structures known as cross-bridges, which, upon conformational change, cause the thin filaments to slide toward the center of the sarcomere, generating shortening and/or tension [2].

In the resting sarcomere, the myosin-binding site of actin is obstructed by tropomyosin. However, this site is exposed after Ca^{2+} binding to another thin filament protein, namely troponin C (TnC), triggering a conformational alteration of the protein complex. The myoplasmic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in transiently elevated in response to the action potential, when Ca^{2+} influx through L-type channels triggers the release of large amounts of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum (SR) via the Ca^{2+}-induced Ca^{2+}-release mechanism. The increase in $[Ca^{2+}]_i$ favors Ca^{2+} binding to TnC, triggering the formation of cross-bridges [3]. This process has been the focus of various studies since Huxley's theory of contraction by the sliding filament mechanism was published [4,5].

Even before the concept of cross-bridges was elaborated, Hill proposed in 1938 a rheological model of contraction based on studies on muscle energy expenditure, shortening velocity, mechanical work and contraction force [6]. However, the mathematical modeling of muscle contraction had a breakthrough ~20 years later with the theories developed by Huxley, considering that contraction force is proportional to the number of cross-bridges formed [4,5]. From this assumption, several formulations to model this phenomenon have emerged. The approach can be biochemical, viewing contraction as the result of energetic interactions among myofilament proteins [7-9]. The proposal of Gray and Gonda [10,11], on the other hand, used an approach based on quantum

mechanics, which exemplifies the diversity of concepts underlying muscle contraction modeling.

Models can be based on experimental data obtained from preparations from different species, such as guinea pig [12], ferret [13], rabbit [14], canine [15], rodents [16] and frog [17], although not in all models [18,19]. Thus, models are continuously evolving and need to be continually evaluated under the light of experimental data. It is essential to understand that mathematical models contribute to enhance the knowledge serving as tools for better understanding the phenomenon of cardiac contraction, irrespective of the complexity level [20].

In a previous study [21], we compared two commonly used formulations to simulate myocardial contraction: the models published by Rice *et al.* in 1999 (R99) [22] and that proposed by Negroni & Lascano in 2008 (NL08) [23]. Using the same constant sarcomere length and the input from an electrophysiological model for rodent ventricle [24], we obtained with these models twitches with similar amplitude and slightly different timecourse. However, when the relationship between steady-state force and pCa (i.e., the negative logarithm of the molar Ca^{2+} concentration) was simulated, only the NL08 model was able to generate parallel curves for different values of the equilibrium dissociation constant (K_d) of Ca^{2+} at TnC, as expected [21]. Nevertheless, more recent versions of both models were proposed by Rice at al. in 2008 (R08) [25] and Negroni *et al.* in 2015 (N15) [26].

The aim of the present study is to compare the performance of R08 and N15 with the previous models, namely R99, NL08 and NL96, an earlier model published by Negroni & Lascano (NL96) [27], at simulating twitch contractions and the steady-state force-pCa relationship.

MATERIALS AND METHODS

A Brief Description of the Compared Models

NL96 model*:* This model is based on four postulates: (i) force is generated by cross-bridges, of which the number is proportional to the sarcomere length (SL); (ii) the force developed by the cross-bridges is proportional to the elongation of

their elastic structure; (iii) when SL does not vary, cross-bridge elongation is constant, and when SL changes, the cross-bridge length is adjusted at new positions along the thin filament by the cross-bridge detachment and reattachment; (iv) the increase in the rate of cross-bridge dissociation during SL changes depends on the rate of readjustment of the cross-bridge length.

The model presents a scheme for the myofilament dynamics that describes different states of the troponin system (TS) relating Ca^{2+}-TnC association and cross-bridge formation (**Figure 1A**). In the T state, the Ca^{2+} binding site of TnC is free. In TCa, Ca^{2+} binds to TnC, but without cross-bridge formation. In TCa*, Ca^{2+} is bound to TnC and actin-myosin association takes place in the regions where thin and thick filaments overlap. The transition from TCa to TCa* depends on the size of the effective region (TCa_{eff}, where cross-bridges can be formed, i.e., the filament overlap zone), which depends on SL. In the T* state, cross-bridges are in the power state, but Ca^{2+} has already dissociated from TnC. Transition among the states is governed by the rates constants Y1, Z1, Y2, Z2, Y3, Z3, Y4.

According to the postulate (i) of the model, the force developed by the cross-bridges is expressed after normalization to the muscle cross sectional area (F_{NL96}, in mN/mm^2) as:

$$F_{NL96} = A.([TCa^*] + [T^*]).(L - X) \quad (1)$$

where A represents the constant component of the equation, defined as the product of Avogadro's constant and the volume of the muscle unit, L is the half-sarcomere length, and X is the non-elastic region comprised by half the thick filament plus the non-overlapping length of the thin filament. The complete model is presented in the 1996 article of Negroni & Lascano [27]. In Silva *et al.* (2021) [21], the NL08 model was modified to fit experimental mouse data. For the simulations in the present study, the NL96 model was calibrated based on the adjusted version of NL08 model presented by Silva *et al.* [21]. Further details about model adjustments can be found in the supplemental material.

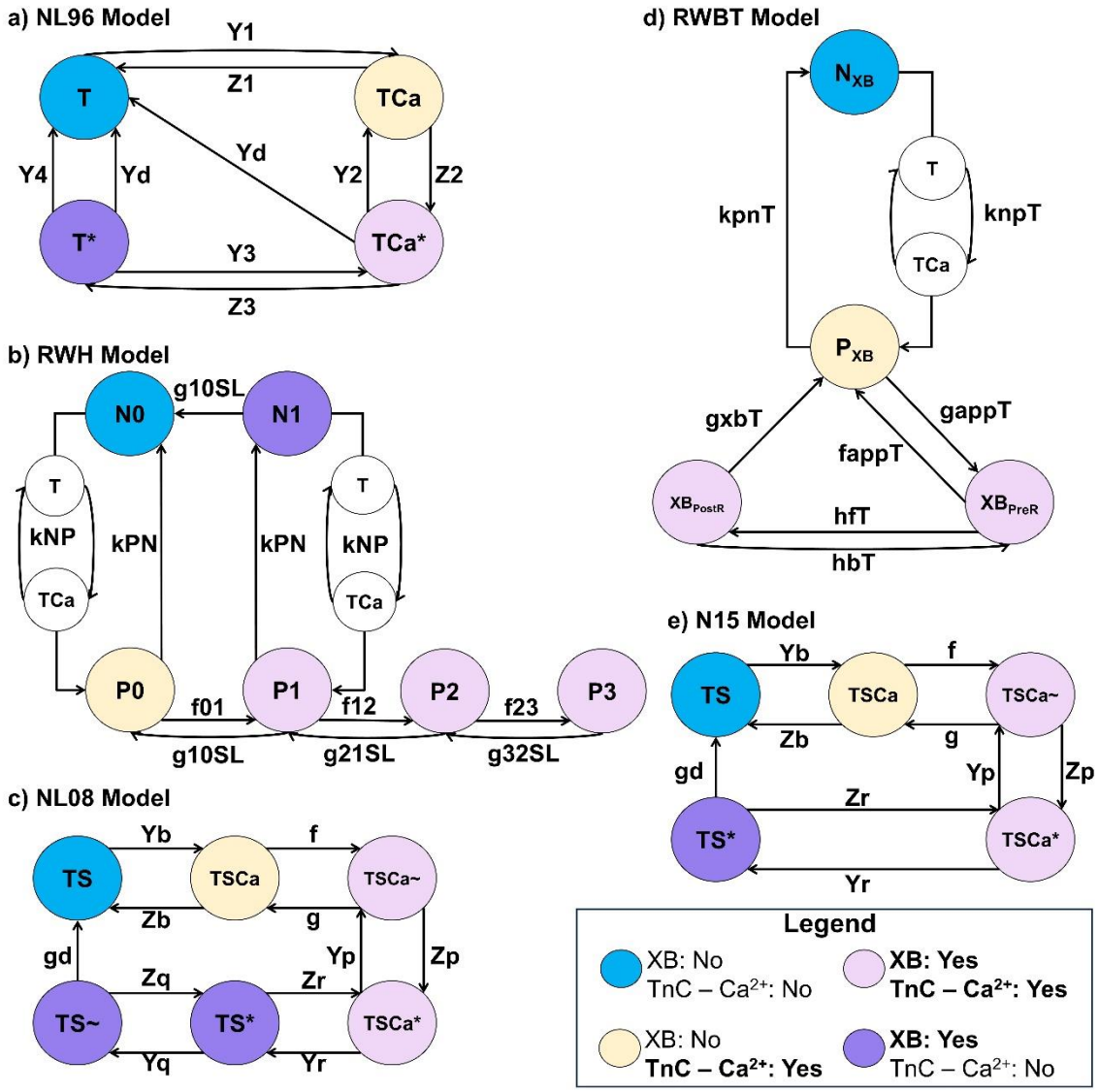


Figure 1. State diagrams for the NL96 [27] (**A**), NL08 [23] (**B**), R99 [22] (**C**), R08 [25] (**D**) and N15 [26] (**E**) models. In the legend, "XB" denotes cross-bridge formation, P and N denote, respectively, states permissive and non-permissive for cross-bridge formation. "TnC–Ca^{2+}" represents the interaction between troponin C and Ca^{2+}. For more details, see the text.

R99 model: In the 1999 article by Rice *et al.* [22], five mathematical models for isometric force generation by cardiac sarcomeres were developed and their output was compared with data reported in the literature. The models assumed different configurations of three cooperation mechanisms in cross-bridge formation: i) mechanism 1, in which cross-bridge formation increases the affinity of TnC for Ca^{2+}; ii) mechanism 2, in which cross-bridge formation increases the formation rate of neighboring cross-bridges, and multiple cross-bridges can sustain Ca^{2+}-independent activation; and, iii) mechanism 3, in which it is assumed

that end-to-end interaction of tropomyosin with adjacent troponin (Tn) molecules enhances the rate of cross-bridge formation. In all models, myosin is associated with a functional unit of actin, Tn and tropomyosin, and the latter can be in a permissive or non-permissive state for cross-bridge formation. In model 4 (selected for implementation in the present study), the number of cross-bridges formed in each functional unit varies from one to three.

Cooperative cross-bridge formation is primarily achieved by mechanisms 2 and 3. The latter is represented in the model by the interaction of Ca^{2+} with TnC (T and TCa), which is crucial to trigger the transition from the non-permissive (N0 and N1) to the permissive states for cross-bridge formation (P0, P1, P2, and P3) (**Figure 1B**). Weak actin-myosin interaction occurs at P0, while strong interaction with formation of 1, 2 or 3 cross-bridges take place at states P1, P2 and P3, respectively. Although N1 is a non-permissive state, a weak bridge residual from state P1 is present. Each state is represented as a probability fraction (i.e., N0 + N1 + P0 + P1 + P2 + P3 = 1). The *on* rates of crossbridge binding (f01, f12, and f23) have multipliers to implement mechanism 2, i.e., the formation of a cross-bridge facilitates the formation of another one, whereas the *off* rates (g10, g21, and g32) depend on SL.

The transition between non-permissive and permissive states dependent on both TnC-Ca^{2+} binding and SL, which is summarized as the constant hNP in the formulation presented by Mullins & Bondarenko [24]. In the latter article, the transition to non-permissive states was expressed as the constant hPN, adjusted to reproduce experimental data from mouse cardiomyocytes, and was used in the present study.

As the R99 the model is based on Huxley´s proposal [4], the developed force is equivalent to the number of formed cross-bridges (states N1, P1, P2, and P3). Normalized contraction force (F_{R99}, in mN/mm^2) is given by:

$$F_{RWH} = \alpha . \frac{P1 + N1 + 2.(P2) + 3.(P3)}{P1_{max} + 2.P2_{max} + 3.P3_{max}} \quad (2)$$

where α (in mN/mm^2) is an adjustment parameter implemented by Mullins & Bondarenko [24], and $P1_{max}$, $P2_{max}$, and $P3_{max}$ represent optimal conditions for maximum force development. More details about the model construction can be

found in Rice *et al.* [22], Mullins & Bondarenko [24] and in the supplemental material.

***NL08 model**:* The model published by Negroni & Lascano in 2008 [23] represents an expansion of the previous model NL96. The main changes are related to the myofilament dynamics and Ca^{2+} kinetics. In the new model, each Tn complex (TS) is composed of three regulatory units (RU), each containing a single Ca^{2+} binding site, so that TS will bind three Ca^{2+} ions cooperatively. Another important aspect implemented is the concept of two states of cross-bridges: a weak state with actin-myosin interaction binding but not force development, and a strong state in which the cross-bridge generate contraction force.

A six state scheme for the myofilament dynamics (vs. two in the previous model) was developed (**Figure 1C**), namely: a) TS (no Ca^{2+} binding); b) TSCa (Ca^{2+} bound to TS without cross-bridge formation); c) TSCa~ (Ca^{2+} bound to TS with weak cross-bridge formation); d) TSCa* (Ca^{2+} bound to TS with strong cross-bridge formation); e) TS* (strong cross-bridge formation without Ca^{2+} binding to TS); and f) TS~ (weak cross-bridge formation without Ca^{2+} binding to TS). As in the previous model, the transition from TSCa to TSCa~ depends on an effective region for cross-bridge formation (TC_{aeff}). The rate constants *g* and *gd* depend on the extension of the cross-bridges, which, in turn, depends on SL. All transitions are governed by the rate constants f, Yb, Zb, Yp, Zp, Yr, Zr, Yq and Zq). The contraction force developed by the cross-bridges (FN_{L08}) is described as:

$$F_{NL08} = A_w.([TSCa\sim] + [TS\sim]).h_w + A_p.([TSCa^* + TS^*]).h_p \qquad (3)$$

where A_w and A_p are constants related to the number of cross-bridges in the weak and strong states, respectively, and *hw* and *hp* indicate the average cross-bridge elongation in these states.

R08 model: The model proposed by Rice *et al.* in 2008 [25] has the capability to simulate contraction force under a wide range of conditions of sarcomere and muscle length (i.e., isometric, isosarcometric and isotonic conditions), which allows the representation of various experimental protocols. It includes several parameters dependent on temperature and sarcomere geometry. The complete

model considers several other aspects, such as viscosity, mass and elastic properties of the sarcomere ends. The model assumes a regulatory unit (RU) of Tn and tropomyosin that can assume four states (**Figure 1D**): a) a state non-permissive for cross-bridge formation (NXB); b) a state permissive for cross-bridge formation with Ca^{2+} bound to TnC, but the interaction is weak or without attachment (PXB); c) a state permissive for strong cross-bridge attachment, in which the myosin head is extended (XB_{PreR}); and d) state similar to the previous one, except that the myosin head has rotated and induced strain in the flexible neck (XB_{PostR}).

The rate constants of transition between the PXB and NXB states (knpT and kpnT, respectively) depend on SL, Ca^{2+} binding to TnC and temperature. The cross-bridge attachment in the XB_{PreR} state contributes to muscle rigidity but does not actively participate in contraction force. The rate constants of transition from PXB to this state (f_{appT}) and from XB_{PostR} to XB_{PreR} (h_{bT}) depend only on temperature. The rate constant of transition from XB_{PreR} to PXB (g_{appT}) and to XB_{PostR} (h_{fT}), and from the latter state to PBX (g_{xbT}) depend on both SL and temperature.

For the simulations in this study, the model was used in the isosarcometric mode, and the SOVFthick(x) [25] term was removed to directly obtain active force in its standard unit (mN/mm²), without additional scaling for sarcomere geometry. In this model, contraction force (F_{R08}) was formulated as:

$$F_{RWBT} = \beta . \frac{xXB_{PostR} . XB_{PostR}}{x_0 . XB_{PostR}^{Max}} \quad (4)$$

where β is an empirical parameter to adjust the model to mouse data, xXB_{PostR} is the average distortion of the cross-bridges in the XB_{PostR} state, x_0 is the mean distortion of crossbridges in strongly bound states, and $XBMax_{PostR}$ is the maximum possible number of RUs in the XB_{PostR} state under optimal conditions. The full details of the model are available in Rice *et al.* [25].

N15 model: This model, which encompasses a significant portion of the structures established in the previous model (NL08), was developed to be coupled to a rabbit electrical model with formulation to simulate the effects of β-

adrenergic stimulation. The main change lies in the myofilament dynamics, now represented with five states (**Figure 1E**): a) no Ca^{2+} binding to TnC (TS); b) Ca^{2+} binding to TnC without cross-bridge formation (TSCa); c) Ca^{2+} binding to TnC and weak cross-bridge formation (TSCa~); d) Ca^{2+} binding to TnC and strong cross-bridge formation (TSCa*); and e) strong cross-bridge formation without Ca^{2+} binding to TnC (TS*). There are few differences with respect to NL08, namely the exclusion of the TS~ state and inclusion of SL dependence of the *f* constant rate, which governs transition from TSCa to TSCa~.

The equation that describes the contraction force developed by the cross-bridges with this model (FN_{15}) is:

$$F_{N15} = A_w.([TSCa\sim]).h_w + A_p.([TSCa^* + TS^*]).h_p \quad (5)$$

where A_w and A_p are constants related to the number of cross-bridges in the weak and strong states, respectively, and h_w and h_p indicate the average elongation of the cross-bridges in these states. The complete model is presented in Negroni *et al.* [26].

In the present study, the compared models were adapted to conform to mouse parameters, as done in a previous report [21]. Further details about the modifications can be found in the supplemental material. The models were implemented in R2019a MATLAB and solved using the ode15s function. Simulations were conducted on a desktop computer (Dell, OptiPlex7050) with Windows 10 (64-bit) operating system and a Dual Core Intel® Core™ i7 processor (CPU 7700, 3.60 GHz).

Simulations Protocols

Phasic Twitch Contractions: To simulate an action potential-evoked $[Ca^{2+}]_i$ elevation that acts as the trigger of a twitch contraction, a parametric Ca^{2+} transient was generated according to the following equation (**Figure 2A**):

$$[Ca^{2+}]_i = [Ca^{2+}]_{io} + \Delta[Ca^{2+}].\left(\frac{t - t_{ap}}{t_i}\right)^{n_i}.e^{n_i.\left(1-\left(\frac{t-t_{ap}}{t_i}\right)\right)} \quad (6)$$

where $[Ca^{2+}]_{io}$ is the diastolic $[Ca^{2+}]_i$, $\Delta[Ca^{2+}]$ is the amplitude of the Ca^{2+} transient (i.e., peak $[Ca^{2+}]_i$ minus $[Ca^{2+}]_{io}$), t is the total simulation duration, t_{ap} is the time point at which the transient starts, t_i is the time to peak of the Ca^{2+} transient, and n_i is an exponential fit parameter that corresponds to a variable quantitatively associated with the opening and closing kinetics of the L-type calcium channel.

The same Ca^{2+} transient was used as the input for all the compared models, using the following values for the parameters: t = 1200 ms; $[Ca^{2+}]_{io}$ = 0.1 μM; $\Delta[Ca^{2+}]$ = 0.4 μM; t_{ap} = 200 ms; t_i = 50 ms; and n_i = 0.5.

Two kinds of simulation were performed for each model:

**Experiment 1: twitch contraction force.* A single twitch contraction was simulated under isosarcometric condition (SL= 2.1 μm), using as the input the parametric Ca^{2+} transient described above. The following variables were compared among the models: diastolic force (F_{dia}), peak contraction force (F_{peak}), contraction amplitude (ΔF), time to peak force (t_{peak}) and half-time of relaxation ($t_{0.5}$).

**Experiment 2: twitch force-length relationship.* As all models used in this study include dependence of twitch parameters on SL, twitches were simulated as in experiment 1, however at different diastolic SL values, from 1.9 to 2.3 μm. The variables compared were ΔF, t_{peak}, and $t_{0.5}$.

The units of force and temporal variables of the simulated twitches were mN/mm^2 and ms, respectively

Steady-state contraction force: In this protocol, the development of steady-state force generation was simulated in response to discrete steps of the Ca^{2+} concentration in the myofibrillar medium, expressed as pCa, i.e., the negative logarithm of the molar Ca^{2+} concentration.

**Experiment 3: force-pCa relationship:* The maximum value of generated force was simulated at different pCa values, from 7.0 to 5.0. Each pCa step lasted 1.2 s. The force developed at each pCa was normalized to the maximum value. This procedure was repeated after alteration of the sensitivity of TnC to Ca^{2+} by changing the K_d of the TnC-Ca^{2+} interaction. This was achieved by increasing and decreasing the rate constant of the TnC-Ca^{2+} association (k_{on}) by a factor of 3 ($K_d = k_{off}/k_{on}$, where k_{off} is the dissociation rate constant of the complex). A sigmoidal function was adjusted to the points according to:

$$F = \frac{F_{max}}{1 + 10^{(pCa - pCa_{50}).n_H}} \quad (7)$$

where F_{max} is the maximum force, pCa_{50} is the pCa value at which the force is half-maximum, and n_H is the Hill coefficient of the curve.

RESULTS

Isosarcometric Twitch Contraction

The parameters of the twitch contractions triggered by the parametric Ca^{2+} transient, simulated with the models NL96, NL08, N15, R99 and R08, are presented in **Table 1**, while the contractions are illustrated in **Figure 2**. The use of a single input waveform and the adjustments made in the model parameters for species (mouse) probably contributed to the similarity of contraction amplitude among the simulated twitches. It can be observed that the contractions generated with the more recent models (R08 and N15) present faster kinetics than the others.

Table 1. Parameters of isosarcomeric the (SL = 2.1 μm) twitch contractions presented in Figure 2B-G, simulated with the models R99 [22], R08 [25], NL96 [27], NL08 [23] and N15 [26]. F_{dia}: diastolic force; F_{peak}: peak force; ΔF: contraction amplitude; t_{peak}: time to peak force; $t_{0.5}$: half-time of relaxation.

Model	R99	R08	NL96	NL08	N15
F_{dia} (mN/mm^2)	0.02	0.10	0.26	0.12	0.10
F_{peak} (mN/mm^2)	10.03	10.14	10.04	10.1	10.1
ΔF (mN/mm^2)	10	10.04	9.78	9.98	9.99
t_{peak} (ms)	158	133	229	168	168
$t_{0.5}$ (ms)	141	91	243	140	128

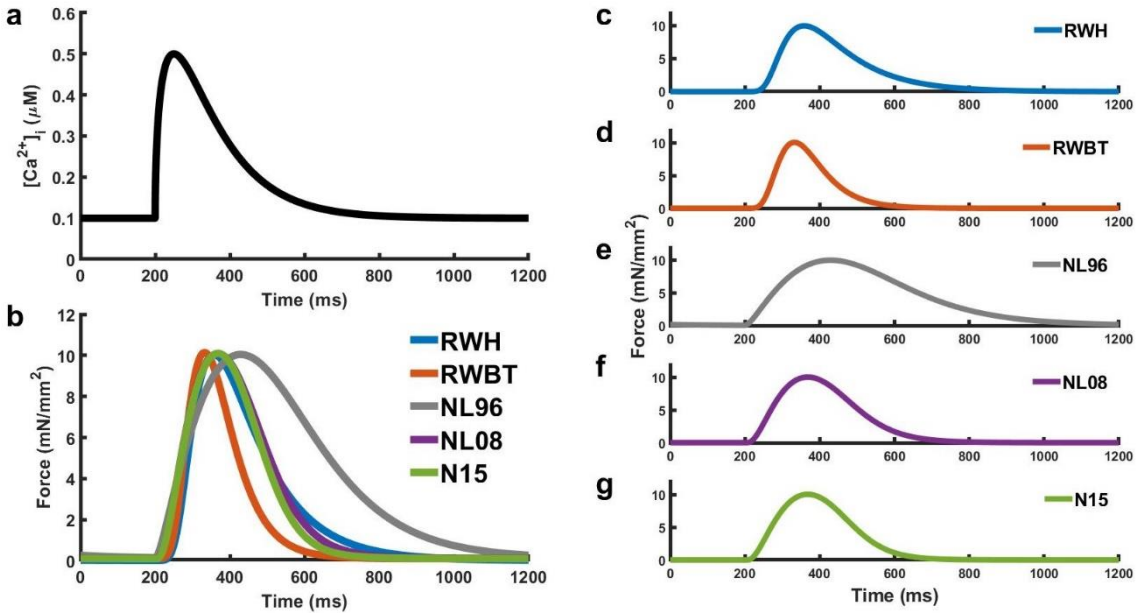


Figure 2. (**A**) Parametric Ca^{2+} transient used as the only input waveform for simulations with all models. (**B**) Superimposed isosarcomeric twitch contractions generated with the R99, R08, NL96, NL08, and N15 models, which are shown separately in panels **C**, **D**, **E**, **F** and **G**, respectively. Contraction parameters are presented in Table 1.

Twitch Force-Length Relationship

The influence of SL on isosarcometric twitch contraction, as simulated using the NL96, NL08, N15, R99, and R08 models, is presented in **Figure 3**. The left column (**Figure 3A-C**) illustrates the relationship between SL and the parameters ΔF, t_{peak}, and $t_{0.5}$, while the right column (**Figure 3D-H**) depicts the progression of isosarcometric contraction curves as SL increases in each model.

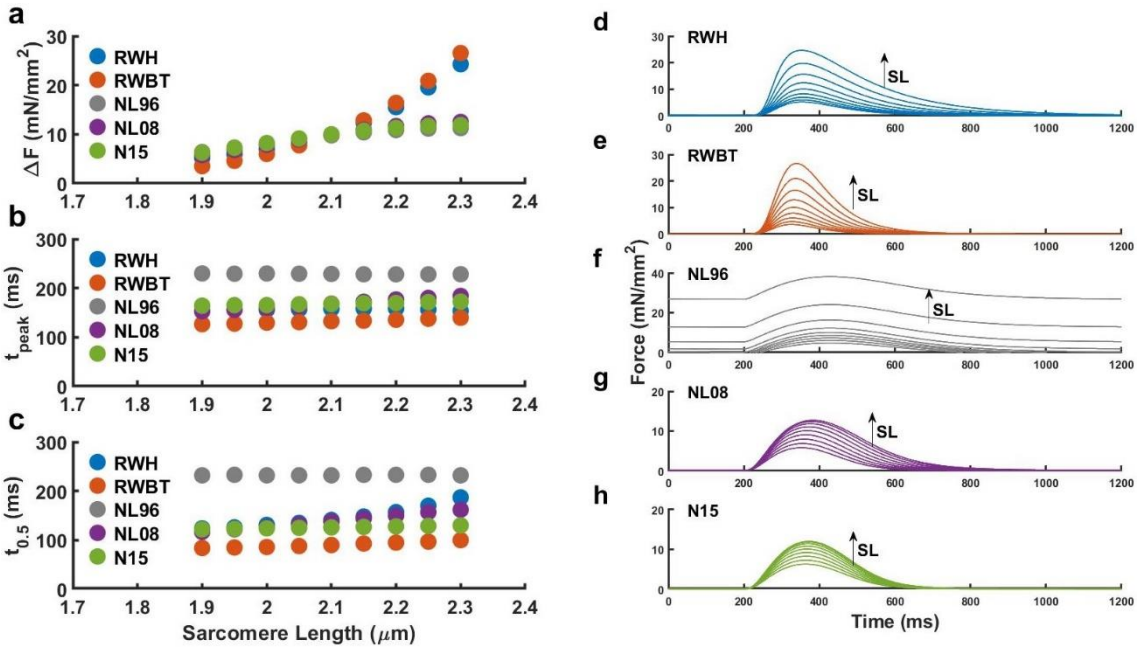


Figure 3. Relationship between contraction parameters and resting sarcomere length (SL) for twitches simulated with the R99, R08, NL96, NL08 and N15 models. (**A**) developed twitch amplitude force (ΔF). (**B**) time to peak force (t_{peak}). (**C**) half-time of relaxation ($t_{0.5}$). Twitch traces simulated with the R99 [22], R08 [25], NL96 [27], NL08 [23] and N15 [26], R08, NL96, NL08 and N15 models are presented in panels **D**, **E**, **F**, **G** and **H**, respectively.

Force-pCa Relationship

The sigmoidal curves representing the relationship between steady-state force and pCa in simulations performed with the five models are shown in **Figure 4**, while the curve parameters are presented in **Table 2**. Curves in **Figure 4A** were simulated using the original values of K_d of TnC-Ca^{2+} binding of each model (control in **Table 2**), whereas **Figures 4B-F** show curve sets for each model, in which the respective K_d value was increased (↑K_d) and decreased (↓K_d) by a factor of 3.

Table 2. Parameters of the force-pCa curves presented in Fig. 4 simulated with the models R99 [22], R08 [25], NL96 [27], NL08 [23] and N15 [26], respectively. pCa: negative logarithm of the molar Ca2+ concentration; K_d: equilibrium constant of Ca^{2+}-TnC dissociation; ↓ K_d: K_d was decreased by 3 times; ↑ K_d: K_d was increased by 3 times; pCa_{50}: pCa value corresponding to 50% of maximum force; nH: Hill coefficient.

	Control			(↓ K_d)			(↑ K_d)		
Models	**pCa_{50}**	**n_H**	**K_d**	**pCa_{50}**	**n_H**	**K_d**	**pCa_{50}**	**n_H**	**K_d**
R99	6.33	3.4	0.6	6.48	2.29	0.2	6.28	4.25	1.8
R08	5.73	5.58	7.72	6.2	5.14	2.57	5.26	4.12	23.16
NL96	6.06	1.78	0.77	6.28	1.48	0.26	5.79	2	2.31
NL08	6.11	3.52	0.77	6.22	3.45	0.26	5.97	3.45	2.31
N15	6.1	3.54	0.77	6.22	3.47	0.26	5.97	3.47	2.31

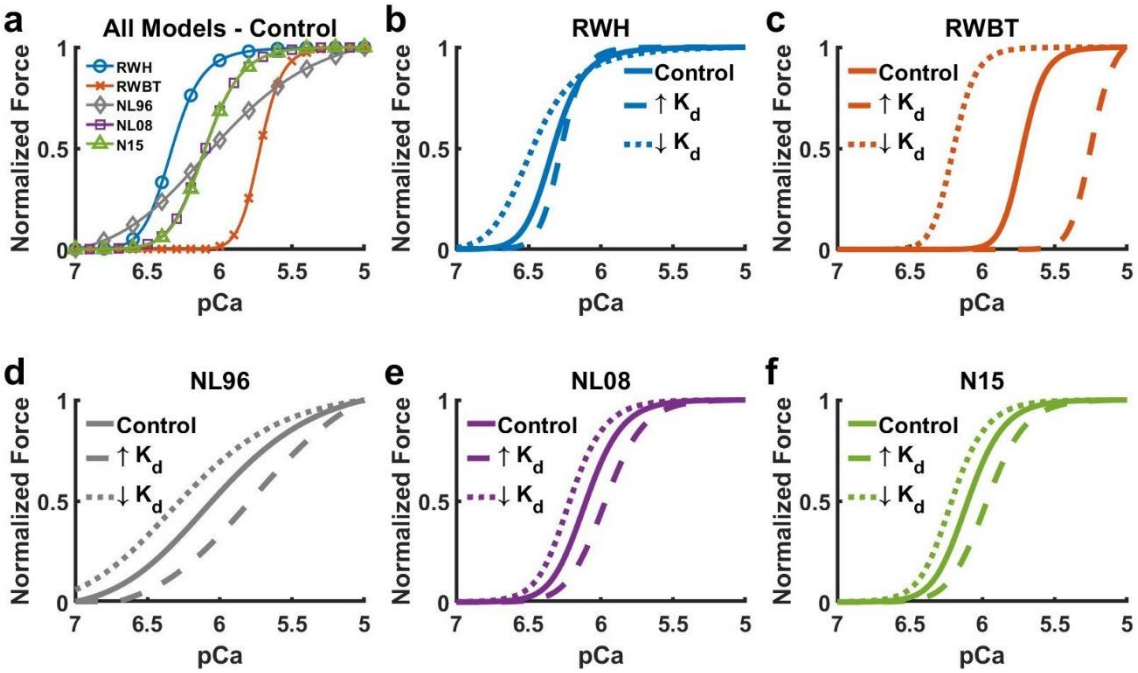


Fig. 4. Force vs. pCa relationship simulated with the models R99 [22], R08 [25], NL96 [27], NL08 [23] and N15 [26]. Curves were simulated using the original values of the Ca^{2+}-troponin C equilibrium dissociation constant (K_d) (panel **A**), and also for each model after a 3-times increase (↑ K_d) and decrease (↓ K_d) in the K_d values (panels **B**-**F**).

DISCUSSION

Because the cross-bridge formation is considered the primary mechanism of force generation, it is not surprising that the rising phase of the contraction is similar for the NL08 and NL15 models, which used the same value of the rate constant of cross-bridge attachment (parameter *f*, based on experimental data

from rat ventricular myocytes; [28]). However, with NL96, the contraction rising phase was slower, probably because the rate of crossbridge attachment (Y2, based on the data from rabbit myocardium; [14]) is lower than in the authors´ more recent models. The influence of difference in TnC-Ca^{2+} interaction on the slower contraction development may probably be ruled out, as increasing the Ca^{2+} binding k_{on} to the same value used in the NL08 model did not reduce twitch t_{peak}. Another contributor to the faster force development observed with the NL08 and N15 models, compared to NL96, might be the incorporation of cooperativity of three Ca^{2+} binding sites per regulatory unit, which is a simplification of the phenomenon described in by Robinson *et al.* [29].

The relaxation of the cardiac muscle reflects the reduction in the number of actin-myosin cross-bridges [30] due to the $[Ca^{2+}]_i$ decline, and consequently, of Ca^{2+} binding to TnC. As observed for contraction development, relaxation was considerably slower in the twitch simulated with the NL96 vs. the NL08 model. The use of a parametric Ca^{2+} transient in the present study was fundamental to isolate the myofilament-dependent factors, thus removing the influence species-dependent differences in Ca^{2+} transient kinetics. This is important because the models considered in this work assume parameter values based on experiments with myocardium from different mammals (e.g., rodents, ferrets, rabbits), which present marked difference in the Ca^{2+} transient timecourse [31,32].

The NL96 model uses three rate constants of actin-myosin detachment. One of them (Yd) is dependent on the cross-bridge extension, which is zero under isosarcometric conditions. The other two constants (Y4= 0.04 ms^{-1}; and Z2= 0.0013 ms^{-1}) were estimated by fitting the model to reported experimental data from rabbit [14] and ferret [33] myocardium. The NL08 model, by its turn, assumes only two cross-bridge detachment rates constants: one that depends on SL and the extension of the cross-bridge (gd= 0.0558 ms^{-1} under isosarcometric condition with SL = 2.1 μm) and one that is independent of these factors (g = 0.0023 ms^{-1}). Thus, under the present simulation conditions, cross-bridge detachment rate is higher with the NL08, which would partially explain the lower $t_{0.5}$ value. However, difference in the proposed filament dynamics must also be considered. The NL08 model considers two states of cross-bridge attachment, strong and weak, based on previous models [22,34-36], and six states for the Tn system (*vs*. two states in the NL96 model; **Figure 1**). The further acceleration of

relaxation with the NL15 model (vs. NL08) might be explained by the change in the cross-bridge detachment rate constant *gd*, which in the latest model was considered as exponentially dependent on SL (for SL up to 2.4 μm).

The twitch simulated with the R08 model presented the fastest relaxation among models. This model incorporates two cross-bridge detachment rates: one dependent (*gappT*) and one independent of SL (*gxbT*) (see Figure 1D). Although Rice *et al.* (2008) pointed out that reducing SL increases *gappT*, facilitating cross-bridge detachment and thus promoting faster relaxation, this should not impact the present simulations of isosarcomeric contractions. A plausible explanation for the faster twitch relaxation with this model is the lower TnC affinity for Ca^{2+} (higher K_d) compared to that in the R99 model (see supplement), which should promote faster Ca^{2+} dissociation from the thin filament.

Sarcomere lengthening at rest increases developed contraction force by augmenting the degree of myofilament overlap (and thus, the number of possible cross-bridge attachments) and by enhancing myofilament sensitivity to Ca^{2+}, [37-40]. This phenomenon was reproduced by all tested models (**Figure 3A**). In the R99 and R08 models, SL directly affects Ca^{2+} binding to TnC, impacting on the rate constant of transition from the non-permissive state to the permissive state for cross-bridge formation (hNP and knpT, respectively). This may explain the more marked influence of SL on ΔF in these models. On the other hand, the ΔF-SL relationship simulated with the NL96, NL08, and N15 models shows a plateau for SL > 2.1 μm. In these models, force generation depends exponentially on SL, but sensitivity to SL is limited by a constant (La or Lc). This formulation was based on the work of Gordon *et al.* [41], developed with frog skeletal muscle, which presents a similar saturation the ΔF-SL relationship. Also, it is interesting to observe that only for NL96 model the increase of resting SL caused marked enhancement of the passive (resting) force (compare panel F with panels D, E, G and H in **Figure 3**). This behavior does not seem to be causally related to the flatter relationship between SL and active force (ΔF) in this model and might be attributed to the way in which the SL-dependent transition rate equations were drawn up. Unlike later models, which incorporate formulations that constrain the growth of rates with SL (Supplementary Material, equations B13, B14, C13, and C15), the NL96 model employs a straightforward proportional growth of these rates with SL (Supplementary Material, equations A9 and A10).

The t_{peak} was rather insensitive to SL, except for twitches simulated with the NL08 model (**Figure 3B**). This difference may be due to the use of asymmetry and relaxation indices from Campbell *et al.* [42] for force development, which might also explain the sensitivity of $t_{0.5}$ to SL in this model (**Figure 3C**). For the R99 model, on the other hand, relaxation was prolonged by increasing SL possibly because it involves transition among a greater number of states in which the rate constants depend on SL.

The curve slope (n_H) was similar for the R99, NL08 and NL15 models, whereas the relationship was steeper with the R08 model, and more gradual with the NL96 model. The pCa_{50} value, an indicator of the myofilament sensitivity to Ca^{2+}, varied little among most models, i.e., the range of [Ca^{2+}] corresponding to 50% of the maximum force was 0.5-1 μM (corresponding to pCa_{50} between 6.0 and 6.3; **Table 2**). The exception was the R08, in which sensitivity to Ca^{2+} was the lowest (half-maximal force required [Ca^{2+}] ~5 μM).

Except for the R99 model, of which curves showed an anomalous behavior, as reported by Silva *et al.* [21], 3-fold increasing and decreasing by 3 times the TnC-Ca^{2+} K_d produced opposite shifts in the force-pCa curve, in a parallel, symmetrical fashion (compare **Figure 4B**. with **Figures 4C-F**). The main factor contributing to the non-linear response of the curve to K_d variation in the R99 model might be the dependence of nH on K_d observed in this model [21]. This feature in the R99 model and the low steepness of the force-pCa relationship (low n_H) in the NL96 model were corrected in later versions of the models (R08, and NL08 and N15). Nevertheless, although less dependent on K_d, n_H determined with the R08 model still showed variation with changes in K_d, but now asymmetrical (i.e., decrease at different extents when K_d was raised and diminished by a factor of 3). In contrast, with the models developed by Negroni and collaborators, n_H variation with K_d was minimal (**Table 2**).

On the other hand, the curve generated with R08 model was considerably more sensitive to changes in the K_d, compared to those produced with the more recent models developed by the Negroni and collaborators (NL08 and N15). The explanation for this difference may lie on the impact of k_{on} and k_{off} in each model. In the NL08 and N15 models, these rate constants are the only factors that directly affect Ca^{2+} binding to TnC, whereas in the R08 model, TnC-Ca^{2+} interaction at high- and low-affinity sites is governed by intermediary equations in

which temperature, species and SL are also considered. While the R08 model seems to reproduce bettet the experimental data of the force-pCa relationship and Ca^{2+} sensitivity [43,44], the NL08 and N15 models, which are less species-dependent, may be more versatile in the simulation of force-pCa curves to study, e.g., cardiac pharmacology and pathophysiology [45].

For all the models compared in this study, a single, parametric Ca^{2+} transient was used to trigger a twitch contraction. Because this approach eliminates the interference of species-dependent variations in electrophysiology and Ca^{2+} dynamics allowed restricting the comparison to the formulation describing the phenomena that take place only at the myofilament level. Nevertheless, phenomena upstream the contractile apparatus may be introducing by including species-specific electrophysiological models currently available [46-48].

CONCLUSION

Among the compared models of myocardial contraction, the earlier proposals by both the Rice and the Negroni groups (R99 and NL96, respectively) show limitations. While the NL96 model responds to relatively mild sarcomere lengthening with marked increase in passive force the force-pCa relationship generated with the R99 model is affected by TnC-Ca^{2+} K_d in an aberrant way. However, although the core designs of the NL96 and R99 models were retained (e.g., the TnC states regarding Ca^{2+} binding and the concept of permissiveness for cross-bridge formation, respectively), the later versions of these models' showed improvement and better reproduction of experimental data on which they are based. The R08 model has the most simplified state diagram, yet it considers variables not taken into account in other models, such as temperature and filament length, which might be important depending on the conditions of the simulation. Investigating the behavior of these models when coupled to species-specific electrophysiological models of ventricular myocytes and increasing model flexibility for the choice of species-specific parameters should be the next step of the present study.

STATEMENTS AND DECLARATIONS

Author Contribution

Matheus Leonardo Alves de Camargo performed the simulations and drafted the initial version of the manuscript. Daisuke Sato contributed to the first revision and assisted in structuring the text. José Wilson Magalhães Bassani and Rosana Almada Bassani participated in the critical review of the manuscript and collaborated on the writing of the discussion section. Robson Rodrigues da Silva carried out the final review of the manuscript and was responsible for the initial conception of the study.

Data Availability Statement

All the MATLAB scripts and stored data used in this work are stored in the OSF repository and can be accessed via the following link: https://osf.io/zqcr6/.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the absence of financial or personal competing interest with other parts with regard if the present study.

Acknowledgments

This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ Brasil (CAPES; finance code 88887.627770/2021-00, São Paulo Research Foundation (FAPESP; grant 2016/18422-7), Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant # 30400/2016-2), the Brazilian Ministry of Health/ FINEP (Conv. 0113021400, ref. 0441/12) and the University of Mogi das Cruzes.

REFERENCES

[1] Rassier DE. Sarcomere mechanics in striated muscles: from molecules to sarcomeres to cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2017; 313: C134-C145. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00050.2017.

[2] Stern MD, Lakatta EG. Excitation-contraction coupling in the heart: the state of the question. FASEB J. 1992; 6: 3092-3100. https://doi.org/10.1096/fasebj.6.12.1325933.

[3] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002; 415(6868): 198-205. https://doi.org/10.1038/415198a.

[4] Huxley AF. Muscle structure and theories of contraction. Prog Biophys Biophys Chem. 1957; 7: 255-318. https://doi.org/10.1016/S0096-4174(18)30128-8.

[5] Huxley AF. Muscular contraction. J Physiol. 1974; 243: 1-43. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1974.sp010740.

[6] Hill AV. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. Proc. R. Soc. Lond. 1938; B126136–195. http://doi.org/10.1098/rspb.1938.0050.

[7] Lymn RW, Taylor EW. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. Biochemistry. 1971; 10: 4617-4624. https://doi.org/10.1021/bi00801a004.

[8] Eisenberg E, Hill TL, Chen Y. Cross-bridge model of muscle contraction. Quantitative analysis. Biophys J. 1980; 29: 195-227. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(80)85126-5.

[9] Mijailovich SM, Fredberg JJ, Butler JP. On the theory of muscle contraction: filament extensibility and the development of isometric force and stiffness. Biophys J. 1996; 71: 1475-1484. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79348-7.

[10] Gray BF, Gonda I. The sliding filament model of muscle contraction. I. Quantum mechanical formalism. J Theor Biol. 1977; 69: 167-185. https://doi.org/10.1016/0022-5193(77)90394-0.

[11] Gray BF, Gonda I. The sliding filament model of muscle contraction. II. The energetic and dynamical predictions of a quantum mechanical transducer model. J Theor Biol. 1977; 69: 187-230. https://doi.org/10.1016/0022-5193(77)90395-2.

[12] Pásek M, Simurda J, Orchard CH, Christé G. A model of the guinea-pig ventricular cardiac myocyte incorporating a transverse-axial tubular system. Prog Biophys Mol Biol. 2008; 96: 258-280. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.07.022.

[13] Yue DT. Intracellular [Ca2+] related to rate of force development in twitch contraction of heart. Am J Physiol. 1987; 252(Pt 2): H760-H770. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1987.252.4.H760.

[14] Peterson JN, Hunter WC, Berman MR. Estimated time course of Ca2+ bound to troponin C during relaxation in isolated cardiac muscle. Am J Physiol. 1991; 260(Pt 2): H1013-H1024. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.260.3.H1013.

[15] Burkhoff D. Explaining load dependence of ventricular contractile properties with a model of excitation-contraction coupling. J Mol Cell Cardiol. 1994; 26: 959-978. https://doi.org/10.1006/jmcc.1994.1117.

[16] McCabe KJ, Aboelkassem Y, Teitgen AE, *et al.* Predicting the effects of dATP on cardiac contraction using multiscale modeling of the sarcomere. Arch Biochem Biophys. 2020; 695: 108582. https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108582.

[17] Zahalak, GI. A distribution-moment approximation for kinetic theories of muscular contraction. Math Biosci. 1981; 55: 89-114. https://doi.org/10.1016/0025-5564(81)90014-6.

[18] Izakov VYa, Katsnelson LB, Blyakhman FA, Markhasin VS, Shklyar TF. Cooperative effects due to calcium binding by troponin and their consequences for contraction and relaxation of cardiac muscle under various conditions of mechanical loading. Circ Res. 1991; 69: 1171-1184. https://doi.org/10.1161/01.res.69.5.1171.

[19] Panerai RB. A model of cardiac muscle mechanics and energetics. J Biomech. 1980; 13: 929-940. https://doi.org/10.1016/0021-9290(80)90163-3.

[20] Puglisi JL, Wang F, Bers DM. Modeling the isolated cardiac myocyte. Prog Biophys Mol Biol. 2004; 85: 163-178. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.12.003.

[21] Silva RR, Filho OBS, Bassani JWM, Bassani RA. The ForceLAB simulator: Application to the comparison of current models of cardiomyocyte contraction. Comput Biol Med. 2021; 131: 104240. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104240.

[22] Rice JJ, Winslow RL, Hunter WC. Comparison of putative cooperative mechanisms in cardiac muscle: length dependence and dynamic responses. Am J Physiol. 1999; 276: H1734-H1754. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.276.5.H1734.

[23] Negroni JA, Lascano EC. Simulation of steady state and transient cardiac muscle response experiments with a Huxley-based contraction model. J Mol Cell Cardiol. 2008; 45: 300-312. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.04.012.

[24] Mullins PD, Bondarenko VE. A mathematical model of the mouse ventricular myocyte contraction. PLoS One. 2013; 8: e63141. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063141.

[25] Rice JJ, Wang F, Bers DM, de Tombe PP. Approximate model of cooperative activation and crossbridge cycling in cardiac muscle using ordinary differential equations. Biophys J. 2008; 95: 2368-2390. https://doi.org/10.1529/biophysj.107.119487.

[26] Negroni JA, Morotti S, Lascano EC, *et al.* β-adrenergic effects on cardiac myofilaments and contraction in an integrated rabbit ventricular myocyte model. J Mol Cell Cardiol. 2015; 81: 162-175. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.014.

[27] Negroni JA, Lascano EC. A cardiac muscle model relating sarcomere dynamics to calcium kinetics. J Mol Cell Cardiol. 1996; 28: 915-929. https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0086.

[28] Janssen PM, Hunter WC. Force, not sarcomere length, correlates with prolongation of isosarcometric contraction. Am J Physiol. 1995; 269 (Pt 2): H676-H685. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.2.H676.

[29] Robinson JM, Wang Y, Kerrick WG, Kawai R, Cheung HC. Activation of striated muscle: nearest-neighbor regulatory-unit and cross-bridge influence on myofilament kinetics. J Mol Biol. 2002; 322: 1065-1088. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00855-0.

[30] Chung CS, Hoopes CW, Campbell KS. Myocardial relaxation is accelerated by fast stretch, not reduced afterload. J Mol Cell Cardiol. 2017; 103: 65-73. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.01.004.

[31] Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. J Physiol. 1994; 476: 279-293. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020130.

[32] Bassani RA, Bassani JW, Bers DM. Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems. J Physiol. 1994; 476: 295-308. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020131.

[33] Kawai M, Saeki Y, Zhao Y. Crossbridge scheme and the kinetic constants of elementary steps deduced from chemically skinned papillary and trabecular muscles of the ferret. Circ Res. 1993; 73: 35-50. https://doi.org/10.1161/01.res.73.1.35.

[34] Julian FJ, Sollins KR, Sollins MR. A model for the transient and steady-state mechanical behavior of contracting muscle. Biophys J. 1974; 14: 546-562. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(74)85934-5.

[35] Landesberg A, Sideman S. Mechanical regulation of cardiac muscle by coupling calcium kinetics with cross-bridge cycling: a dynamic model. Am J Physiol. 1994; 267(Pt 2): H779-H795. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.2.H779.

[36] Razumova MV, Bukatina AE, Campbell KB. Stiffness-distortion sarcomere model for muscle simulation. J Appl Physiol 1999; 87: 1861-1876. https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.5.1861.

[37] Allen DG, Kentish JC. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. J Mol Cell Cardiol. 1985; 17: 821-840. https://doi.org/10.1016/s0022-2828(85)80097-3.

[38] Wang YP, Fuchs F. Length, force, and Ca (2+)-troponin C affinity in cardiac and slow skeletal muscle. Am J Physiol. 1994; 266(Pt 1): C1077-C1082. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.4.C1077.

[39] Konhilas JP, Irving TC, de Tombe PP. Frank-Starling law of the heart and the cellular mechanisms of length-dependent activation. Pflugers Arch. 2002; 445: 305-310. https://doi.org/10.1007/s00424-002-0902-1.

[40] MacIntosh BR. Recent developments in understanding the length dependence of contractile response of skeletal muscle. Eur J Appl Physiol. 2017; 117: 1059-1071. https://doi.org/10.1007/s00421-017-3591-3.

[41] Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. J Physiol. 1966; 184: 170-192. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1966.sp007909.

[42] Campbell KB, Razumova MV, Kirkpatrick RD, Slinker BK. Myofilament kinetics in isometric twitch dynamics. Ann Biomed Eng. 2001; 29: 384-405. https://doi.org/10.1114/1.1366669.

[43] Yuan CC, Kazmierczak K, Liang J, Ma W, Irving TC, Szczesna-Cordary D. Molecular basis of force-pCa relation in MYL2 cardiomyopathy mice: Role of the super-relaxed state of myosin. Proc Natl Acad Sci USA. 2022; 119: e2110328119. https://doi.org/10.1073/pnas.2110328119.

[44] Walker JS, Li X, Buttrick PM. Analysing force-pCa curves. J Muscle Res Cell Motil. 2010; 31: 59-69. https://doi.org/10.1007/s10974-010-9208-7.

[45] Longobardi S, Sher A, Niederer SA. Quantitative mapping of force-pCa curves to whole-heart contraction and relaxation. J Physiol. 2022; 600: 3497-3516. https://doi.org/10.1113/JP283352.

[46] Bondarenko VE, Szigeti GP, Bett GC, Kim SJ, Rasmusson RL. Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 287: H1378-H1403. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00185.2003.

[47] Shannon TR, Wang F, Puglisi J, Weber C, Bers DM. A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocyte. Biophys J.

2004; 87: 3351-3371. https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047449 [published correction appears in Biophys J. 2012; 102:1996-2001].

[48] O'Hara T, Virág L, Varró A, Rudy Y. Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation. PLoS Comput Biol. 2011;7(5): e1002061. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002061.

ANALYSIS AND COMPARISON OF FIVE MATHEMATICAL MODELS THAT DESCRIBE MYOFILAMENT DYNAMICS DURING CONTRACTION OF VENTRICULAR MYOCYTES

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Matheus Leonardo Alves de Camargo[1], Daisuke Sato[2], José Wilson Magalhães Bassani[3], Rosana Almada Bassani[3], Robson Rodrigues da Silva[1,3]

[1]Research and Technology Center, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brazil
[2]Department of Phamacology, University of California, Davis, CA, Unites States of America
[3]LabNECC, Center for Biomedical Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: *matheus.leonardo675@gmail.com

ORCID's: 0000-0002-4071-8741; 0000-0001-9341-0970; 0000-0003-4202-6420; 0000-0002-6453-1359; 0000-0003-1082-0777

MODEL EQUATIONS AND PARAMETERS WITH AN INDICATION OF THE ADJUSTMENTS MADE

*adjusted variables for mouse in red

**added adjustment variables in blue

A - Negroni & Lascano (1996) Model

Total contraction force

$$F = F_b + F_p - \alpha \quad \text{(A1)}$$

Contraction force of the elastic parallel element

$$F_p = K * (L - L_0)^5 \quad \text{(A2)}$$

Cross-bridge elongation

$$\frac{dX}{dt} = B * (L - X - h_c) \quad \text{(A3)}$$

Transition rates

$$Q_b = Y_1 * [Ca^{2+}] * [T] - Z_1 * [TCa] \quad \text{(A4)}$$

$$Q_a = Y_2 * [TCa]_{eff} - Z_2 * [TCa^*] \quad \text{(A5)}$$

$$[TCa]_{eff} = [TCa] * e^{-R*(L-L_a)^2} \quad \text{(A6)}$$

$$Q_r = Y_3 * [TCa^*] - Z_3 * [T^*] * [Ca^{2+}] \quad \text{(A7)}$$

$$Q_d = Y_4 * [T^*] \quad \text{(A8)}$$

$$Q_{d1} = Y_4 * \left(\frac{dX}{dt}\right)^2 * [T^*] \quad \text{(A9)}$$

$$Q_{d2} = Y_d * \left(\frac{dX}{dt}\right)^2 * [TCa^*] \quad \text{(A10)}$$

Myofilament dynamics

$$\frac{d[TCa]}{dt} = Q_b - Q_a \quad \text{(A11)}$$

$$\frac{d[TCa^*]}{dt} = Q_a - Q_r - Q_{d2} \quad \text{(A12)}$$

$$\frac{d[T^*]}{dt} = Q_r - Q_d - Q_{d1} \quad \text{(A13)}$$

$$T = T_t - [TCa] - [TCa^*] - [T^*] \quad \text{(A14)}$$

Cross-bridge contraction force

$$F_b = A * ([TCa^*] + [T^*]) * (L - X) \quad \text{(A15)}$$

Parameters

Table 1

Description	Variable	Value	Adjusted value	Unit
Ca^{2+}-troponin C association rate	Y_1	0.039	0.1816	$\mu M*ms^{-1}$
Ca^{2+}-troponin C dissociation rate	Z_1	0.03	0.1397	ms^{-1}
Transition rate from TCa to TCa*	Y_2	0.0013	-	ms^{-1}
Transition rate from TCa* to TCa	Z_2	0.0013	-	ms^{-1}
Transition rate from TCa* to T*	Y_3	0.03	0.1397	ms^{-1}

Transition rate from T* to TCa*	Z_3	1.56	7.2626	$\mu M*ms^{-1}$
Transition rate from T*to T	Y_4	0.04	-	ms^{-1}
Sarcomere length-dependent transition rate to T	Y_d	9000	-	$ms^{-1}*\mu m^2$
Total number of troponin C Ca^{2+} binding sites	T_t	70	23	μM
Rate constant of cross-bridge elongation	B	1.2	0.5	ms^{-1}
Cross-bridge initial elongation	h_c	0.005	-	μm
Optimal intersection length of the cross-bridge	L_a	1.17	1.15	μm
Constant for defining TCa_{eff}	R	20	15	μm^{-2}
Constant of the cross-bridge contraction force	A	1800	-	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}*\mu M^{-1}$
Constant of the elastic parallel element contraction force	K	140000	-	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-5}$
Initial length of parallel element	L_0	0.97	-	μm
Adjustment for diastole	α	4.13	-	$mN*mm^{-2}$

B - Negroni & Lascano (2008) Model

Total contraction force

$$F_m = F_b + F_p \tag{B1}$$

Contraction force of the elastic parallel element

$$F_p = K_e * (L - L_0)^5 + L_e * (L - L_0) \tag{B2}$$

Cross-bridge elongation

$$\frac{dh_w}{dt} = -B * (h_w - h_{wr}) \tag{B3}$$

$$\frac{dh_p}{dt} = -B * (h_p - h_{pr}) \tag{B4}$$

Cross-bridge contraction force

$$F_b = A_w * ([TSCa_3\sim + TS\sim]) * h_w + A_p * ([TSCa_3{}^* + TS^*]) * h_p \tag{B5}$$

Myofilament dynamics

$$\frac{d[TSCa_3]}{dt} = Y_b * [TS] * [Ca^{2+}]_i^3 - Z_b * [TSCa_3] + g * [TSCa_3\sim] - f * [TSCa_3]_{eff} \tag{B6}$$

$$\frac{d[TSCa_3\sim]}{dt} = f * [TSCa_3]_{eff} - g * [TSCa_3\sim] + Z_p * [TSCa_3{}^*] - Y_p * [TSCa_3\sim] \tag{B7}$$

$$\frac{d[TSCa_3{}^*]}{dt} = Y_p * [TSCa_3\sim] - Z_p * [TSCa_3{}^*] + Z_r * [TS^*] * [Ca^{2+}]_i^3 - Y_r * [TSCa_3{}^*] \tag{B8}$$

$$\frac{d[TS^*]}{dt} = Y_r * [TSCa_3{}^*] - Z_r * [TS^*] * [Ca^{2+}]_i^3 + Z_q * [TS\sim] - Y_q * [TS^*] \quad \text{(B9)}$$

$$\frac{d[TS\sim]}{dt} = Y_q * [TS^*] - Z_q * [TS\sim] - g_d * [TS\sim] \quad \text{(B10)}$$

$$[TS] = [TS_t] - [TSCa_3] - [TSCa_3\sim] - [TSCa_3{}^*] - [TS^*] - [TS\sim] \quad \text{(B11)}$$

Transition rates

$$[TSCa_3]_{eff} = e^{-R(L-L_a)^2} * [TSCa_3] \quad \text{(B12)}$$

$$g = Z_a + Y_v * \left(1 - e^{-\gamma(h_w - h_{wr})^2}\right) \quad \text{(B13)}$$

$$g_d = Y_d + Y_c * (L - L_c)^2 + Y_{vd} * \left(1 - e^{-\gamma(h_w - h_{wr})^2}\right) \quad \text{(B14)}$$

Parameters

Table 2

Description	Variable	Value	Adjusted value	Unit
Constant of the cross-bridge contraction force in power state	A_p	2700	7500	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}*\mu M^{-1}$
Constant of the cross-bridge contraction force in weak state	A_w	540	1500	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}*\mu M^{-1}$
Constant rate of cross-bridge elongation	B	0.5	-	ms^{-1}
Constant for cross-bridge detachment in weak state	γ	28000	-	μm^{-2}
Transition rate from Ca^{2+}	f	0.0023	-	ms^{-1}

bound TS to the weak state				
Initial elongation of the cross-bridge in the strong state	h_{pr}	0.006	-	µm
Initial elongation of the cross-bridge in the weak state	h_{wr}	0.0001	-	µm
Force constant of the parallel element	K_e	105000	10.5	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-5}$
Initial length of parallel element	L_o	0.97	-	µm
Optimal intersection length of the cross-bridge	L_a	1.15	-	µm
Constant for defining the influence of sarcomere length on ~~the~~ g_d	L_c	1.2	-	µm
Force constant of the parallel element related only to the geometric part	L_e	10	0.1	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}$
Constant for defining $TSCa_{eff}$	R	15	-	μm^{-2}
Total number of troponin C Ca^{2+} binding sites	TS_t	23	-	µM
Ca^{2+}-troponin C association rate	Y_b	0.1816	-	$\mu M^{-3}*ms^{-1}$
Constant for defining g_d	Y_c	1	-	$ms^{-1}*\mu m^{-2}$
Constant for defining g_d	Y_d	0.0333	-	ms^{-1}

Rate constant of transition from TSCa~ to TSCa*	Y_p	0.1397	-	ms^{-1}
Transition rate from TS* to TS~	Y_q	0.2328	-	ms^{-1}
Transition rate from TSCa* to TS*	Y_r	0.1397	-	ms^{-1}
Constant for defining g	Y_v	1.5	-	ms^{-1}
Constant for defining g_d	Y_{vd}	1.5	-	ms^{-1}
Constant for defining g	Z_a	0.0023	-	ms^{-1}
Ca^{2+}-troponin C dissociation rate	Z_b	0.1397	-	ms^{-1}
Transition rate from TSCa* to TSCa~	Z_p	0.2095	-	ms^{-1}
Transition rate from TS~ to TS*	Z_q	0.3724	-	ms^{-1}
Transition rate from TS* to TSCa*	Z_r	7.2626	-	$ms^{-1}*\mu m^{-2}$

C – Negroni *et al.* (2015) Model

Total contraction force

$$F_m = F_b + F_p \tag{C1}$$

Contraction force of the elastic parallel element

$$F_p = K_e * (L - L_0)^5 + L_e * (L - L_0) \tag{C2}$$

Cross-bridge elongation

$$\frac{dh_w}{dt} = -B_w * (h_w - h_{wr}) \tag{C3}$$

$$\frac{dh_p}{dt} = -B_p * (h_p - h_{pr}) \tag{C4}$$

Cross-bridge contraction force

$$F_b = A_w * ([TSCa_3\sim]) * h_w + A_p * ([TSCa_3{}^* + TS^*]) * h_p \tag{C5}$$

Myofilament dynamics

$$\frac{d[TSCa_3]}{dt} = Y_b * [TS] * [Ca^{2+}]_i^3 - Z_b * [TSCa_3] + g * [TSCa_3\sim] - f * [TSCa_3] \tag{C6}$$

$$\frac{d[TSCa_3\sim]}{dt} = f * [TSCa_3] - g * [TSCa_3\sim] + Z_p * [TSCa_3{}^*] - Y_p * [TSCa_3\sim] \tag{C7}$$

$$\frac{d[TSCa_3{}^*]}{dt} = Y_p * [TSCa_3\sim] - Z_p * [TSCa_3{}^*] + Z_r * [TS^*] * [Ca^{2+}]_i^3 - Y_r * [TSCa_3{}^*] \tag{C8}$$

$$\frac{d[TS^*]}{dt} = Y_r * [TSCa_3{}^*] - Z_r * [TS^*] * [Ca^{2+}]_i^3 - g_d * [TS^*] \quad \text{(C9)}$$

$$[TS] = [TS_t] - [TSCa_3] - [TSCa_3{\sim}] - [TSCa_3{}^*] - [TS^*] \quad \text{(C10)}$$

Transition rates

$$f = Y_a * e^{-R_a(L-L_a)^2} \quad \text{(C11)}$$

$$g = Z_a + Y_h \quad \text{(C12)}$$

$$Y_h = F_h * Y_v * \left(1 - e^{-\gamma(h_w - h_{wr})^2}\right) \quad \text{(C13)}$$

$$F_h = 0.1\ para\ h_w > h_{wr}\ ou\ F_h = 1\ para\ h_w < h_{wr} \quad \text{(C14)}$$

$$g_d = Y_d * e^{-Y_c(L-L_c)} \quad \text{(C15)}$$

Parameters

Table 3

Description	Variable	Value	Adjusted value	Unit
Constant of the cross-bridge contraction force in power state	A_p	2700	7280	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}*\mu M^{-1}$
Constant of the cross-bridge contraction weak in power state	A_w	540	1456	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}*\mu M^{-1}$
Force constant of the parallel element	K_e	105000	10.5	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-5}$

Force constant of the parallel element related only to the geometric part	L_e	10	0.1	$mN*mm^{-2}*\mu m^{-1}$
Initial length of parallel element	L_o	0.97	-	μm
Total number of troponin C Ca^{2+} binding sites	TSt	23	-	μM
Ca^{2+}-troponin C association rate	Y_b	0.1816	-	$\mu M^{-3}*ms^{-1}$
Transition rate from TSCa* to TS*	Y_r	0.1397	-	ms^{-1}
Ca^{2+}-troponin C dissociation rate	Z_b	0.1397	-	ms^{-1}
Transition rate from TS* to TSCa*	Z_r	7.2626	-	$\mu M^{-3}*ms^{-1}$
Constant rate of cross-bridge elongation in weak state	B_w	0.35	-	ms^{-1}
Constant rate of cross-bridge elongation in power state	B_p	0.5	-	ms^{-1}
Initial elongation of the cross-bridge in the strong state	h_{pr}	0.006	-	μm
Initial elongation of the cross-bridge in the weak state	h_{wr}	0.0001	-	μm

Constant for cross-bridge detachment in weak state	γ	28000	-	μm^{-2}
Optimal intersection length of the cross-bridge	L_a	1.15	-	μm
Constant for defining the influence of sarcomere length on the g_d	L_c	1.05	-	μm
Constant for defining the effective zone for cross-bridge formation	R_a	20	15	μm^{-2}
Constant rate of transition from TSCa to TSCa~	Y_a	0.0023	-	ms^{-1}
Constant rate of transition from TS* to TS	Y_c	4	1	ms^{-1}
Constant rate of transition from TS* to TS	Y_d	0.028	0.0333	ms^{-1}
Constant rate of transition from TSCa~ to TSCa*	Y_p	0.1397	-	ms^{-1}
Constant rate of transition from TSCa~ to TSCa	Y_v	0.9	1.5	ms^{-1}
Constant rate of transition from TSCa~ to TSCa	Z_a	0.0023	-	ms^{-1}
Constant rate of transition from TSCa to TS	Z_p	0.2095	-	ms^{-1}

D – Rice *et al.* (1999) model as presented in Mullins & Bondarenko (2013)

Total contraction force

$$F_{contr} = -73.26 * F_{contrn} \tag{D1}$$

$$F_{contrn} = -\frac{P1 + N1 + 2 * (P2) + 3 * (P3)}{F_{max}} \tag{D2}$$

$$F_{max} = P1_{max} + 2 * (P2_{max}) + 3 * (P3_{max}) \tag{D3}$$

$$P1_{max} = \frac{f_{01} * (2 * g_{minxb}) * (3 * g_{minxb})}{\Sigma} \tag{D4}$$

$$P2_{max} = \frac{f_{01} * f_{12} * (3 * g_{minxb})}{\Sigma} \tag{D5}$$

$$P3_{max} = \frac{f_{01} * f_{12} * f_{23}}{\Sigma} \tag{D6}$$

$$\Sigma = (g_{minxb}) * (2 * g_{minxb}) * (3 * g_{minxb}) + f_{01} * (2 * g_{minxb}) * (3 * g_{minxb}) + f_{01} * f_{12} * (3 * g_{minxb}) + f_{01} * f_{12} * f_{23} \tag{D7}$$

Myofilament dynamics

$$\frac{dN0}{dt} = k_{PN} * P0 + g_{10SL} * N1 - k_{NP} * N0 \tag{D8}$$

$$\frac{dN1}{dt} = k_{PN} * P1 - (k_{NP} + g_{10SL}) * N1 \tag{D9}$$

$$\frac{dP0}{dt} = g_{10SL} * P1 + k_{NP} * N0 - (k_{PN} + f_{01}) * P0 \tag{D10}$$

$$\frac{dP1}{dt} = g_{21SL} * P2 + f_{01} * P0 + k_{NP} * N1 - (f_{12} + g_{10SL} + k_{PN}) * P1 \tag{D11}$$

$$\frac{dP2}{dt} = g_{32SL} * P3 + f_{12} * P1 - (f_{23} + g_{21SL}) * P2 \quad \text{(D12)}$$

$$\frac{dP3}{dt} = f_{23} * P2 - g_{32SL} * P3 \quad \text{(D13)}$$

Transition rates

$$f_{01} = 3 * f_{XB} \quad \text{(D14)}$$

$$f_{12} = 10 * f_{XB} \quad \text{(D15)}$$

$$f_{23} = 7 * f_{XB} \quad \text{(D16)}$$

$$g_{10SL} = g_{xbSL} \quad \text{(D17)}$$

$$g_{21SL} = 2 * g_{xbSL} \quad \text{(D18)}$$

$$g_{32SL} = 3 * g_{xbSL} \quad \text{(D19)}$$

$$g_{xbSL} = g_{minxb} * (2 - (SL_{norm})^{1.6}) \quad \text{(D20)}$$

$$SL_{norm} = \frac{SL - 1.3\mu m}{2.3\mu m - 1.3\mu m} \quad \text{(D21)}$$

$$SL = 0.8 * F_{contrn} + SL_0 \quad \text{(D22)}$$

$$k_{NP} = k_{PN} * \left(\frac{[LTRPNCa]}{[LTRPNCa]_{tot} * K_{half}}\right)^{Ntm} \quad \text{(D23)}$$

$$Ntm = 5 + 3 * SL_{norm} \quad \text{(D24)}$$

$$K_{half} = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_{Ca}}{1.5\mu M - SL_{norm} * 1.0\mu M}\right)} \quad \text{(D25)}$$

$$K_{Ca} = \frac{k_{ltrpn}^{-}}{k_{ltrpn}^{+}} \quad \text{(D26)}$$

Calcium buffering

$$\frac{d[LTRPNCa]}{dt} = k^{+}_{ltrpn} * [Ca^{2+}]_i * \{[LTRPNCa]_{tot} - [LTRPNCa]\} - k^{-}_{ltrpn} * [LTRPNCa] \quad \text{(D27)}$$

$$\frac{d[HTRPNCa]}{dt} = k^{+}_{htrpn} * [Ca^{2+}]_i * \{[HTRPNCa]_{tot} - [HTRPNCa]\} - k^{-}_{htrpn} * [HTRPNCa] \quad \text{(D28)}$$

Parameters

Table 4

Description	Variable	Value	Unit
Total concentration of low-affinity Ca^{2+} binding sites in troponin C	$[LTRPNCa]_{tot}$	70	µM
Total concentration of high-affinity Ca^{2+} binding sites in troponin C	$[HTRPNCa]_{tot}$	140	µM
Association rate at high-affinity troponin sites	k^{+}_{htrpn}	0.00237	$\mu M^{-1}*ms^{-1}$
Dissociation rate at high-affinity troponin sites	k^{-}_{htrpn}	$3.2*10^{-5}$	ms^{-1}
Association rate at low-affinity troponin sites	k^{+}_{ltrpn}	0.0327	$uM^{-1}*ms^{-1}$
Dissociation rate at low-affinity troponin sites	k^{-}_{ltrpn}	0.0196	ms^{-1}
Initial sarcomere length	SL_0	2.1	µm
Transition rate constant from permissive to non-permissive state	k_{PN}	0.045	ms^{-1}
Basic rate of transition between weak states and strong states of cross bridges	f_{XB}	0.1	ms^{-1}

Minimum rate of cross-bridge detachment	g_{minxb}	0.14	ms^{-1}

E - Rice *et al.* (2008) model

Sarcomere geometry

$$sovr_{ze}(x) = min\left(\frac{length_{thick}}{2}, \frac{x}{2}\right) \quad \text{(E1)}$$

$$sovr_{cle}(x) = max\left(\frac{x}{2} - (x - length_{thin}), \frac{length_{hbare}}{2}\right) \quad \text{(E2)}$$

$$length_{sovr}(x) = sovr_{ze}(x) - sovr_{cle}(x) \quad \text{(E3)}$$

$$SOVF_{thick}(x) = \frac{2 * length_{sovr}(x)}{length_{thick} - length_{hbare}} \quad \text{(E4)}$$

$$SOVF_{thin}(x) = \frac{length_{sovr}(x)}{length_{thin}} \quad \text{(E5)}$$

Calcium-Troponin C binding regulation

$$\frac{dCaTrop_H}{dt} = k_{onT} * [Ca] * (1 - CaTrop_H) - k_{offHT} * CaTrop_H \quad \text{(E6)}$$

$$\frac{dCaTrop_L}{dt} = k_{onT} * [Ca] * (1 - CaTrop_L) - k_{offLT} * CaTrop_L \quad \text{(E7)}$$

$$k_{onT} = k_{on} * Qk_{on}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E8)}$$

$$k_{offHT} = k_{offH} * koffmod_{species} * Qk_{off}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E9)}$$

$$k_{offLT} = k_{offL} * koffmod_{species} * Qk_{off}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E10)}$$

$$Trop_{Regulatory}(x) = \left(1 - SOVF_{thin}(x)\right) * \left(CaTrop_L + SOVF_{thin}(x)\right) * CaTrop_H \quad \text{(E11)}$$

$$permtot = \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{perm_{50}}{Trop_{Regulatory}(x)}\right)^{n_{perm}}}\right)^{0.5} \quad \text{(E12)}$$

$$inversepermtot = min\left(\frac{1}{permtot}, 100\right) \quad \text{(E13)}$$

Transition rates

$$k_{n_pT} = k_{n_p} * permtot * Qk_{n_p}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E14)}$$

$$k_{p_nT} = k_{p_n} * inversepermtot * Qk_{p_n}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E15)}$$

$$f_{appT} = f_{app} * xbmod_{species} * Qf_{app}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E16)}$$

$$g_{appT} = g_{app} * g_{app}slmod * xbmod_{species} * Qg_{app}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E17)}$$

$$g_{app}slmod = 1 + \left(1 - SOVF_{thick}(x)\right) * gslmod \quad \text{(E18)}$$

$$h_{fT} = h_f * h_f mod * xbmod_{species} * Qh_f^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E19)}$$

$$h_f mod = e^{-sign(xXB_{PreR}) * hfmdc * \left(\frac{xXB_{PreR}}{x_0}\right)^2} \quad \text{(E20)}$$

$$h_{bT} = h_b * xbmod_{species} * Qh_b^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E21)}$$

$$gxbmd = \begin{cases} e^{\sigma_p * \left(\frac{(x_0 - xXB_{PostR})}{x_0}\right)^2} & if\ xXB_{PostR} < x_0 \\ e^{\sigma_n * \left(\frac{(x_0 - xXB_{PostR})}{x_0}\right)^2} & if\ xXB_{PostR} \geq x_0 \end{cases} \quad \text{(E22)}$$

$$g_{xbT} = g_{xb} * gxbmd * xbmod_{species} * Qg_{xb}^{\left(\frac{(TmpC-37)}{10}\right)} \quad \text{(E23)}$$

Myofilament dynamics

$$\frac{d}{dt}N_{XB} = -k_{n_pT} * N_{XB} + k_{p_nT} * P_{XB} \quad \text{(E24)}$$

$$\frac{d}{dt}P_{XB} = k_{n_pT} * N_{XB} - \left(k_{p_nT} + f_{appT}\right) * P_{XB} + g_{appT} * XB_{PreR} + g_{xbT} * XB_{PostR} \quad \text{(E25)}$$

$$\frac{d}{dt}XB_{PreR} = f_{appT} * P_{XB} - \left(g_{appT} + h_{fT}\right) * XB_{PreR} + h_{bT} * XB_{PostR} \quad \text{(E26)}$$

$$\frac{d}{dt}XB_{PostR} = h_{fT} * XB_{PreR} - (h_{bT} + g_{xbT}) * XB_{PostR} \quad \text{(E27)}$$

Cross-bridge elongation

$$XB_{PreR}^{DutyFract} = \frac{f_{appT} * h_{bT} + f_{appT} * g_{xbT}}{g_{xbT} * h_{fT} + f_{appT} * h_{fT} + g_{appT} * h_{bT} + g_{appT} * g_{xbT} + f_{appT} * h_{bT} + f_{appT} * g_{xbT}} \quad \text{(E28)}$$

$$XB_{PostR}^{DutyFract} = \frac{f_{appT} * h_{fT}}{g_{xbT} * h_{fT} + f_{appT} * h_{fT} + g_{appT} * h_{bT} + g_{appT} * g_{xbT} + f_{appT} * h_{bT} + f_{appT} * g_{xbT}} \quad \text{(E29)}$$

$$\frac{d}{dt}xXB_{PreR} = \frac{1dSL}{2dt} + \frac{\phi}{XB_{PreR}^{DutyFract}} * \left[f_{appT} * (-xXB_{PreR}) + h_{bT} * (xXB_{PostR} - x_0 - xXB_{PreR})\right] \quad \text{(E30)}$$

$$\frac{d}{dt}xXB_{PostR} = \frac{1dSL}{2dt} + \frac{\phi}{XB_{PostR}^{DutyFract}} * \left[h_{fT} * (xXB_{PreR} + x_0 - xXB_{PostR})\right] \quad \text{(E31)}$$

Active force: Original and Adjusted

$$XB_{PreR}^{Max} = \frac{f_{app} * h_b + f_{app} * g_{xb}}{g_{xb} * h_f + f_{app} * h_f + g_{app} * h_b + g_{app} * g_{xb} + f_{app} * h_b + f_{app} * g_{xb}} \quad \text{(E32)}$$

$$XB_{PostR}^{Max} = \frac{f_{app} * h_f}{g_{xb} * h_f + f_{app} * h_f + g_{app} * h_b + g_{app} * g_{xb} + f_{app} * h_b + f_{app} * g_{xb}} \quad \text{(E33)}$$

Original

$$F_{active}(x) = SOVF_{thick}(x) * \frac{xXB_{PreR} * XB_{PreR} + xXB_{PostR} * xXB_{PostR}}{x_0 * XB_{PostR}^{Max}} \quad \text{(E34)}$$

Adjusted

$$F_{active} = \left(\alpha * \frac{xXB_{PostR} * xXB_{PostR}}{x_0 * XB_{PostR}^{Max}}\right) + \beta \quad \text{(E35)}$$

Parameters

Table 5

Description	Variable	Value	Adjusted value	Unit
Maximum sarcomere length	SL_{max}	2.4	-	µm

Minimum sarcomere length	SL_{min}	1.4	-	µm
Thick filament length	$length_{thick}$	1.65	-	µm
Length of the part of the thick filament without actin binding sites	$length_{hbare}$	0.1	-	µm
Thin filament length	$length_{thin}$	1.2	-	µm
Temperature	TmpC	15-37	25	ºC
Q10 for konT	Qk_{on}	1.5	-	dimensionless
Q10 for koffLT and koffHT	Qk_{off}	1.3	-	dimensionless
Q10 for kn_pT	Qk_{n_p}	1.6	-	dimensionless
Q10 for kp_nT	Qk_{p_n}	1.6	-	dimensionless
Q10 for fappT	Qf_{app}	6.25	-	dimensionless
Q10 for gappT	Qg_{app}	2.5	-	dimensionless
Q10 for hfT	Qh_f	6.25	-	dimensionless
Q10 for hbT	Qh_b	6.25	-	dimensionless
Q10 for gxbT	Qg_{xb}	6.25	-	dimensionless
Ca^{2+}-troponin C association rate for both low- and high-affinity sites	k_{on}	0.05	-	$\mu M^{-1}*ms^{-1}$

Ca^{2+}-troponin C dissociation rate for low-affinity sites	k_{offL}	0.25	-	ms^{-1}
Ca^{2+}-troponin C dissociation rate for high-affinity sites	k_{offH}	0.025	-	ms^{-1}
Half-activation constant	$perm_{50}$	0.5	-	dimensionless
Hill coefficient	n_{perm}	15	-	dimensionless
Constant rate of transition from N to P	k_{n_p}	0.05	-	ms^{-1}
Transition rate from P to N	k_{p_n}	0.5	-	ms^{-1}
Species-specific constant	$xbmod_{species}$	1	1.33	dimensionless
Species-specific constant	$koffmod_{species}$	1	1.18	dimensionless
Rate constant for cross-bridge formation	f_{app}	0.5	-	ms^{-1}
Transition rate for cross-bridges detachment	g_{app}	0.07	-	ms^{-1}
Thick filament adjustment constant	gslmod	6	-	dimensionless
Transition rate from PreR to PostR	h_f	2	-	ms^{-1}
Constant for isomerization in the PreR state	hfmdc	5	-	dimensionless
Transition rate from PostR to PreR	h_b	0.4	-	ms^{-1}
Transition rate from PostR to P	g_{xb}	0.07	-	ms^{-1}

Constant to set the effect of strain for contraction velocity	σ_p	8	-	dimensionless
Constant to set the effect of strain for lengthening velocity	σ_n	1	-	dimensionless
Mean distortion of the cross bridge after rotation	x_0	0.007	-	µm
Empirically obtained ~~model~~ parameter	ϕ	2	-	dimensionless
Parameter for amplitude adjustment	α	$1*10^{-6}$	-	dimensionless
Adjustment for diastole	β	0.1	-	dimensionless

APÊNDICE B: ARTIGO DA ATUALIZAÇÃO DO FORCELAB

ForceLAB simulator update: a study on the positive cooperativity of cross-bridge formation in ventricular myocyte

Matheus Leonardo Alves de Camargo[1][0000-0002-4071-8741], José Wilson Magalhães Bassani[2,3][0000-0003-4202-6420], Rosana Almada Bassani[2][0000-0002-6453-1359] and Robson Rodrigues da Silva[1,2][0000-0003-1082-0777]

[1] Research and Technology Center, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Brazil
[2] LabNECC/Center for Biomedical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil
[3] Department of Biomedical Engineering/School of Electrical and Computing Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil
matheus.leonardo675@gmail.com

Abstract. Cardiovascular diseases are one of the leading causes of death in the world. Understanding the mechanisms that control heart contraction is essential to deal with this problem. As auxiliary tools, mathematical models have been used to describe these phenomena at the cellular level. Electrical and mechanical models of ventricular myocytes have been implemented in computer simulators for analysis. One of them is ForceLAB, in which two of the main models of contraction force were implemented: Rice et al. (1999) (RWH) and Negroni & Lascano (2008) (NL). The objective of this paper is to present an updated version of the ForceLAB tool, to which additional features were added, among which the values of important variables, as one of the outputs. The new version of ForceLAB was implemented using App Designer for the development of the new interfaces. As an application, the influence of the positive crossbridge cooperativity on the unusual behavior of the Ca^{2+}-force relationship simulated with the RWH was tested. The waveforms of twitch transient of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$), developed force and the force vs. pCa curve (where pCa = -log $[Ca^{2+}]_i$) were simulated. The simulation results showed that the non-paralel shift of the force vs. pCa curve upon variation of myofilament Ca^{2+} was not corrected by the absence of the positive cooperativity mechanism did in the RWH model formulation.

Keywords: Mathematical Model, Contraction, Cardiac Myocyte, Crossbridge Cooperativity, *in silico* Experiments.

1 Introduction

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world. In 2019, they caused about 17.9 million deaths, accounting for 32% of global death count, 85% of which were from myocardial infarction and stroke [1].

APÊNDICE C: ARTIGO DO TESTE DO ACOPLAMENTO BIDIRECIONAL

Study on the effect of changing myofilament sensitivity to Ca^{2+} during twitches evoked using the Morotti model of cardiomyocyte electrophysiology

M.L.A. Camargo[1], G.G. Silva[1], J.W.M. Bassani[3], R.A. Bassani[3], D. Sato[2] and R.R. Silva[1,3]

[1] Research and Technology Center, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil
[2] Department of Pharmacology, University of California Davis, Davis, California, USA
[3] LabNECC, Center for Biomedical Engineering, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Abstract—**Mathematical modeling is a valuable tool to help understanding physiological phenomena, such as the cardiac contraction. Among these models, the electrophysiological model of mouse ventricular myocyte developed by Morotti et al. in 2014. In the present study, a more recent version of the electrophysiological model of Morotti model, in conjunction with the Negroni model, was used to investigate the impact of changes in the association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) rate constants of Ca^{2+} at troponin C (TnC) on the Ca^{2+} transients and the contraction force of the concurrent twitches. the sensitivity of the cardiomyocyte contractile apparatus to cytosolic Ca^{2+}. The timecourses of the cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and of contraction force evoked by an current pulse were simulated using basal k_{on} and k_{off} values obtained from the literature (control), as well as values modified by a factor of 3 (test). The relationship between tonic force and the negative logarithm of molar Ca^{2+} concentration (pCa) was also simulated under control and test conditions. Increase in twitch contraction force and reduced in Ca^{2+} transient amplitude and leftward shift in the force vs. pCa curve were observed by kinetic changes that increased TnC affinity for Ca^{2+}, while the opposite was seen for decreased affinity. It is concluded that the qualitative changes reduced resulting from alteration of the kinetics of TnC-Ca^{2+} interaction do not depend on the electrophysiological model used.**

Keywords— **Cardiac contraction, Ventricular myocyte, Mathematical modeling, Myofilaments, Calcium.**

I. Introduction

Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality worldwide [1], which has motivated a number of studies aiming at better understanding of the myocardial function. Ventricular myocytes are one of the main targets of experiments, as their contractile activity is the main determinant of the efficiency of cardiac blood pumping to circulation.

Mathematical and computational models have been used to predict and gain insight into several aspects of the cardiomyocyte function, such as electrical activity [e.g., 2-4], ionic balance and fluxes [e.g, 5,6], contractile activity (e.g., [7-9].

Mathematical models for ventricular myocyte function are based on experimental data obtained from preparations of different animal species.

One of the most used species in such experiments is the mouse, which ensures a large amount of information to be used in model development. An important model of mouse ventricular myocytes was developed by Morotti and collaborators, applied initially to the study of the relationship between intracellular Na^+ concentration and Ca^{2+}-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) activation in the genesis of arrhythmias [10]. This model was later used in combination with the contraction model of Negroni et al. [7] to investigate signaling microdomains by Surdo et al. [11]. Such a combination allows a quite comprehensive simulation of the cell functional aspects, including action potential, major ion currents, Ca2+ dynamics, myofilament activation and development of contraction, which allows reproducing conditions related to regulatory signaling and pathophysiological states.

For cardiac contraction to occur, Ca^{2+} ions must interact with to the divalent cation binding sites on the troponin C (TnC) present in the thin filament of myofibrils [12]. This interaction results in a conformational change of the troponin complex and tropomyosin, which exposes the myosin-binding site of acting, allowing the attachment of the myosin heads (crossbridges) with actin. In addition to determining the developed contraction force/cell shortening, the binding of Ca^{2+} to TnC also affects intracellular Ca2+ concentration ($[Ca^{2+}]i$), shaping the Ca^{2+} transient, as it is, along with calmodulin, one of the major intracellular passive Ca^{2+} buffers [13].

Ca^{2+} interaction with TnC is governed by the rate constant of association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) of the ion at its TnC binding site. These constants define the equilibrium constant (k_d), which is the ratio of k_{off} and k_{on}, and corresponds to the $[Ca^{2+}]$ at which 50% of the TnC sites are occupied by Ca^{2+}. Changes in k_d can occur under physiological (e.g., temperature, pH) and pathological conditions (e.g., mutations in myofilament proteins), altering the sensitivity of myofilaments to Ca^{2+} [14]. Simulating such changes with mathematical models for cardiac cells allows to their predict impact on cell function, and also to test how well the model can reproduce

APÊNDICE D: ARTIGO DE APRESENTAÇÃO DO NOVO MODELO

A COMPUTATIONAL MODEL FOR TEMPERATURE EFFECTS ON MYOFILAMENT DYNAMICS IN RODENT VENTRICULAR MYOCYTES

Matheus Leonardo Alves de Camargo[1*], Daisuke Sato[2], José Wilson Magalhães Bassani[3], Rosana Almada Bassani[3], Robson Rodrigues da Silva[1,3]

[1]Research and Technology Center, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brazil
[2]Department of Pharmacology, University of California, Davis, CA, Unites States of America
[3]LabNECC, Center for Biomedical Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: *matheus.leonardo675@gmail.com

ORCID's: 0000-0002-4071-8741; 0000-0001-9341-0970; 0000-0003-4202-6420; 0000-0002-6453-1359; 0000-0003-1082-0777

Acknowledgments: This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES; finance code 88887.627770/2021-00 and 88881.846611/2023-01), São Paulo Research Foundation (FAPESP; grant 2016/18422-7), Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant # 30400/2016-2), the Brazilian Ministry of Health/ FINEP (Conv. 0113021400, ref. 0441/12) and the University of Mogi das Cruzes.

ABSTRACT

Purpose: Cardiac muscle relaxation is influenced by both the removal of calcium (Ca^{2+}) from the cytosol and the deactivation of actin-myosin cross-bridges in the myofilaments. The predominance of these mechanisms varies with temperature. At subphysiological temperatures, Ca^{2+} removal is the primary limiting factor, whereas at physiological temperatures, myofilament kinetics plays a determining role. **Methods:** To investigate this dynamic, a new myofilament kinetics model coupled with an electrical model of ventricular myocytes from rodents was calibrated using experimental data. The new model incorporates the Q_{10} coefficient into the seven parameters that determine the transition rates between myofilament kinetic states, allowing contractile force simulation at different temperatures. **Results:** The new model successfully replicated the nonlinear behavior of developed force. For temperatures ranging from 22.5°C to 32.5°C, the generated force varied between 50.36 mN/mm² and 56.20 mN/mm², in agreement with the experimental data reported by Janssen *et al.*, which ranged from 51.69 mN/mm² to 54.53 mN/mm². At physiological temperature (37.5°C), a reduction in developed force was observed, with the new model yielding a value of 21.29 mN/mm², close to the experimental value of 21.57 mN/mm². The use of a population simulation method demonstrated qualitatively similar behavior to experimental observations. Finally, the model reproduced the relationship between temperature and myofilament Ca^{2+} sensitivity, as reported experimentally. **Conclusion:** The newly developed computational model effectively simulates the influence of temperature on myofilament dynamics in ventricular myocytes of rodents, incorporating the interactions between calcium, force, and temperature.

Keywords: Cardiac contraction, Mathematical modeling, Myofilaments, Temperature, Cardiac relaxation.

INTRODUCTION

Cardiac muscle relaxation is a complex process regulated by two main mechanisms: the removal of calcium ions (Ca^{2+}) from the cytosol and the dissociation of actin-myosin cross-bridges in the myofilaments [1, 2]. The predominance of one of these mechanisms as the limiting factor for relaxation depends on temperature, altering the dynamics of this process under subphysiological and physiological conditions [3].

At subphysiological temperatures (e.g., 22.5°C), the removal of Ca^{2+} from the cytosol ($[Ca^{2+}]_i$) is the primary limiting factor. Following contraction, Ca^{2+} is reabsorbed by the sarcoplasmic reticulum (SR) via the SERCA pump and extruded into the extracellular environment by the Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX). However, the efficiency of these mechanisms decreases at low temperatures, prolonging Ca^{2+} binding to troponin C (TnC) and delaying myofilament deactivation [3, 4].

At physiological temperature (37.5°C), as in rats and other mammals, Ca^{2+} removal occurs significantly faster due to increased SERCA and NCX activity. Under this condition, Ca^{2+} dissociation from TnC is no longer the limiting factor for relaxation. Instead, the limitation shifts to the detachment kinetics of actin-myosin cross-bridges, which occur at a relatively slower rate than Ca^{2+} removal [5].

Janssen *et al.* [6] demonstrated this transition in the limiting factor for relaxation by analyzing different temperatures. At 22.5°C to 30°C, the time to reach 50% relaxation (RT_{50}) is prolonged due to the slow removal of Ca^{2+}. At 37.5°C, RT_{50} is reduced, but phase-plane analysis (force vs. Ca^{2+}) indicates that even with low $[Ca^{2+}]_i$ levels, muscle relaxation does not occur immediately, highlighting the limiting role of myofilament kinetics. Thus, experimental data indicate that: (a) at low temperatures (22.5°C and 30°C), relaxation is primarily limited by Ca^{2+} removal; (b) at physiological temperature (37.5°C), cross-bridge dissociation becomes the main limiting factor.

To mathematically describe these differences in cardiac relaxation, various computational models have been developed. The myofilament dynamics model

proposed by Negroni *et al.* [7] (N15) has been widely used to represent cellular mechanics in bidirectional couplings with electrical models.

In the original study, N15 was integrated into the Soltis-Saucerman model [8] for rabbit ventricular myocytes, including β-adrenergic signaling. Subsequently, Muangkram *et al.* [9] used this model to investigate ATP consumption during excitation-contraction coupling in mammals. Furthermore, Surdo *et al.* [10] coupled it to an electrical model of mouse ventricular myocytes, providing insights into compartmentalized signaling (cAMP/PKA) in cardiac contraction.

Silva *et al.* [11] compared an earlier version of the N15 model [12]—which retains most features of the current model—with the Rice *et al.* model [13], both coupled to the Mullins-Bondarenko [14] electrophysiological model for mouse ventricular myocytes. The results demonstrated that the Negroni model [12] reproduced experimental data with greater accuracy and a better fit to experimental observations compared to the Rice model [13], indicating a more precise representation of myofilament dynamics under the analyzed conditions. However, despite its good performance in previous tests, the Negroni model [12] lacks parameters or equations to account for the influence of temperature on myofilament dynamics.

In their 2008 study, Rice *et al.* [15] introduced a myofilament dynamics model incorporating the Q_{10} coefficient in the transition rate equations between cross-bridge states. The Q_{10} coefficient is a constant that describes the sensitivity of biochemical and physiological reaction rates to temperature. Specifically, it indicates how much a biological process accelerates or decelerates with a 10°C increase in temperature [16]. The model developed by Rice *et al.* [15], based on this formulation, successfully reproduced the experimental data of De Tombe & Stienen [17] in rat muscle at different subphysiological temperatures. Additionally, when coupled to a rabbit electrical model, it was able to simulate isometric force at physiological temperature (37°C). However, systematic validations evaluating isometric force at different temperatures, as conducted by Janssen *et al.* [6], were not performed.

Thus, this study proposes the development of a new computational model to reproduce isometric force twitches at different temperatures, in accordance with the experimental data of Janssen *et al.* [6]. The distinguishing feature of this model lies in the explicit incorporation of temperature influence on myofilament dynamics, an aspect not directly addressed in previous approaches. For this purpose, the N15 model [7] was selected as the base model, coupled with the ventricular myocyte model of Morotti *et al.* [18], chosen based on the tests conducted by Silva *et al.* [11]. The implementation of thermal influence was carried out using the Q_{10} coefficient and adjustments to the parameters of relaxation and force development.

MATERIALS E METHODS

Negroni *et al.* Model (2015)

The mathematical model employed in this study was the N15, which describes the dynamics of myofilaments based on five distinct states of the Troponin System (TS): (a) Ca^{2+}-free binding state (TS); (b) Ca^{2+}-bound state (TSCa); (c) weak cross-bridge formation state bound to Ca^{2+} (TSCa~); (d) strong cross-bridge formation state bound to Ca^{2+} (TSCa*); and (e) strong cross-bridge formation state in the absence of Ca^{2+} binding. The model is based on the cooperativity of Ca^{2+} binding sites in troponin, considering that each TS consists of a regulatory unit (RU) containing three Ca^{2+} binding sites. The binding of Ca^{2+} to one site promotes binding at adjacent sites. To simplify this phenomenon, it is assumed that each TS is always saturated by three Ca^{2+} ions.

The previously described states are represented in the model through coupled differential equations, which are parameterized by the transition rates illustrated in the diagram in Figure 1.

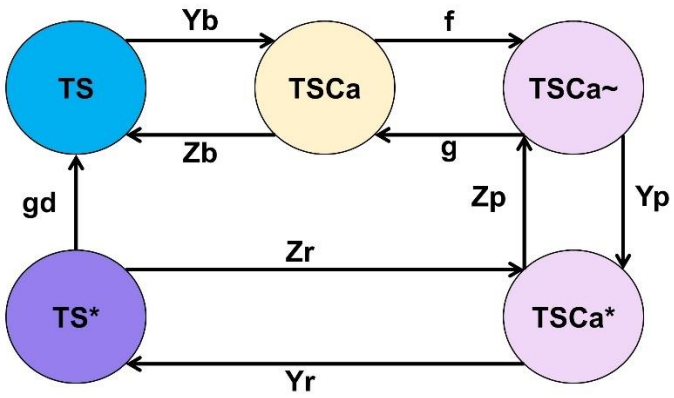


Figure 1. Myofilament state diagram and transition rates used to calculate contraction force in the N15 model.

The states associated with cross-bridge formation determine the contractile force, as specified in Equation 1.

$$F_b = A_w * ([TSCa_3\sim]) * h_w + A_p * ([TSCa_3{}^* + TS^*]) * h_p \quad (1)$$

Where A_w and A_p are constants related to the number of cross-bridges in the weak and strong states, respectively, and h_w and h_p indicate the average elongation of the cross-bridges in these states.

The model described in the original article was integrated into the Soltis-Saucermann model [8], developed for ventricular myocytes of rabbits, which represents the ionic currents responsible for generating the action potential (AP), $[Ca^{2+}]_i$, and beta-adrenergic signaling. In the present study, the model of Morotti *et al.* [18] was chosen as a stimulus for the mechanical model, as it is based on mice, providing greater compatibility with the experimental rat data reported by Janssen *et al.* [6].

To ensure the model's calibration to different temperature ranges, adjustments were made to fundamental parameters. The A_p constant was adapted for three specific temperature ranges (Table 1), allowing better calibration of the model to thermal variations. The A_w parameter, whose formulation already followed the relation $A_w = A_p / 5$, remained unchanged.

Table 1. Additional adjustments to the N15 model: adaptations to the parameter responsible for amplitude changes in force calculation by temperature range.

Parameter	Original Value	Adjusted Value	Temperature	Unit
A_p	$1008*10^4$	$1144.08*10^5$	22.5°C – 30°C	$mN/mm^2/\mu m/mM$
		$1209.6*10^5$	30°C – 35°C	$mN/mm^2/\mu m/mM$
		$7056*10^4$	35 °C – 37.5°C	$mN/mm^2/\mu m/mM$

Temperature Adjustment Factor

In mathematical models of ventricular myocytes, the Q_{10} factor adjusts reaction parameters or ion fluxes that are temperature-dependent. The typical Q_{10} value for biological processes generally ranges between 2 and 3, meaning that, on average, a biochemical reaction tends to double or triple its rate with a 10°C increase [3].

To adjust the transition rates of the myofilament dynamics in the N15 model, the following Equation 2 was used:

$$F_T = Q_{10}^{\left(\frac{T-T_{REF}}{10}\right)} \quad (2)$$

Where T represents the temperature variable and T_{REF} is the reference temperature in °C. In the model, T_{REF} = 37.5°C was adopted [6].

This exponential adjustment allows the model to better reflect ventricular myocyte physiology by simulating how temperature-dependent processes (such as ion transport and the Ca^{2+} cycle) change as a function of temperature. This approach is common in cellular electrophysiology models since enzymatic rates and ion fluxes in the heart are highly sensitive to temperature variations.

Reformulating the expression with a division by 10 in the exponent allows the model to represent temperature-dependent rates as a continuous function of temperature, rather than restricting them to fixed 10°C intervals. This is important

for model accuracy under experimental and physiological conditions. Thus, if $T - T_{REF} = 10$, the exponent will be 1, directly applying the Q_{10} factor. If $T - T_{REF} = 20$, the exponent will be 2, applying $(Q_{10})^2$.

In this study, the Q_{10} coefficient was applied to parameters related to myofilament dynamics (Table 2), following the approach used in the Rice *et al.* model [15], which already incorporates this type of thermal adjustment. To achieve this, a correspondence was established between the parameters of the Rice *et al.* model [15] and those present in the N15 model, followed by empirical adjustments to calibrate the new model.

Table 2. Myofilament parameters and constants used for temperature adjustment with their respective Q_{10} values.

Transition Parameters	Equation	Constant	Value	Unit	Q_{10}	Value
Yb	-	Yb	0.1816 •	$\mu M^{-3}ms^{-1}$	Q_{kon}	1.5♦
Zb	-	Zb	0.1397 •	ms^{-1}	Q_{koff}	1.3♦
f	$f = Ya * e^{-Ra*(L-La)^2}$	Ya	0.0023 •	ms^{-1}	Q_{fapp}	2.5*
g	$g = Za + Yh$	Za	0.0161 *	ms^{-1}	Q_{gapp}	2.5♦
Yp	-	Yp	0.1397 •	ms^{-1}	Q_{hf}	2.5*
Zp	-	Zp	0.2095 •	ms^{-1}	Q_{hb}	2.5*
gd	$gd = Yd * e^{-Yc*(L-Lc)}$	Yd	0.196*	ms^{-1}	Q_{gxb}	2.5*

* Adjusted Values ♦ Rice *et al.* (2008) • Negroni *et al.* (2015)

Simulation Protocols

The simulations performed for force twitch analysis were conducted using protocols adjusted to ensure the accuracy and stability of simulated variables. The applied stimulus current was 9.5 pA/pF, following the standard of the Morotti *et al.* model [18], ensuring consistency with the originally defined parameters. The stimulation frequency was maintained at 0.5 Hz, according to the protocol described by Janssen *et al.* [6], and the total simulation time was set to 120 seconds, which was considered sufficient to allow complete stabilization of physiological variables.

Simulations were conducted for different temperatures, covering values of 22.5°C, 25°C, 27.5°C, 30°C, 32.5°C, 35°C, and 37.5°C, reproducing the thermal conditions employed in the original experiment by Janssen *et al.* [6]. This protocol was designed to comprehensively evaluate the impact of temperature on muscle contraction and relaxation dynamics. Based on the protocol described above, three tests were conducted:

Test 1 - Single Twitch Simulation: Contraction twitches were simulated using the reference parameters of the new model for each temperature analyzed in the study by Janssen *et al.* [6], allowing comparison with experimental data and the model under control conditions. The values collected included diastolic force (F_{dia}), maximum force (F_{dev}), amplitude (ΔF), time to peak (t_{peak}), and time to 50% relaxation after peak (RT_{50}).

Test 2 - Simulation with Sample Size (n): Based on the method described by Sobie *et al.* [19], 10 simulations were performed for each of the 7 temperatures, where 21 parameters of the Morotti *et al.* model [18] were randomly altered following a lognormal distribution. This type of simulation is used to approximate the data that would be obtained experimentally. The sample size adopted in this study was n = 10, in accordance with Janssen *et al.* [6]. To define the lognormal distribution interval, the parameter σ must be specified, whose increase results in greater dispersion of the factors multiplying the parameters. For this study, σ =

0.01 was adopted. The complete methodology is detailed in the article by Sobie *et al.* [19]. The parameters used in the analysis (Table 3), which were subjected to perturbations, were the same as those employed in the study by Morotti *et al.* [20]. During the simulations, mean values of F_{dia}, F_{dev}, ΔF, t_{peak}, and RT_{50} were collected.

Table 3. Definition of Morotti *et al.* (2014) model parameters varied to build the populations of models.

Parameter	Description	Value	Unit
G_{Na}	Max conductance of fast Na^+ current (I_{Na})	10	mS/pF
G_{NaL}	Max conductance of late Na^+ current (I_{NaL})	0.013	mS/pF
G_{NaB}	Max conductance of background Na^+ current (I_{NaB})	0.0014	mS/pF
V_{NKA}	Max velocity of Na^+/K^+ ATPase current (I_{NaK})	5	µA/µF
G_{tof}	Max conductance of transient outward K^+ current (I_{tof})	0.44	mS/pF
G_{Kr}	Max conductance of rapid delayed rectifying K^+ current (I_{Ks})	0.03	mS/pF
$G_{K,slow1}$	Max conductance of ultra-rapidly activating and slowly inactivating K^+ current, 4-AP	0.176	mS/pF

	sensitive component ($I_{K,slow1}$)		
$G_{K,slow2}$	Max conductance of ultra-rapidly activating and slowly inactivating K^+ current, TEA sensitive component ($I_{K,slow2}$)	0.14	mS/pF
G_{ss}	Max conductance of non inactivating steady-state K^+ current (I_{ss})	0.15	mS/pF
G_{Kp}	Max conductance of plateau K^+ current (I_{Kp})	0.001	mS/pF
G_{K1}	Max conductance of inwardly rectifying K^+ current (I_{K1})	0.3	mS/pF
G_{ClCa}	Max conductance of Ca^{2+}-activated Cl^- current (I_{ClCa})	0.109625	mS/pF
G_{ClB}	Max conductance of background Cl^- current (I_{ClB})	0.009	mS/pF
G_{CaL}	Max conductance of L-type Ca^{2+} current (I_{CaL})	1.65	mS/pF
G_{CaB}	Max conductance of background Ca^{2+} current (I_{CaB})	0.00075	mS/pF

V_{NCX}	Max velocity of Na^+/Ca^{2+} exchanger current (I_{NCX})	1.5	µA/µF
V_{PMCA}	Max velocity of plasma membrane Ca^{2+} ATPase current (I_{PMCA})	0.0673	µA/µF
V_{SERCA}	Max velocity of sarcoplasmatic reticulum Ca^{2+} ATPase flux (J_{up})	0.00038	mM/ms
V_{Rel}	Max velocity of ryanodine receptor Ca^{2+} flux (J_{Rel})	25	1/ms
V_{Leak}	Max velocity of ryanodine receptor Ca^{2+} leak (J_{Leak})	0.000011	1/ms

Test 3 - Force vs. pCa Curve Simulation: The force vs. pCa test consists of fixing $[Ca^{2+}]_i$ at a specific value, followed by evaluating the maximum contraction force generated by the myocyte. $[Ca^{2+}]_i$ is expressed in terms of pCa, defined as the negative logarithm of $[Ca^{2+}]_i$. This assay is used to determine the sensitivity of myofilaments to Ca^{2+}. Simulations were conducted for pCa values ranging from 5.0 to 7.0, in increments of 0.1. The simulated temperatures were 22.5°C, 27.5°C, 32.5°C, and 37.5°C. The relationship between force and pCa was modeled using a sigmoidal function, described by Equation 3 [21]:

$$F = \frac{F_{max}}{1 + 10^{(pCa - pCa_{50}).n_H}} \quad (3)$$

Where F_{max} is the maximum force, pCa_{50} is the pCa value at which force is half-maximal, and n_H is the Hill coefficient of the curve. The values of pCa_{50} and the Hill coefficient were collected as curve parameters. Additionally, the force vs. $[Ca^{2+}]_i$ curve was constructed for the previously described pCa values, without normalizing the force by the maximum value.

Simulation Setup

The models were implemented in MATLAB R2019a and solved using the ode15s function. Simulations were performed on a desktop computer (Dell, OptiPlex 7050) running Windows 10 (64-bit) with a Dual Core Intel® Core™ i7 processor (CPU 7700, 3.60 GHz).

RESULTS

Effect of Temperature on the New Contraction Model

The new model was simulated at seven different temperatures, corresponding to those used in the experiments by Janssen *et al.* [6]. The isometric contraction twitches simulated with and without the model adjustment, compared to the experimental data from Janssen *et al.* [6], are illustrated in Figure 2. Figure 3 presents the experimental and simulated values of F_{dev} and RT_{50}, normalized concerning the maximum value. The experimental data for F_{dev} and RT_{50} correspond to the average results obtained in the tests conducted by Janssen *et al.* [6].

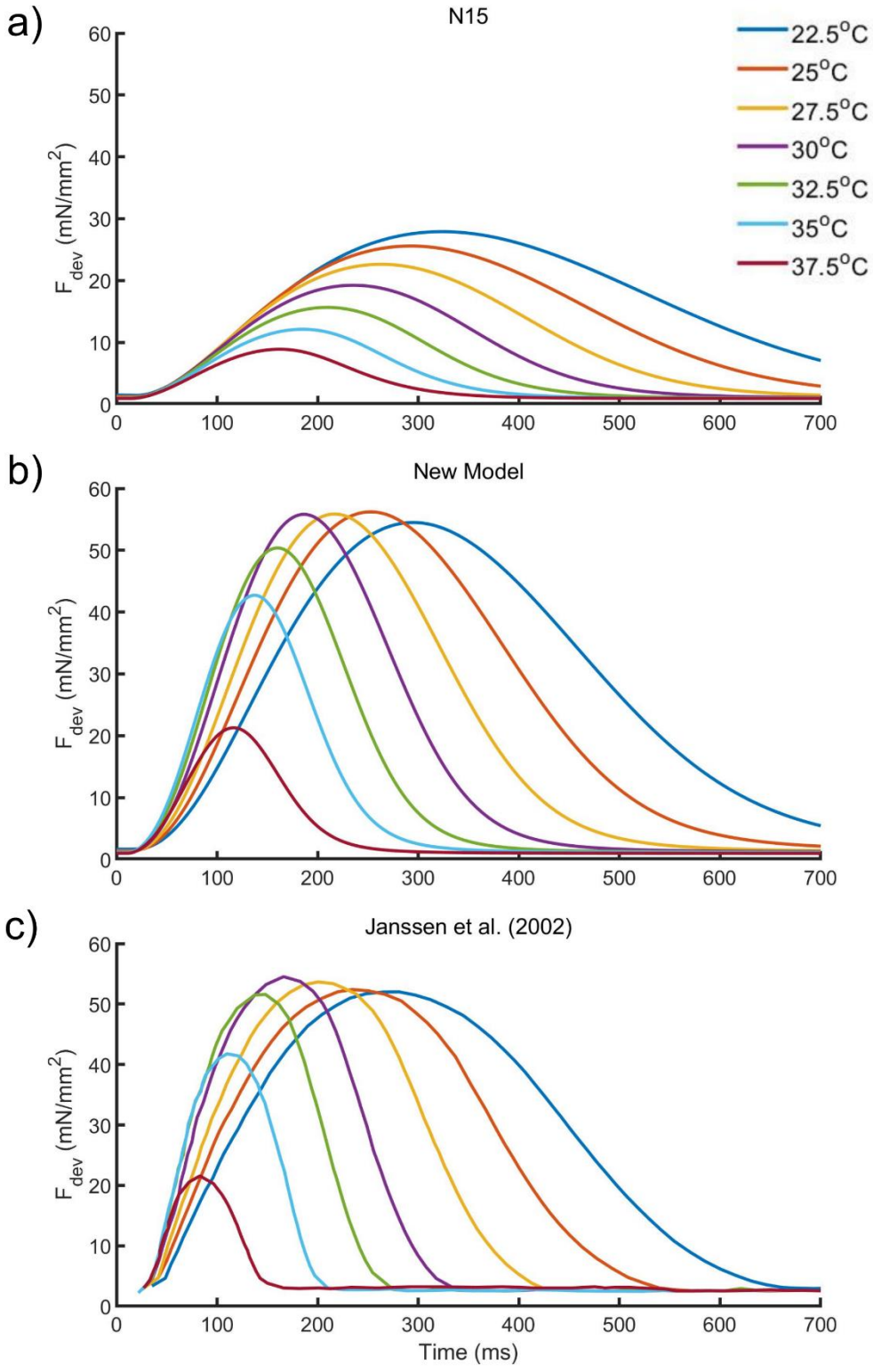


Figure 2. a) Simulation of twitches using N15 at different temperatures, considering a stimulation frequency of 0.5 Hz. b) Simulation results for the new model under the same protocol. c) Experimental data obtained by Janssen *et al.* [6].

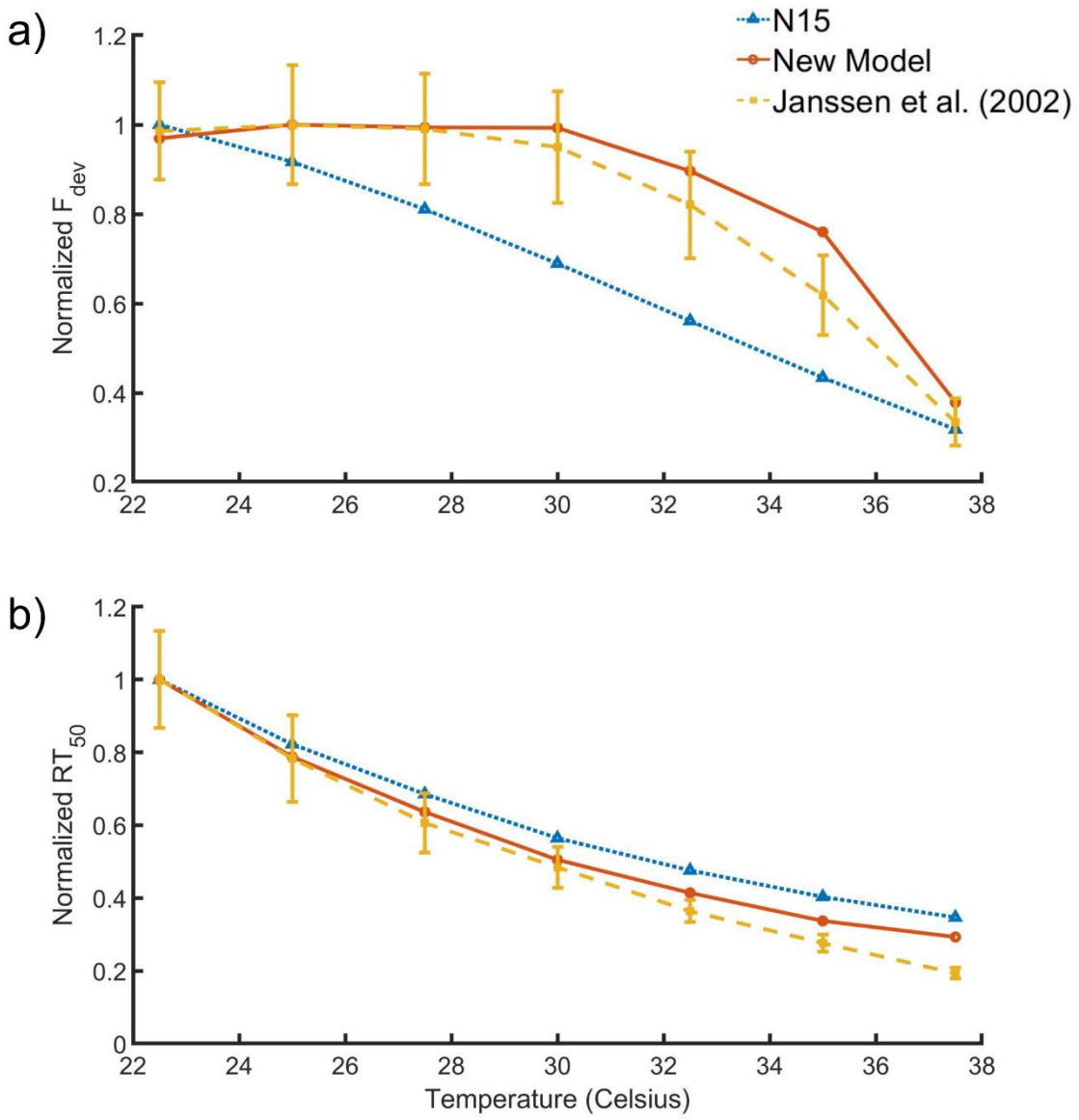


Figure 3. a) Comparison of developed force (F_{dev}) between the N15 simulation, the new model, and the experimental data. b) Same comparison for relaxation time (RT_{50}).

Figure 4 shows the comparison between the twitches generated for each temperature by the N15 model, the new model, and the experimental data from Janssen *et al.* [6]. This analysis facilitates visualizing the model's performance under different thermal conditions. The quantitative data from this test are presented in Table 4.

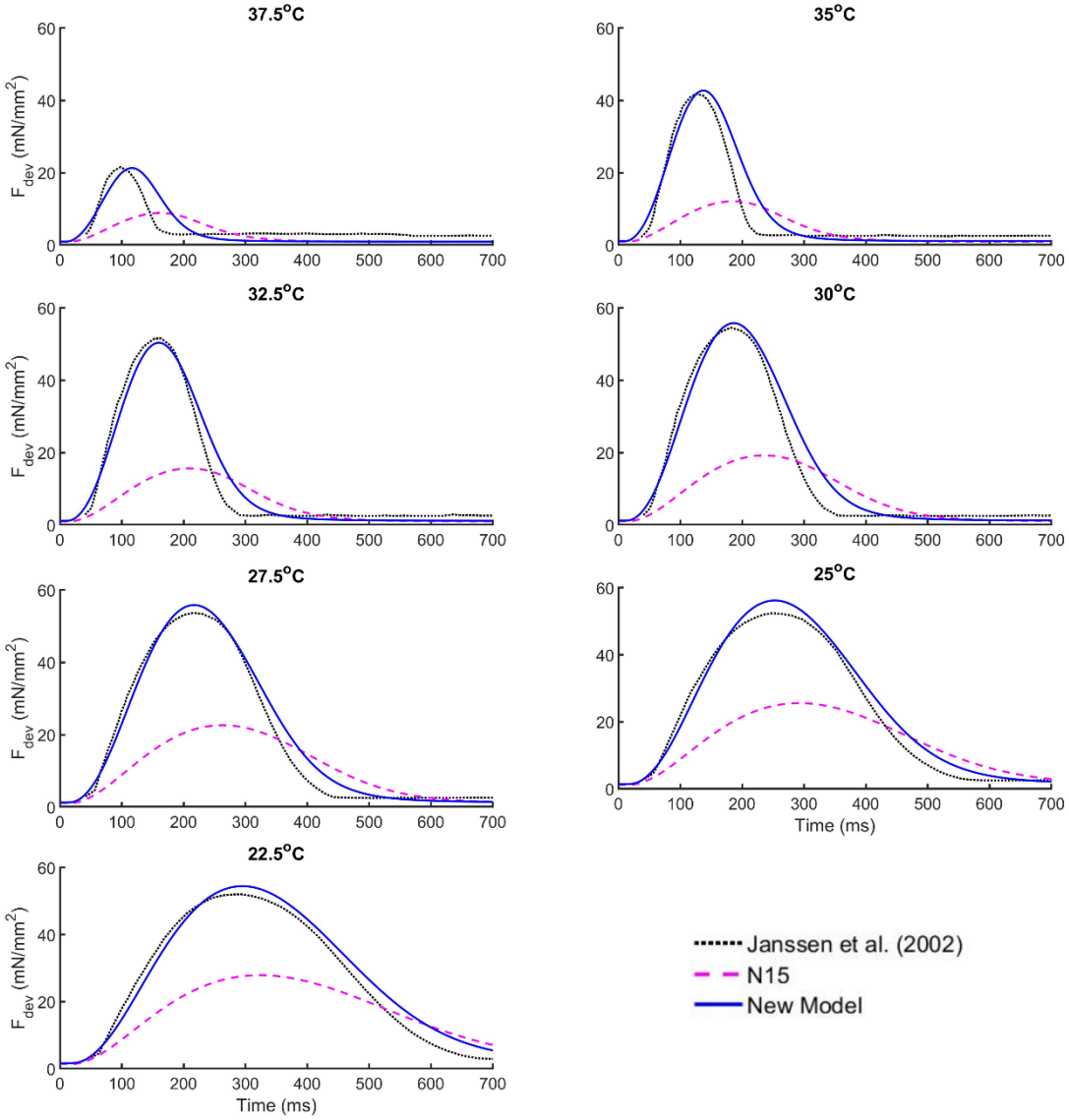


Figure 4. Isolated contraction twitches simulated for each temperature (37.5°C, 35°C, 32.5°C, 30°C, 27.5°C, 25°C, and 22.5°C), considering the N15 model, the new model, and the experimental data.

Table 4. Quantitative data from the simulations and experiments illustrated in Figure 4.

Temperature °C	Condition	F_{dia} (mN/mm^2)	F_{dev} (mN/mm^2)	ΔF (mN/mm^2)	t_{peak} (ms)	RT_{50} (ms)
22.5	N15	1.46	27.90	26.46	323.59	248.00
	New Model	1.64	54.48	52.84	294.71	198.00
	Experiment	2.40	52.05	49.67	290.10	186.10
25	N15	1.21	25.58	24.36	292.38	204.00
	New Model	1.40	56.20	54.80	253.59	156.00
	Experiment	2.51	52.40	49.89	230.90	147.90
27.5	N15	1.10	22.62	21.53	262.03	170.00
	New Model	1.26	55.89	54.63	216.99	126.00
	Experiment	2.02	53.66	51.64	218.10	110.90
30	N15	1.02	19.24	18.21	234.78	140.00
	New Model	1.20	55.80	54.60	186.03	100.00
	Experiment	2.46	54.53	52.08	182.40	83.70
32.5	N15	0.98	15.65	14.68	209.11	118.00

	New Model	1.14	50.36	49.22	159.11	82.00
	Experiment	2.43	51.69	49.25	159.10	64.80
35	N15	0.94	12.12	11.18	184.72	100.00
	New Model	1.11	42.71	41.60	136.41	66.76
	Experiment	2.43	41.81	39.37	127.60	54.70
37.5	N15	0.92	8.88	7.97	161.56	86.00
	New Model	0.98	21.29	20.31	115.51	58.00
	Experiment	2.46	21.57	19.11	96.80	41.20

Simulation of Contraction Twitches with Random Alteration of Biophysical Parameters

Applying the protocol described in Test 2 resulted in the contraction twitches illustrated in Figure 5. The average results for F_{dev} and RT_{50}, compared to the experimental data from Janssen *et al.* [6], are shown in Figure 6.

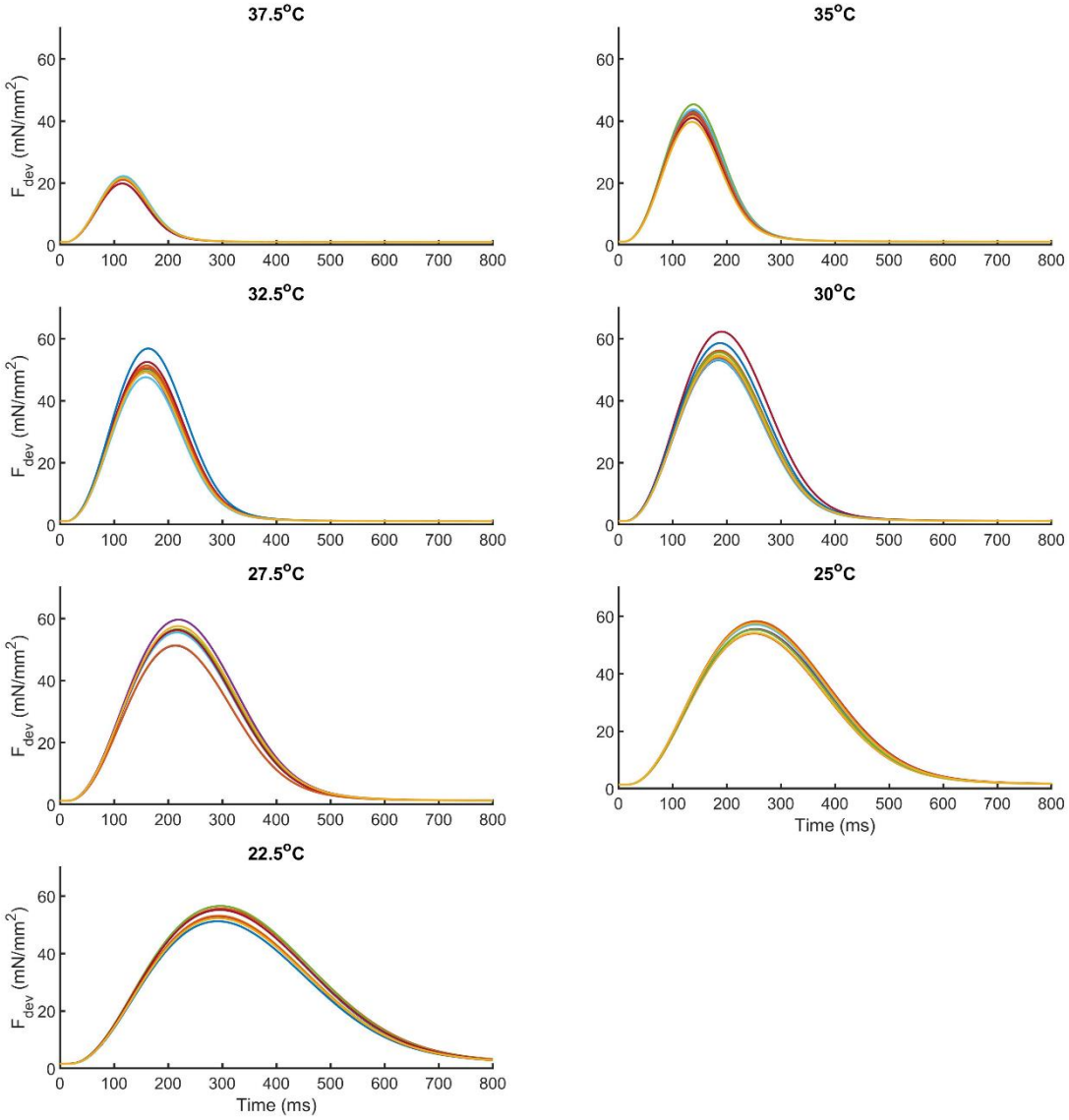


Figure 5. Contraction twitches resulting from the application of the model population-based simulation protocol in the new model. Isolated twitches for each temperature (n = 10) are illustrated.

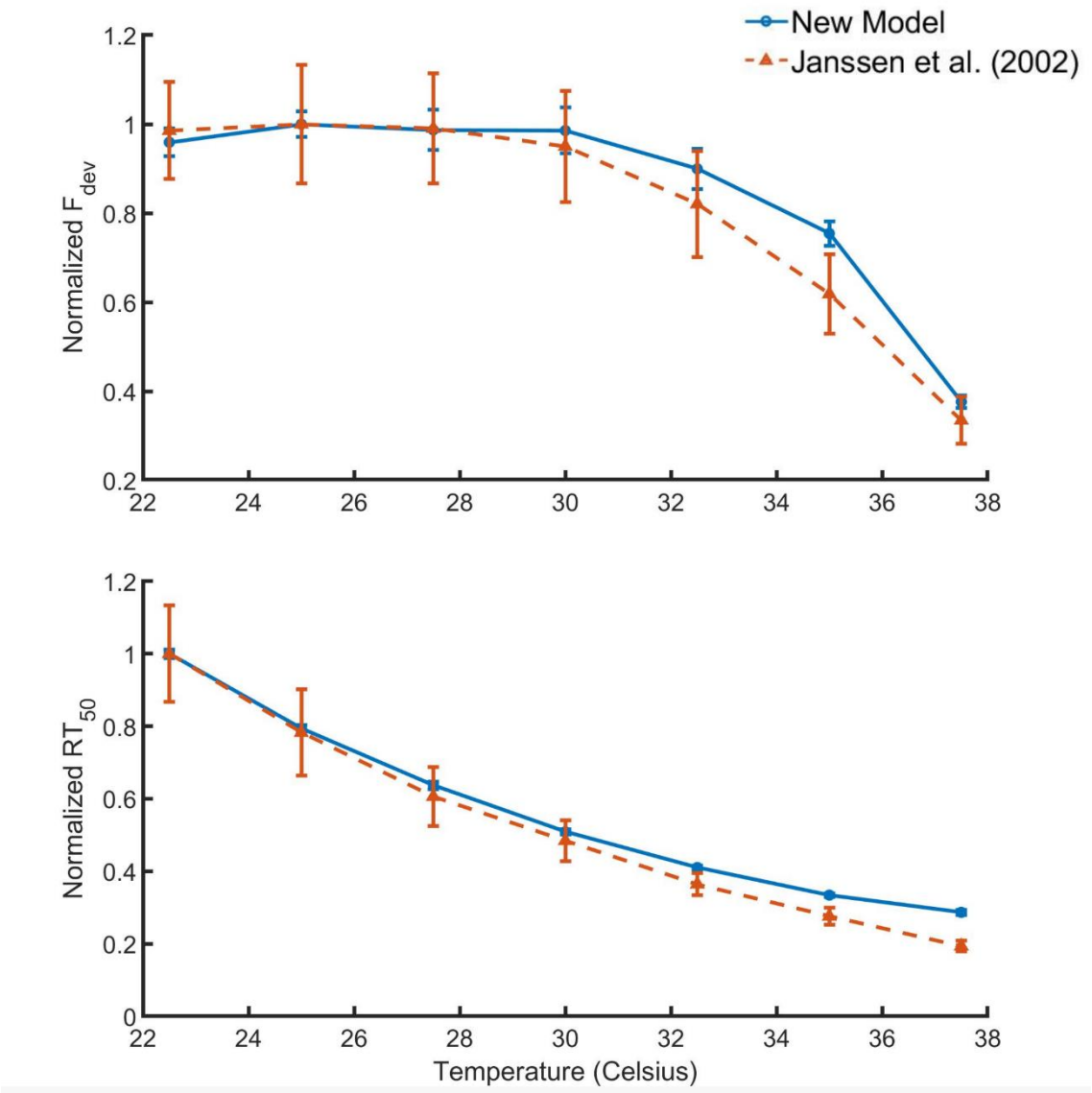


Figure 6. Comparison between the mean F_{dev} and RT_{50} of the simulated twitches and the experimental data from Janssen *et al.* [6].

Influence of Temperature on Myofilament Sensitivity

The influence of Ca^{2+} on myofilaments was analyzed using the protocols described in Test 3. These analyses were conducted on the new proposed model at four distinct temperatures (22.5°C, 27.5°C, 32.5°C, and 37.5°C). Figure 7 illustrates the obtained results. The quantitative data from the force vs. pCa test are presented in Table 5.

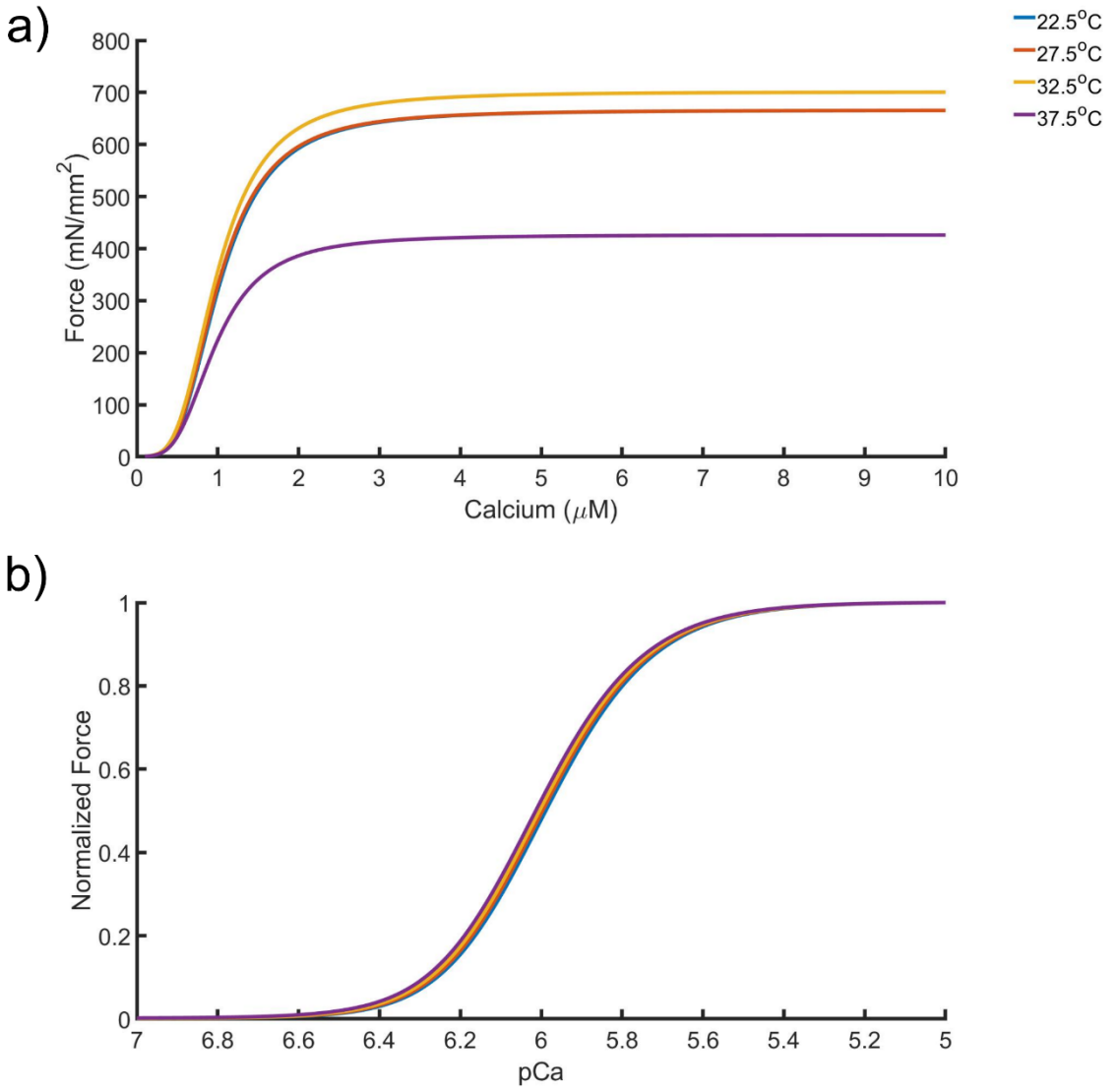


Figure 7. a) Simulation of the force vs. $[Ca^{2+}]_i$ curve for temperatures 22.5°C, 27.5°C, 32.5°C, and 37.5°C. b) Simulation of the force vs. pCa curve for the same temperatures as the previous test.

Table 5. Data related to the force vs. pCa tests. The variables presented are: the equilibrium dissociation constant (K_d), pCa_{50}, and n_H.

Temperature (°C)	**22.5**	**27.5**	**32.5**	**37.5**
K_d (μM)	0.94	0.88	0.82	0.76
pCa_{50}	5.99	6	6	6.01
n_H	3.36	3.35	3.35	3.32

DISCUSSION

Comparison of Contraction Twitches Generated by the N15 Model, the New Model, and Experimental Data

The results of Test 1, in which a single simulation was performed for each of the seven temperatures, indicate that the isometric contraction twitches conformation in the new model shows significant correspondence with the experimental data. As illustrated in Figure 2, it is observed that a temperature reduction results in an increase in F_{dev}, in accordance with the findings of Janssen *et al.* [6].

This force response pattern emerged exclusively due to the implementation of the temperature influence on the myofilaments in the N15 model. The relevance of this effect becomes evident when comparing the new model with N15 in Figures 2 and 3, where temperature only affects the parameters of the electrical model by Morotti *et al.* [18].

In the model by Rice *et al.* [15], the Q_{10} coefficient was defined as 6.25 for parameters associated with the myofilaments, except for one of the relaxation-related parameters (g_{app}), which was set at 2.5. The standardization of Q_{10} values aims to maintain the relative distribution of states approximately constant with temperature variation. Although this approach represents a simplification, it consistently reproduces the temperature-induced changes in contraction twitches [15].

In the presented simulations, all parameters of myofilament kinetics were adjusted to a uniform value of 2.5, empirically determined based on the model calibration to the experimental data reported by Janssen *et al.* [6]. On the other hand, the Q_{10} values for k_{on} and k_{off}, as used in Rice *et al.* [15], were maintained, allowing adequate representation of the Ca^{2+}-myofilament sensitivity behavior observed experimentally [22].

When analyzing the F_{dev} values in the experimental data (Table 4), a progressive increase is observed up to 30°C. From this temperature onward, the values gradually decrease until 35°C, followed by a sharper decline at 37.5°C, where F_{dev} drops from 41.81 mN/mm² to 21.57 mN/mm². In the initial tests, where

the Q_{10} coefficient was applied to myofilament parameters, the model qualitatively reproduced the behavior observed in the experimental data but failed to capture the sharp contraction force drop near the physiological range.

To maintain the approach of standardizing the Q_{10} value in myofilament kinetics parameters, it was necessary to adjust the A_p parameter, which represents the elastic constant of the force generated by cross-bridges. This modification functions as a simplification to capture the nonlinearity observed in force tests exerted by cross-bridges at temperatures near the physiological value [23].

The proposed new model demonstrates general agreement with the experimental data from Janssen *et al.* [6] when simulating relaxation, except for the RT_{50} values at 35°C and 37.5°C. This divergence is evident in Figure 2, where the simulated RT_{50} values for these temperatures lie outside the standard deviation of the experimental data.

A noteworthy aspect to highlight is the low standard deviation observed at higher temperatures in the experimental data from Janssen *et al.* [6]. This behavior suggests reduced variability in the duration of force twitches at elevated temperatures. One possible explanation for this phenomenon is that, at lower temperatures, $[Ca^{2+}]_i$ and the interaction among actin, myosin, and tropomyosin proteins, which regulate the contractile process, exhibit greater complexity, resulting in more pronounced variability [24].

In contrast, at higher temperatures, this variability is reduced due to the greater uniformity of the cross-bridge detachment process, which becomes the predominant factor in muscle relaxation regardless of Ca^{2+} activation [25].

Population Simulation of the New Model

Using the proposed new model, a simulation was performed based on the methodology developed by Sobie *et al.* [19]. This type of simulation allows for the computational emulation of a conventional experiment. This methodology was employed by Morotti *et al.* [20] to analyze the sensitivity of variables such as action

potential (AP) and $[Ca^{2+}]i$ to changes in biophysical parameters using an adapted model for humans, rabbits, and mice.

This methodology is also used in cardiac tissue simulations, where coupling mathematical models of myocytes enables the representation of cellular interactions and the propagation of excitation waves in the myocardium. To represent physiological conditions more realistically, stochastic variability of parameters is incorporated into the modeling. This variability reflects the cellular heterogeneity present in cardiac tissue and allows for assessing the robustness of electrical propagation patterns and the susceptibility of the tissue to arrhythmias under different pathophysiological conditions [26–28].

The methodology employed in this study aimed to replicate the experimental conditions described by Janssen *et al.* [6]. To this end, the same number of experimental samples (n = 10) was adopted. Due to the small sample size, a similarly low variability factor ($\sigma = 0.01$) was chosen in the normalized logarithmic distribution. As a result, the mean values from the simulations closely matched those obtained in the conventional simulation, while the imposed low variability led to a similarly reduced standard deviation.

Force-Calcium and Force-pCa Relationships

The analysis of the relationship between contractile force development and $[Ca^{2+}]_i$ allows for evaluating the ability of the proposed model to reproduce the behavior of myofilaments in response to different triggers and mechanisms involved in contraction and relaxation. In the force versus $[Ca^{2+}]_i$ curves (Figure 6a), it was observed that, for the lowest evaluated temperatures (22.5°C and 27.5°C), the curves exhibit qualitatively similar behavior. As the temperature increased to 32.5°C, there was an increase in the force saturation value relative to $[Ca^{2+}]_i$. This behavior is comparable to that reported by De Tombe *et al.* [17]; however, in that study, the relationship between temperature and force saturation was observed only under conditions below 30°C.

In the proposed new model, the maximum generated force decreased when the temperature was raised to 37.5°C (Figure 6a), a behavior that has not

yet been experimentally described. However, it is important to highlight that Harrison & Bers [22] investigated the sensitivity of myofilaments to Ca^{2+} in rabbit ventricular myocytes up to a temperature of 36°C and reported an increase in the maximum force generated by the Ca^{2+} trigger as the temperature rose. Thus, it is possible that the decrease in maximum force observed at 37.5°C in the present model is due to a limitation or inaccuracy in the adopted model parametrization.

The analysis of the force versus pCa curves, used to assess the sensitivity of myofilaments to Ca^{2+}, revealed that the pCa_{50} values and Hill coefficients (Table 4) showed minimal variations across different temperature conditions. This result indicates that the relationship between temperature and myofilament sensitivity to Ca^{2+} in the proposed new model is reduced, in agreement with the findings of Harrison & Bers [22], who, when investigating rabbit ventricular myocytes, observed changes in myofilament sensitivity to Ca^{2+} only at lower temperatures (1°C and 8°C).

Additionally, Gillis *et al.* [29] analyzed the influence of temperature on myofilament sensitivity to Ca^{2+} in bovine striated muscle, reporting pCa_{50} values of 4.97 ± 0.04 (n = 8), 5.29 ± 0.04 (n = 10), and 5.42 ± 0.02 (n = 8) for temperatures of 7°C, 21°C, and 37°C, respectively. These results reinforce the hypothesis that temperature has a limited influence on myofilament sensitivity to Ca^{2+}, consistent with the findings of the present study.

Limitations

The proposed new model aims to simulate the dynamics of myofilaments at different temperatures. To achieve this, it utilizes the experimental data from Janssen *et al.* [6] as a reference for calibrating the base model, N15. Initially, calibration was performed at a frequency of 0.5 Hz. However, one of the objectives of this study on the effects of temperature on myofilament dynamics is to eventually simulate conditions closer to in vivo contraction in rodents. To achieve this goal, it will be necessary to calibrate the model for frequencies close to 10 Hz. Preliminary results, not presented in this study, indicate that for frequencies above 5 Hz, the model exhibits significantly elevated diastolic values compared to the resting conditions observed experimentally.

Another limiting factor in the analysis is the availability of experimental data for model calibration. Experiments in rodents at temperatures near physiological conditions, such as those of Janssen *et al.* [6], require force measurement techniques that preserve tissue integrity, especially at high frequencies. However, due to the complexity of these methods, the number of experimental studies in this field is limited, which constrains the amount of data available for the development and refinement of computational models.

Thus, future studies should continue investigating the influence of temperature on myofilament dynamics. Therefore, the next objective is to calibrate the model to represent myocyte contraction under physiological temperature and high-frequency conditions in rodents.

DECLARATIONS

Author's Contributions

Matheus Leonardo Alves de Camargo performed the adjustments and testing of the proposed model and wrote the manuscript. Daisuke Sato contributed to the core idea of the study, guided the initial steps of model development, and participated in the revision of the mathematical modeling section. Jose Wilson Magalhães Bassani and Rosana Almada Bassani reviewed the physiological aspects of the manuscript. Robson Rodrigues da Silva assisted in the development of the new model, contributed ideas for testing and simulation code, and performed a general review of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Data Availability Statement

All MATLAB scripts and data used in this study are stored in the OSF repository and can be accessed through the following link: https://osf.io/fm5dr/.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no financial or personal conflicts of interest with other parties regarding this study.

REFERENCES

[1] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002;415(6868):198-205. doi:10.1038/415198a

[2] Stehle R, Solzin J, Iorga B, Poggesi C. Insights into the kinetics of Ca2+-regulated contraction and relaxation from myofibril studies. Pflugers Arch. 2009;458(2):337-357. doi:10.1007/s00424-008-0630-2

[3] Puglisi JL, Bassani RA, Bassani JW, Amin JN, Bers DM. Temperature and relative contributions of Ca transport systems in cardiac myocyte relaxation. Am J Physiol. 1996;270(5 Pt 2):H1772-H1778. doi:10.1152/ajpheart.1996.270.5.H1772

[4] Bassani RA, Bassani JW. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca2+ pump with thapsigargin to estimate the contribution of Na+-Ca2+ exchange to ventricular myocyte relaxation. Braz J Med Biol Res. 2003;36(12):1717-1723. doi:10.1590/s0100-879x2003001200014

[5] Stull LB, Leppo MK, Marbán E, Janssen PM. Physiological determinants of contractile force generation and calcium handling in mouse myocardium. J Mol Cell Cardiol. 2002;34(10):1367-1376. doi:10.1006/jmcc.2002.2065

[6] Janssen PM, Stull LB, Marbán E. Myofilament properties comprise the rate-limiting step for cardiac relaxation at body temperature in the rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;282(2):H499-H507. doi:10.1152/ajpheart.00595.2001

[7] Negroni JA, Morotti S, Lascano EC, *et al.* β-adrenergic effects on cardiac myofilaments and contraction in an integrated rabbit ventricular myocyte model. J Mol Cell Cardiol. 2015;81:162-175. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.02.014

[8] Soltis AR, Saucerman JJ. Synergy between CaMKII substrates and β-adrenergic signaling in regulation of cardiac myocyte Ca(2+) handling. Biophys J. 2010;99(7):2038-2047. doi:10.1016/j.bpj.2010.08.016

[9] Muangkram Y, Noma A, Amano A. A new myofilament contraction model with ATP consumption for ventricular cell model. J Physiol Sci. 2018;68(5):541-554. doi:10.1007/s12576-017-0560-x

[10] Surdo NC, Berrera M, Koschinski A, *et al.* FRET biosensor uncovers cAMP nano-domains at β-adrenergic targets that dictate precise tuning of cardiac contractility. Nat Commun. 2017;8:15031. Published 2017 Apr 20. doi:10.1038/ncomms15031

[11] Silva RR, Filho OBS, Bassani JWM, Bassani RA. The ForceLAB simulator: Application to the comparison of current models of cardiomyocyte contraction. Comput Biol Med. 2021;131:104240. doi:10.1016/j.compbiomed.2021.104240

[12] Negroni JA, Lascano EC. Simulation of steady state and transient cardiac muscle response experiments with a Huxley-based contraction model. J Mol Cell Cardiol. 2008;45(2):300-312. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.04.012

[13] Rice JJ, Winslow RL, Hunter WC. Comparison of putative cooperative mechanisms in cardiac muscle: length dependence and dynamic responses. Am J Physiol. 1999;276(5):H1734-H1754. doi:10.1152/ajpheart.1999.276.5.H1734

[14] Mullins PD, Bondarenko VE. A mathematical model of the mouse ventricular myocyte contraction. PLoS One. 2013;8(5):e63141. Published 2013 May 9. doi:10.1371/journal.pone.0063141

[15] Rice JJ, Wang F, Bers DM, de Tombe PP. Approximate model of cooperative activation and crossbridge cycling in cardiac muscle using ordinary differential equations. Biophys J. 2008;95(5):2368-2390. doi:10.1529/biophysj.107.119487

[16] Bennett AF. Thermal dependence of muscle function. Am J Physiol. 1984;247(2 Pt 2):R217-R229. doi:10.1152/ajpregu.1984.247.2.R217

[17] de Tombe PP, Stienen GJ. Impact of temperature on cross-bridge cycling kinetics in rat myocardium. J Physiol. 2007;584(Pt 2):591-600. doi:10.1113/jphysiol.2007.138693

[18] Morotti S, Edwards AG, McCulloch AD, Bers DM, Grandi E. A novel computational model of mouse myocyte electrophysiology to assess the synergy between Na+ loading and CaMKII. J Physiol. 2014;592(6):1181-1197. doi:10.1113/jphysiol.2013.266676

[19] Sobie EA. Parameter sensitivity analysis in electrophysiological models using multivariable regression. Biophys J. 2009;96(4):1264-1274. doi:10.1016/j.bpj.2008.10.056

[20] Morotti S, Liu C, Hegyi B, *et al.* Quantitative cross-species translators of cardiac myocyte electrophysiology: Model training, experimental validation, and applications. Sci Adv. 2021;7(47):eabg0927. doi:10.1126/sciadv.abg0927

[21] Walker JS, Li X, Buttrick PM. Analysing force-pCa curves. J Muscle Res Cell Motil. 2010;31(1):59-69. doi:10.1007/s10974-010-9208-7

[22] Harrison SM, Bers DM. Influence of temperature on the calcium sensitivity of the myofilaments of skinned ventricular muscle from the rabbit. *J Gen Physiol*. 1989;93(3):411-428. doi:10.1085/jgp.93.3.411

[23] Ranatunga KW. Endothermic force generation in fast and slow mammalian (rabbit) muscle fibers. Biophys J. 1996;71(4):1905-1913. doi:10.1016/S0006-3495(96)79389-X

[24] Kieu TT, Awinda PO, Tanner BCW. Omecamtiv Mecarbil Slows Myosin Kinetics in Skinned Rat Myocardium at Physiological Temperature. Biophys J. 2019;116(11):2149-2160. doi:10.1016/j.bpj.2019.04.020

[25] Fujita H, Kawai M. Temperature effect on isometric tension is mediated by regulatory proteins tropomyosin and troponin in bovine myocardium. *J Physiol*. 2002;539(Pt 1):267-276. doi:10.1113/jphysiol.2001.013220

[26] De Waard S, Hinnen H, Kucera JP. Stochastic and alternating pacing paradigms to assess the stability of cardiac conduction. J Mol Cell Cardiol. 2024;197:20-33. doi:10.1016/j.yjmcc.2024.10.007

[27] Xia X, Hu M, Zhou W, Jin Y, Yao X. Engineering cardiology with miniature hearts. Mater Today Bio. 2025;31:101505. Published 2025 Jan 21. doi:10.1016/j.mtbio.2025.101505

[28] Sato D, Bartos DC, Ginsburg KS, Bers DM. Depolarization of cardiac membrane potential synchronizes calcium sparks and waves in tissue. Biophys J. 2014;107(6):1313-1317. doi:10.1016/j.bpj.2014.07.053

[29] Gillis TE, Marshall CR, Xue XH, Borgford TJ, Tibbits GF. Ca(2+) binding to cardiac troponin C: effects of temperature and pH on mammalian and salmonid isoforms. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000;279(5):R1707-R1715. doi:10.1152/ajpregu.2000.279.5.R1707

APÊNDICE E: ARTIGO EM COLABORAÇÃO

Feed Forward modeling: An efficient approach for mathematical modeling of the force frequency relationship in the rabbit isolated ventricular myocyte

Robson Rodrigues da Silva[1,2]; Gabriel Marcos de Sousa Motta[1]; Matheus Leonardo Alves de Camargo[1]; Daniel Gustavo Goroso[1] e José Luis Puglisi[3]

[1]Research and Technology Center, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brazil.

[2]LabNECC, Center for Biomedical Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

[3]College of Medicine, California Northstate University, Elk Grove, Sacramento, CA, United States

[*]Corresponding author:

University of Mogi das Cruzes Research and Technology Center (NPT/UMC)

Av. Cândido Xavier de Almeida Souza, 200. Centro Cívico, Mogi das Cruzes, SP

CEP: 08780-911, Brazil.

E-mail: robson.silva@umc.br

Running title: Feed Forward Modeling Applied to EC Coupling