



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIEROS  
INDUSTRIALES VALENCIA

**TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA**

**ESTUDIO MEDIANTE MODELADO  
Y SIMULACIÓN DEL EFECTO DE  
LOS FÁRMACOS Y LAS  
MUTACIONES EN LA  
REGULACIÓN INTRACELULAR DEL  
CALCIO EN CARDIOMIOCITOS  
VENTRICULARES DE PERRO**

AUTORA: ESTEFANÍA RENÚ CARRETERO

TUTOR: JOSÉ MARÍA FERRERO DE LOMA-OSORIO

**Curso Académico: 2016-17**

## **AGRADECIMIENTOS**

Hace cinco años que comenzó esta aventura llamada “Grado en Ingeniería Biomédica” y no ha habido mejor forma de concluirla que con la realización de este Trabajo de Fin de Grado, el cual me ha ayudado a aplicar numerosos conocimientos adquiridos con el paso de los años y a aprender mucho más de lo esperado.

Todo esto no habría sido posible sin el incesante apoyo de mi familia, en especial, de mis padres, quienes creyeron en mí siempre, y estuvieron dispuestos a todo con tal de hacer mis sueños realidad. Infinitas gracias nunca serán suficientes para devolveros todo lo que me dais día a día.

Por supuesto, es necesario destacar en estas líneas a todas esas amistades, las que ya traía y las que este camino me ha ayudado a conocer. Gracias a todos ellos por haber hecho las cosas mucho más fáciles. Por haber estado siempre ahí, a pesar del mal humor, del estrés, de la ausencia y por vuestro incondicional apoyo.

Asimismo, es imprescindible recordar y agradecer en estas líneas a mi tutor, Chema, por todo su tiempo dedicado, por su entusiasmo y por adentrarme un poquito más en todo este mundo de la investigación y la Ingeniería Biomédica. Por haberme dado la grandísima oportunidad de trabajar con él, haber confiado en mí y haberse convertido en mucho más que “un simple tutor”.



# RESUMEN

La regulación del calcio intracelular ( $Ca_i$ ) en los cardiomiocitos es crítica por su relación con la contractilidad celular y la arritmogénesis. Intervenciones farmacológicas y/o mutaciones que afecten los niveles de expresión de los canales iónicos pueden alterar las corrientes iónicas y, en consecuencia, la regulación de  $Ca_i$ . Debido a la dificultad de llevar a cabo un análisis sistemático de los efectos de las variaciones de las corrientes iónicas en la regulación del calcio utilizando únicamente medios experimentales, se han llevado a cabo simulaciones computacionales para caracterizar los efectos de las alteraciones de los canales iónicos en parámetros del  $Ca_i$  en cardiomiocitos.

Se ha utilizado el modelo de Decker – Rudy (2009) para simular el potencial de acción (PA) canino y sus corrientes iónicas. Para llevar a cabo las simulaciones, se ha desarrollado un software en MATLAB con un módulo principal, uno de cálculo numérico, otro de cálculo de corrientes iónicas y un último de detección automática de parámetros de  $Ca_i$ . Utilizando el software desarrollado, se han simulado potenciaciones y bloqueos de canales iónicos, bombas e intercambiadores del retículo sarcoplásmico (RS) y de la membrana celular desde el 0% hasta el 200% de sus valores control. Con los resultados obtenidos, se ha llevado a cabo un análisis de sensibilidad de los efectos de estas variaciones en un conjunto seleccionado de parámetros de  $Ca_i$  que constituyen biomarcadores preclínicos a distintos períodos de estimulación.

Los resultados muestran que, para cualquier período de estimulación, la concentración diastólica de calcio ( $Ca_D$ ) está principalmente controlada por la bomba SERCA ( $I_{up}$ ), mientras que la concentración diastólica de calcio ( $Ca_S$ ) está influenciada principalmente por la corriente de la bomba sodio-potasio del sarcolema ( $I_{NaK}$ ). El efecto de la liberación de calcio a través de los receptores de rianodina ( $I_{rel}$ ) del retículo sarcoplásmico es, sin embargo, mucho menor. A mayores frecuencias de estimulación,  $I_{NaK}$  tiende a controlar la duración del transitorio de calcio ( $Ca_{TD90}$ ) más que  $I_{up}$ , jugando también un papel importante a altos valores de bloqueo la corriente  $I_{CaL}$ .

**Palabras Clave:** Cardiomiocito, Calcio Intracelular, Corriente Iónica, Análisis de Sensibilidad, Dinámica Intracelular de Calcio, Mutaciones, Fármacos

# RESUM

La regulació del calci intracel·lular ( $Ca_i$ ) en els cardiomiocits és crítica per la seua relació amb la contractilitat cel·lular i l'arritmogènesi. Intervencions farmacològiques i/o mutacions que afecten els nivells d'expressió dels canals iònics poden alterar els corrents iònics i, en conseqüència, la regulació del  $Ca_i$ . A causa de la dificultat de dur a terme una anàlisi sistemàtica dels efectes de les variacions dels corrents iònics en la regulació del calci utilitzant únicament mitjans experimentals, s'han dut a terme simulacions computacionals per a caracteritzar els efectes de les alteracions dels canals iònics en paràmetres del  $Ca_i$  en cardiomiocits.

S'ha utilitzat el model de Decker – Rudy (2009) per a simular el potencial d'acció (PA) caní i els seus corrents iònics. Per a dur a terme les simulacions, s'ha desenvolupat un software en MATLAB amb un mòdul principal, un de càlcul numèric, un altre de càlcul de corrents iònics i un últim de detecció automàtica de paràmetres de  $Ca_i$ . Utilitzant el software desenvolupat, s'han simulat potenciacions i bloquejos de canals iònics, bombes i intercanviadors del reticle sarcoplàsmic (RS) i de la membrana cel·lular des del 0% fins al 200% dels seus valors control. Amb els resultats obtinguts, s'ha dut a terme una anàlisi de sensibilitat dels efectes d'aquestes variacions en un conjunt seleccionat de paràmetres de  $Ca_i$  que constitueixen biomarcadors preclínic a distints períodes d'estimulació.

Els resultats mostren que, per a qualsevol període d'estimulació, la concentració diastòlica de calci ( $Ca_D$ ) està principalment controlada per la bomba SERCA ( $I_{up}$ ), mentre que la concentració sistòlica de calci ( $Ca_S$ ) està influenciada principalment pel corrent de la bomba sodi – potassi del sarcolemma ( $I_{NaK}$ ). L'efecte de l'alliberament de calci a través dels receptors de rianodina ( $I_{rel}$ ) del retícul sarcoplàsmic és, no obstant això, molt menor. A majors freqüències d'estimulació,  $I_{NaK}$  tendeix a controlar la duració del transitori de calci ( $Ca_{TD90}$ ) més que  $I_{up}$ , jugant també un paper important a alts valors de bloqueig el corrent  $I_{CaL}$ .

**Paraules clau:** Cardiomiocit, Calci Intracel·lular, Corrent Iònica, Anàlisi de Sensibilitat, Dinàmica Intracel·lular del Calci, Mutacions, Fàrmacs

## **ABSTRACT**

Intracellular calcium ( $Ca_i$ ) regulation in cardiomyocytes is critical because of its relationship with cell contractility and arrhythmogenesis. Pharmacological interventions and/or mutations affecting ion channel expression levels may alter ionic currents and thus  $Ca_i$  handling. Because it is difficult to conduct a systematic analysis of the effects of ionic current variations in calcium regulation using solely experimental means, we have conducted computational simulations to characterize the effects of ion channel alterations on  $Ca_i$  parameters in cardiomyocytes.

The Decker-Rudy (2009) model has been used to simulate the canine action potential (AP) and its underlying ionic currents. To carry out our simulations, a software has been developed in MATLAB with a main module, a numerical calculation one, another of ionic currents calculation and an automatic  $Ca_i$  parameter detection module. By using the software developed, potentiators and blockages of sarcolemmal and sarcoplasmic reticulum (RS) ion channels, pumps and exchangers using values ranging from 0% to 200% of their control values. With the results obtained, a sensitivity analysis of the effects of these variations on a selected set of  $Ca_i$  parameters that constitute preclinical biomarkers at different stimulation periods.

The results show that, for any stimulation period, the diastolic calcium concentration ( $Ca_D$ ) is mainly controlled by the SERCA pump ( $I_{up}$ ) while the systolic calcium concentration ( $Ca_S$ ) is mainly influenced by the sodium – potassium sarcolemmal pump current ( $I_{NaK}$ ). The effect of calcium release through the ryanodine receptors ( $I_{rel}$ ) of the sarcoplasmic reticulum is, however, much lower. At higher stimulation frequencies,  $I_{NaK}$  tends to control the calcium transient duration ( $Ca_{TD90}$ ) rather than  $I_{up}$ , with  $I_{CaL}$  also playing an important role at high degrees of block.

**Keywords:** Cardiomyocytes, Intracellular Calcium, Ionic Current, Sensivity Analysis, Intracellular Calcium Dynamics, Mutations, Drugs



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del corazón y trayecto del flujo sanguíneo a través de las cavidades cardíacas y de las válvulas cardíacas. Fuente: tomada de (Guyton & Hall, 2011).....	18
Figura 2: Naturaleza interconectada de las fibras del músculo cardíaco. Fuente: tomada de (Guyton & Hall, 2011).....	19
Figura 3: Moléculas de membrana transportadoras. En azul, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ ; en naranja, co-transportador $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ ; en amarillo, la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; en negro, el intercambiador $\text{H}^+/\text{Na}^+$ ; en rojo, un canal iónico de $\text{K}^+$ ; en naranja un canal de $\text{Na}^+$ ; en verde, un canal de $\text{Ca}^{+2}$ ; en morado, un canal de $\text{Cl}^-$ . Fuente: elaboración propia .....	20
Figura 4: Principales iones en los fenómenos eléctricos cardíacos. Fuerzas eléctricas y de difusión en un potencial de reposo. Fuente: elaboración propia .....	21
Figura 5: Principales iones en los fenómenos eléctricos cardíacos. Fuerzas eléctricas y de difusión en un potencial de acción. Fuente: elaboración propia .....	21
Figura 6: Comportamiento resistivo de un canal iónico. Fuente: elaboración propia .....	22
Figura 7: Circuito eléctrico equivalente a un canal iónico. Fuente: elaboración propia .....	23
Figura 8: Circuito eléctrico equivalente a la membrana celular completa. Fuente: elaboración propia .....	24
Figura 9: Potencial de acción en los cardiomiocitos. Fase 1: célula en reposo; Fase 2: despolarización; Fase 3: meseta y repolarización; Fase 4: vuelta al reposo. Fuente: elaboración propia. ....	25
Figura 10: Mecanismos para acoplamiento de excitación - contracción y relajación en el músculo cardíaco. Transporte del $\text{Ca}^{+2}$ y $\text{Na}^+$ en miocitos ventriculares. La gráfica muestra el potencial de acción (AP) respecto al tiempo, el transitorio de calcio y la contracción medida en un miocito ventricular de conejo a $37^\circ\text{C}$ . Siendo NCX el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ ; ATP, ATPasa; PLB, fosfolambano; PLM, fosfolemán; SR, retículo sarcoplásmico. Fuente: tomada de (Bers & Despa, 2006). ....	27
Figura 11: a) postdespolarización temprana (EAD) en la fase 2 del PA; b) postdespolarización temprana (EAD) en la fase 3 del PA; c) postdespolarización tardía (DAD). Fuente: tomada de (Jalife et al., 2011). ....	29
Figura 12: Modelo dinámico de Hund-Rudy del miocito epicárdico canino. Véanse en el texto las abreviaturas. Fuente: tomada de (Decker et al., 2009). ....	32
Figura 13: Implementación computacional de la interfaz de usuario (GUI) que permite ejecutar el modelo de Decker – Rudy y visualizar los resultados. ....	34
Figura 14: : Representación gráfica de un transitorio de calcio. Concentración del calcio intracelular respecto al tiempo. Señalados en el gráfico el CaS, el calcio sistólico; el CaD, el calcio diastólico; el CaTD30, instante en el que se ha repolarizado un 30%; CaTD90, instante en que se ha repolarizado un 90%; CaDotMax, máxima derivada ascendente.....	36

Figura 15: Interfaz gráfica de usuario (GUI) que simula la regulación del calcio intracelular. ....	37
Figura 16: Sección de la GUI en la cual se establecen los parámetros de entrada, Settings.....	37
Figura 17: Área para establecer los factores de bloqueo que multiplican a las corrientes iónicas .....	37
Figura 18: Listas desplegables que permiten seleccionar tanto la corriente que queremos bloquear o activar; y la corriente que queremos visualizar gráficamente.....	38
Figura 19: Botones de la GUI que ejecutan la simulación, el módulo Ca_Measures y que permiten la visualización de los resultados gráficamente. ....	38
Figura 20: Sección donde se representan gráficamente a la izquierda, el PA; en el centro, el calcio intracelular; a la derecha, la corriente iónica seleccionada. ....	39
Figura 21: De arriba abajo, de izquierda a derecha, simulaciones control de: potencial de membrana; concentración intracelular de calcio; concentraciones de calcio en el JSR y NSR; corriente de sodio; corriente lenta de sodio; corriente rápida de potasio; corriente lenta de potasio; corriente transitoria de salida. Todas ellas con BCL de 1000 ms y tiempo simulado 1000s. .....	41
Figura 22: De arriba abajo, de izquierda a derecha, simulaciones control de: corriente de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; corriente del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ ; corriente de $\text{K}^+$ dependiente del tiempo; corriente de liberación del JSR; corriente de la bomba de $\text{Ca}^{+2}$ presente en el sarcolema; corriente de los canales de $\text{Ca}^{+2}$ tipo L; corriente de entrada de $\text{Ca}^{+2}$ al NSR ( $I_{\text{up}}$ ).....	42
Figura 23: Evolución temporal de a) $V_m$ con $G_{\text{NaK}} \times 0.7, x1$ y $x2$ ; b) Transitorios de calcio con $G_{\text{NaK}}$ $\times 0.7, x1$ y $x2$ ; c) $I_{\text{NaK}}$ con $G_{\text{NaK}} \times 0.7, x1$ y $x2$ .....	44
Figura 24: Evolución temporal de a) $V_m$ con $G_{\text{up}} \times 0.7, x1$ y $x2$ ; b) Transitorios de calcio con $G_{\text{up}}$ $\times 0.7, x1$ y $x2$ ; c) $I_{\text{upK}}$ con $G_{\text{upK}} \times 0.7, x1$ y $x2$ .....	45
Figura 25: Evolución temporal de a) $V_m$ con $G_{\text{CaL}} \times 0.7, x1$ y $x2$ ; b) Transitorios de calcio con $G_{\text{CaL}}$ $\times 0.7, x1$ y $x2$ ; c) $I_{\text{CaL}}$ con $G_{\text{CaL}} \times 0.7, x1$ y $x2$ .....	46
Figura 26: Evolución temporal de a) $V_m$ con $G_{\text{Kr}} \times 0.7, x1$ y $x2$ ; b) Transitorios de calcio con $G_{\text{Kr}}$ $\times 0.7, x1$ y $x2$ ; c) $I_{\text{Kr}}$ con $G_{\text{Kr}} \times 0.7, x1$ y $x2$ .....	47
Figura 27: Biomarcadores preclínicos obtenidos con Ca_Measures variando $I_{\text{up}}$ , con tres BCL distintos (1000, 500 y 333 milisegundos).....	48
Figura 28: Biomarcadores preclínicos obtenidos con Ca_Measures variando $I_{\text{NaK}}$ , con tres BCL distintos (1000, 500 y 333 milisegundos).....	49
Figura 29: Biomarcadores preclínicos obtenidos con Ca_Measures variando $I_{\text{CaL}}$ , con tres BCL distintos (1000, 500 y 333 milisegundos).....	50
Figura 30: Biomarcadores preclínicos obtenidos con Ca_Measures variando $I_{\text{NaCa}_{\text{cair}}}$ , con tres BCL distintos (1000, 500 y 333 milisegundos).....	50
Figura 31: Biomarcadores preclínicos obtenidos con Ca_Measures variando: A) $I_{\text{Ks}}$ B) $I_{\text{K1}}$ C) $I_{\text{NaL}}$ D) $I_{\text{pCa}}$ E) $I_{\text{rel}}$ F) $I_{\text{Kr}}$ , con periodo de estimulación de 1000 ms. ....	51

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Comparación de las sensibilidades relativas de los biomarcadores preclínicos del $\text{Ca}^{+2}$ debido a variaciones en las propiedades de las corrientes iónicas. El naranja indica la máxima sensibilidad relativa de un biomarcador en particular. Los valores en cursiva indican que el biomarcador y el parámetro varían inversamente. ....	53
Tabla 2: Costes de mano de obradel proyecto. Se observa la tarea de cada empleado; el precio por hora que cobra cada uno de ellos; las horas trabajadas; el total a cobrar.....	1
Tabla 3: Costes de ejecución. Incluye cada equipo o software utilizado en la realización del proyecto; el coste de cada uno; el período de amortización estimado en meses; el tiempo de uso en este trabajo; el precio total de cada uno para los diez meses. ....	3
Tabla 4: Coste total del trabajo de fin de grado. El coste total es la suma de los costes de mano de obra y de los de ejecución.....	3

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AV	Auriculoventricular
$V_m$	Potencial de membrana
R	Resistencia
PA	Potencial de acción
RS	Retículo sarcoplásmico
Túbulo T	Túbulo transverso
JRS	Retículo sarcoplásmico de unión
LRS	Retículo sarcoplásmico longitudinal
SERCA	ATPasa de $Ca^{+2}$ en el retículo sarcoplásmico
RyR	Receptor de rianodina
CaL	Canales de calcio tipo L
NCX	Intercambiador sodio - calcio
EAD	Postdespolarización temprana
DAD	Postdespolarización tardía
GUI	Interfaz de usuario
APD	Duración del potencial de acción
NSR	Retículo sarcoplásmico de red
PLB	Fosfolambano
BCL	Período de estimulación
$[Ca^{+2}]_i$	Concentración intracelular de calcio
$Ca_s$	Calcio sistólico
$Ca_D$	Calcio diastólico
$Ca_{TD30}$	Duración transitoria de calcio al 30%
$Ca_{TD90}$	Duración transitoria de calcio al 90%
G	Conductancia de una corriente iónica
$I_{Na,L}$	componente lenta de la corriente de sodio
$I_{Na}$	corriente de sodio
$I_{Na,b}$	corriente de fondo de sodio
$I_{NaCa,i}$	corriente del intercambiador sodio - calcio
$I_{Ca,b}$	corriente de fondo de calcio
$I_{pca}$	bomba de calcio presente en el sarcolema
$I_{to1}$	corriente transitoria de salida
$I_{Kr}$	componente rápida de la corriente de potasio
$I_{Ks}$	componente lenta de la corriente de potasio
$I_{K1}$	corriente de potasio dependiente del tiempo
$I_{NaK}$	corriente de la bomba sodio - potasio del sarcolema
$CT_{NaCl}$	co-transportador sodio - cloro
$CT_{KCl}$	co-transportador potasio - cloro
$I_{Ca,L}$	corriente del canal de calcio tipo L
$I_{to2}$	corriente de salida transitoria de cloro dependiente del $Ca^{+2}$
$I_{NaCa,ss}$	corriente del intercambiador sodio - calcio (localizado en el subespacio del RS)
$I_{diff, ss}$	difusión iónica del subespacio al subespacio local de $I_{CaL}$
$I_{rel}$	corriente de liberación del JSR
$I_{tr}$	transferencia de calcio del NSR al JSR
$I_{leak}$	corriente de fuga del NSR

# ÍNDICE

## DOCUMENTOS CONTENIDOS EN EL TFG

- Memoria
- Anexos
- Presupuesto

## ÍNDICE DE LA MEMORIA

<b>1. MOTIVACIÓN, ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>15</b>
1.1. MOTIVACIÓN Y JUSTIFICACIÓN .....	15
1.2. ANTECEDENTES .....	15
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
2.1. ANATOMÍA DEL CORAZÓN.....	17
2.2. FISIOLOGÍA DEL CORAZÓN.....	18
2.2.1. <i>Histología del músculo cardíaco</i> .....	18
2.2.2. <i>Sistema de estimulación y conducción</i> .....	19
2.3. BIOELECTRICIDAD CARDÍACA Y MODELOS MATEMÁTICOS DEL POTENCIAL DE ACCIÓN....	19
2.3.1. <i>Conducción a través de la membrana celular</i> .....	19
2.3.2. <i>Conducción a través de los canales iónicos</i> .....	21
2.3.3. <i>Modelado de las corrientes iónicas</i> .....	24
2.3.4. <i>Potencial de acción en el músculo cardíaco</i> .....	25
2.4. EL PAPEL DEL CALCIO EN LOS CARDIOMIOCITOS .....	26
2.4.1. <i>Acoplamiento excitación – contracción</i> .....	26
2.4.2. <i>Influencia de las mutaciones en la dinámica de <math>Ca^{+2}</math></i> .....	27
2.4.3. <i>Influencia de los fármacos en la dinámica de <math>Ca^{+2}</math></i> .....	28
2.4.4. <i>Influencia de la dinámica de <math>Ca^{+2}</math> en las arritmias cardíacas</i> .....	28
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>4. DESARROLLO DEL SOFTWARE .....</b>	<b>31</b>
4.1. MODELO COMPUTACIONAL DE EPICARDIO CANINO.....	31
4.2. IMPLEMENTACIÓN COMPUTACIONAL DEL MODELO .....	33
4.3. MANUAL DE USUARIO.....	36

<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
5.1. RESULTADOS DE LAS SIMULACIONES CONTROL .....	40
5.2. EFECTO DE LAS VARIACIONES DE LAS CORRIENTES IÓNICAS .....	43
5.3. EFECTO DE LOS FACTORES DE BLOQUEO SOBRE BIOMARCADORES DE CALCIO.....	48
5.4. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD .....	52
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>7. LIMITACIONES Y POSIBLES MEJORAS .....</b>	<b>56</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>57</b>

## ANEXOS

MÓDULO MAIN .....	62
MÓDULO MODEL .....	65
MÓDULO CURRENTS .....	76
MÓDULO CA_MEASURES.....	79

## ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

<b>PRESUPUESTO .....</b>	<b>2</b>
1. PRESUPUESTO .....	2
1.1.1. <i>Coste de mano de obra.....</i>	2
1.1.2. <i>Coste de ejecución .....</i>	3
1.1.3. <i>Coste total del proyecto.....</i>	3

---

# MEMORIA

# **1. MOTIVACIÓN, ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**

## **1.1. MOTIVACIÓN Y JUSTIFICACIÓN**

La concentración intracelular de calcio es un parámetro esencial en la electrofisiología cardíaca pues determina la contractilidad celular. Además, ciertas alteraciones en la dinámica de calcio intracelular pueden ser proarrítmicas. A pesar de tratarse de una cuestión de gran relevancia, especialmente en humanos, no se dispone apenas de datos experimentales ya que la experimentación con células humanas está lógicamente muy limitada. Por este motivo, se ha investigado desde hace ya muchos años el comportamiento de este ion tan determinante en la contractilidad celular en modelos animales.

Asimismo, debido a que el Centro de Investigación e Innovación en Bioingeniería (Ci2B) de la Universidad Politécnica de Valencia, donde se ha realizado este estudio, tiene mucha experiencia y ha escrito numerosos artículos sobre modelos computacionales cardíacos, se planteó como algo muy revelador la posibilidad de emplear un modelo computacional de perro relativamente reciente para caracterizar la dinámica intracelular del calcio y poder determinar aquellas corrientes iónicas que realmente juegan un papel importante en la regulación del mismo.

Las corrientes iónicas se pueden bloquear o potenciar gracias a la utilización de fármacos o por alteraciones genéticas debidas a mutaciones. Los modelos matemáticos son una útil herramienta mediante la cual se pueden simular numerosos comportamientos; entre ellos, el posible efecto que podría tener un fármaco o una mutación sobre el comportamiento de un canal iónico y, por tanto, sobre el potencial de acción.

Con todo esto, surge la posibilidad de utilizar un modelo matemático de cardiomiocito ventricular canino al cual se le provocarán alteraciones en las corrientes, imitando el comportamiento de un fármaco o una mutación con el fin de determinar cuáles son las más influyentes en la regulación del calcio intracelular. Para ello, surge la necesidad de desarrollar un paquete software para llevar a cabo las simulaciones antedichas de una manera sencilla, sistemática y amigable para el usuario del mismo.

## **1.2. ANTECEDENTES**

El grupo de investigación donde he realizado este trabajo de fin de grado (Ci2B) ha estado trabajando y realizando análisis de sensibilidad desde el año 2011.

El antecedente más reciente es un estudio del citado grupo (Romero et al., 2011) en el cual se inauguró una metodología para realizar este tipo de análisis, cuya finalidad era establecer la

relación entre una serie de biomarcadores preclínicos asociados al potencial de acción con variaciones provocadas en las corrientes iónicas.

Extrapolando este estudio a nuestro parámetro de interés, que es la concentración intracelular de calcio, se plantea la posibilidad de seguir los mismos pasos para tener una base sólida y robusta de que los datos obtenidos iban a presentar una gran validez.

De esta manera, se desarrollará un modelo computacional que se utilizará para simular el efecto de alteraciones en las corrientes iónicas para posteriormente poder determinar el efecto de las mismas sobre el calcio. Por último, mediante el análisis de sensibilidad se podrá cuantificar dicho efecto.

Todo ello constituye una tarea propia de la Ingeniería Biomédica y es objeto de este Trabajo Fin de Grado. En efecto, entre las competencias específicas descritas en el título de Grado en Ingeniería Biomédica impartido por la Universidad Politécnica de Valencia aparece, en el número 14, la competencia siguiente:

*“Capacidad de desarrollar, programar y aplicar métodos matemáticos en el análisis, la modelización y la simulación del funcionamiento de los seres vivos y de los sistemas y procesos utilizados en biología y medicina”*

Entre otras capacidades asociadas a dicha titulación, es precisamente la competencia 14 la que justifica, por un lado, y se desarrolla, por otro, en el presente Trabajo Fin de Grado.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. ANATOMÍA DEL CORAZÓN**

El corazón es una bomba doble de presión y succión, autoadaptable, cuyas partes trabajan a la vez para impulsar la sangre a todo el organismo (Moore, Dalley & Agur, 2013). Su forma global y orientación es la de una pirámide caída que descansa sobre uno de sus lados. La base del corazón se compone de la aurícula izquierda, una porción pequeña de la aurícula derecha y de la parte proximal de los grandes vasos sanguíneos. La cara anterior consta, en su mayor parte, del ventrículo derecho y de parte de la aurícula derecha, así como de una parte del ventrículo izquierdo (Drake, Vogl & Mitchell, 2010).

Los tabiques internos dividen el corazón en cuatro cámaras (dos aurículas y dos ventrículos) y dan lugar a depresiones externas o superficiales denominadas surcos. El surco coronario rodea al corazón y separa las aurículas de los ventrículos mientras que los surcos interventriculares anterior y posterior separan ambos ventrículos (Drake, Vogl & Mitchell, 2010).

La aurícula derecha forma el borde derecho del corazón y recibe sangre venosa tanto de la vena cava superior como de la inferior. En su interior se encuentra el orificio auriculoventricular (AV) derecho, a través del cual dicha aurícula descarga hacia el interior del ventrículo derecho la sangre pobre en oxígeno que ha recibido (Moore, Dalley & Agur, 2013).

El ventrículo derecho forma la mayor parte de la cara anterior del corazón y prácticamente todo el borde inferior del órgano en cuestión. En su interior se encuentra la válvula tricúspide, la cual cierra el orificio AV derecho impidiendo el retorno de la sangre desde el ventrículo hacia la aurícula derecha durante la sístole ventricular (Moore, Dalley & Agur, 2013).

La aurícula izquierda compone la mayor parte de la base del corazón. En su interior, se encuentra el orificio AV izquierdo a través del cual dicha aurícula vierte la sangre oxigenada en el interior del ventrículo izquierdo. Este último forma el vértice del corazón y desarrolla más trabajo que el derecho, pues es el responsable de enviar la sangre a todos los órganos periféricos. En su interior se encuentra la válvula mitral, que cierra el orificio AV izquierdo, para impedir, del mismo modo que la válvula tricúspide, el retorno sanguíneo desde el ventrículo izquierdo hacia la aurícula izquierda (Moore, Dalley & Agur, 2013).

Todas las cavidades cardíacas están formadas por tres capas musculares, las cuales, de más interna a más externa, se denominan endocardio, midmiocardio y epicardio, formando, conjuntamente, el miocardio o músculo cardíaco. Las fibras del músculo cardíaco presentan una disposición helicoidal de manera que durante el bombeo de la sangre generan las fuerzas de compresión necesarias (Moore, Dalley & Agur, 2013).

El esqueleto o anillo fibroso del corazón es una estructura que separa las cavidades unilateralmente y actúa como barrera aislante, la cual impide la conexión eléctrica entre células

musculares auriculares y ventriculares. Además, delimita los orificios por los cuales se transmite la sangre de aurículas a ventrículos permitiendo la inserción del miocardio (Moore, Dalley & Agur, 2013).

## 2.2. FISIOLÓGÍA DEL CORAZÓN

El corazón, funcionalmente, está formado por dos bombas separadas por un tabique. La bomba derecha recibe la sangre desoxigenada del cuerpo y la bombea hacia los pulmones. La bomba izquierda recibe la sangre oxigenada de los pulmones y la envía hacia los órganos periféricos. Cada bomba está formada por una aurícula y un ventrículo, separados por una válvula, como se puede observar en la Figura 1 (Drake, Vogl & Mitchell, 2010).

Las aurículas presentan paredes delgadas y reciben la sangre que llega al corazón; en cambio, los ventrículos tienen paredes relativamente más gruesas pues son los que bombean la sangre fuera del corazón (Guyton & Hall, 2011).

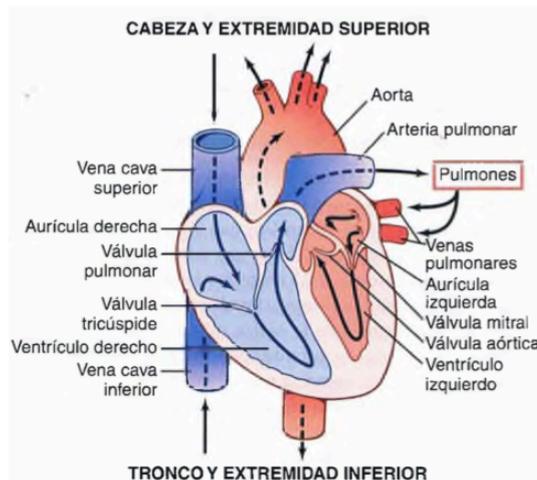


Figura 2: Estructura del corazón y trayecto del flujo sanguíneo a través de las cavidades cardíacas y de las válvulas cardíacas. Fuente: tomada de (Guyton & Hall, 2011).

Se requiere más fuerza para bombear la sangre a través del cuerpo que a través de los pulmones. Por este motivo, la pared muscular del ventrículo izquierdo es más gruesa que la del derecho (Drake, Vogl & Mitchell, 2010).

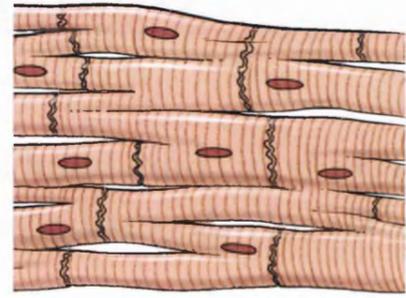
El corazón está formado principalmente por tres tipos de músculo cardíaco: músculo auricular, músculo ventricular y fibras musculares especializadas de excitación y de conducción. Estas últimas se contraen débilmente pues contienen pocas fibrillas contráctiles; no obstante, presentan descargas eléctricas rítmicas automáticas en forma de potenciales de acción por todo el corazón, formando, de esta manera, un sistema excitador que controla el latido rítmico cardíaco (Guyton & Hall, 2011).

### 2.2.1. Histología del músculo cardíaco

La Figura 2 muestra la histología del músculo cardíaco, la cual presenta las fibras musculares cardíacas dispuestas en forma de retículo, de manera que éstas se dividen, se vuelven a combinar y se separan de nuevo. Asimismo, este músculo posee miofibrillas, las cuales

contienen filamentos de actina y miosina; dichos filamentos están unos al lado de otros y se deslizan entre sí durante la contracción.

Las zonas oscuras que atraviesan las fibras musculares cardíacas de la Figura 2 se denominan discos intercalares; estos son membranas celulares que separan las células musculares cardíacas entre sí, lo que significa que las fibras musculares del corazón están formadas por muchas células individuales conectadas física y eléctricamente entre sí, en serie y en paralelo. En cada uno de los discos intercalares, las membranas celulares se fusionan entre sí formando uniones



*Figura 3: Naturaleza interconectada de las fibras del músculo cardíaco. Fuente: tomada de (Guyton & Hall, 2011).*

comunicantes permeables, las cuales permiten una rápida difusión de iones. Por lo tanto, los iones se mueven con facilidad en el líquido intracelular a lo largo del eje longitudinal de las fibras musculares cardíacas. Es por este motivo que los potenciales de acción pueden transmitirse fácilmente desde una célula cardíaca a la siguiente, a través de los discos intercalares. Podemos concluir, por tanto, que el músculo cardíaco es un conjunto de muchas células musculares cardíacas las cuales están tan interconectadas entre sí que cuando una de ellas se excita, el potencial de acción se propaga de una a otra (Guyton & Hall, 2011).

### 2.2.2. Sistema de estimulación y conducción

El sistema de conducción del corazón es el responsable de generar y transmitir los impulsos que producen las contracciones coordinadas del ciclo cardíaco. Está formado por tejido nodal, el cual inicia el latido y coordina las contracciones de las cuatro cavidades cardíacas, y por fibras de conducción, que conducen dichas contracciones rápidamente a las distintas áreas del corazón. Los impulsos se propagan por las células del músculo cardíaco permitiendo que las paredes de todas las cavidades se contraigan al unísono. El nodo sinoauricular inicia y regula los impulsos para las contracciones del corazón. Este nodo transmite el impulso eléctrico tanto a las aurículas como al nódulo AV, el cual conduce el impulso con cierto retraso hasta el haz o fascículo AV, que conecta eléctricamente las aurículas y los ventrículos. El haz AV se bifurca en dos ramas que pasan profundas al endocardio junto a la porción muscular del tabique interventricular y que, a su vez, resultan en ramas subendocárdicas formadas por fibras de Purkinje. Éstas son responsables de transmitir el estímulo a las paredes ventriculares, los músculos del tabique interventricular y los músculos papilares (Moore, Dalley & Agur, 2013).

## 2.3. BIOELECTRICIDAD CARDÍACA Y MODELOS MATEMÁTICOS DEL POTENCIAL DE ACCIÓN

### 2.3.1. Conducción a través de la membrana celular

Tanto el medio intracelular como el extracelular se componen de agua y de portadores de carga (iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  o  $\text{Ca}^{+2}$ ) disueltos. Esto deriva en un carácter eléctricamente conductor de ambas soluciones, las cuales están separadas por la membrana celular del cardiomiocito. Debido a la naturaleza lipídica de la membrana, ésta presenta un comportamiento aislante respecto a

ambos fluidos. Por lo tanto, la membrana celular y los medios extra e intracelulares equivalen a un condensador eléctrico que presenta distintos potenciales a cada lado pues la concentración de iones positivos y negativos es distinta en cada uno de los fluidos (Guyton & Hall, 2011).

Debido a las diferencias de concentraciones iónicas, se genera, a su vez, una diferencia de potencial a ambos lados de la membrana celular, llamada potencial de membrana ( $V_m$ ). Éste es, por definición, la diferencia entre el potencial intracelular y el extracelular. Asimismo, ello implica que las corrientes salientes de la célula serán positivas mientras que las corrientes entrantes serán consideradas negativas.

Los iones son capaces de atravesar la membrana circulando a través de canales iónicos, intercambiadores, co-transportadores y bombas, los cuales son proteínas incrustadas en ella y constituyen mecanismos de conducción iónica a través de la membrana celular (Figura 3). Existen dos mecanismos de conducción iónica según necesiten o no, el aporte de energía externa para funcionar. Los canales iónicos, intercambiadores y los co-transportadores son mecanismos pasivos; es decir, no necesitan energía externa. En cambio, las bombas son mecanismos activos que sí requieren aporte de energía. Todos estos mecanismos de conducción iónica son los responsables de establecer y mantener los gradientes de concentración de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{+2}$  a través de la membrana.

El mecanismo básico de extracción de  $\text{Na}^+$  e introducción de  $\text{K}^+$  en la célula es la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , la cual extrae tres iones de sodio de la célula e introduce dos iones de potasio. En ambos casos actúa en contra del gradiente de concentración, por lo que necesita energía que extrae de la desfosforilación del ATP.

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  extrae un ion  $\text{Ca}^{+2}$  e introduce 3  $\text{Na}^+$ . Para mover el  $\text{Ca}^{+2}$  en contra de su gradiente de difusión, aprovecha el gradiente de concentración favorable al  $\text{Na}^+$  y por ello no necesita energía externa. Éste es el mecanismo básico de extracción de  $\text{Ca}^{+2}$  de la célula.

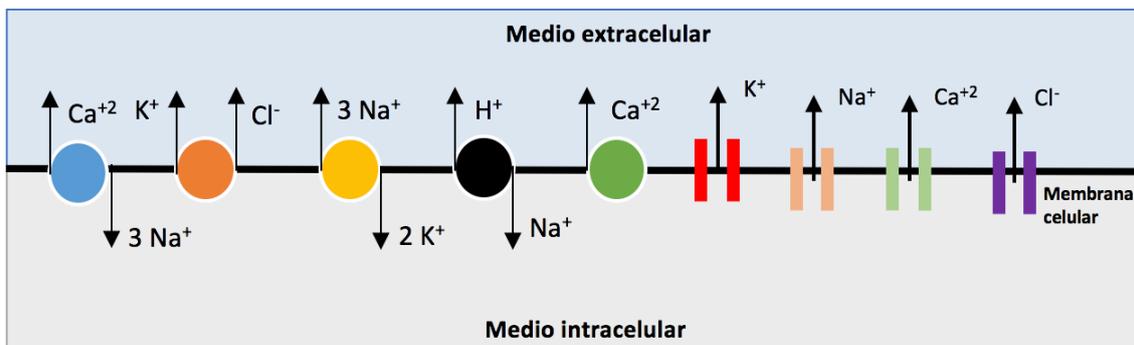


Figura 4: Moléculas de membrana transportadoras. En azul, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ ; en naranja, co-transportador  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ ; en amarillo, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; en negro, el intercambiador  $\text{H}^+/\text{Na}^+$ ; en rojo, un canal iónico de  $\text{K}^+$ ; en naranja un canal de  $\text{Na}^+$ ; en verde, un canal de  $\text{Ca}^{+2}$ ; en morado, un canal de  $\text{Cl}^-$ . Fuente: elaboración propia

Los canales iónicos poseen un poro central a través del cual pueden circular los iones de manera selectiva, siempre que el canal esté en estado abierto. Las fuerzas que impulsan a los iones a través de estos canales pueden ser de dos tipos: de difusión (debido a la diferencia de concentraciones iónicas a través de la membrana) o de campo eléctrico (debido a la existencia

de un potencial de membrana) (Ferrero, Corral, 1994). Como se puede observar en la Figura 4, el sentido de las fuerzas de difusión es el siguiente: empujan al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{+2}$  hacia el medio intracelular y al  $\text{K}^+$  hacia el exterior celular. Además, el sentido de este tipo de fuerzas nunca cambia a lo largo de la vida de la célula. Por el contrario, el sentido de las fuerzas de campo eléctrico cambia alternativamente durante cada potencial de acción, como se observa en la Figura 5.

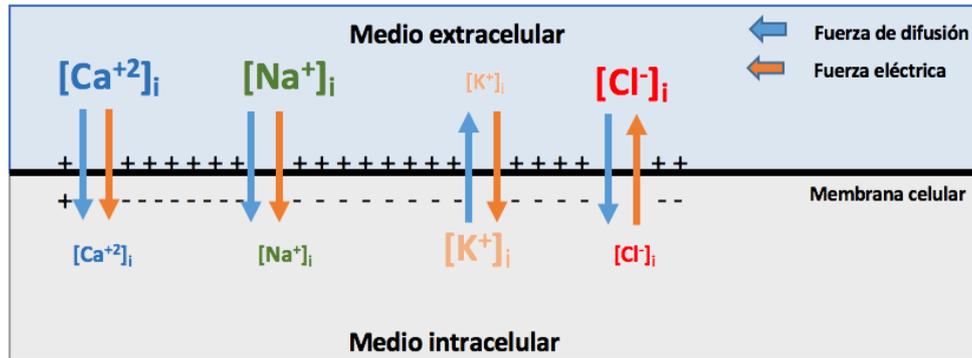


Figura 5: Principales iones en los fenómenos eléctricos cardíacos. Fuerzas eléctricas y de difusión en un potencial de reposo. Fuente: elaboración propia

La resultante de ambas fuerzas genera las siguientes tendencias de movimiento en los iones: el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{+2}$  tienden a entrar en la célula durante el estado de reposo y en la parte inicial del potencial de acción, mientras que el  $\text{K}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  tienden a salir de la célula en la fase intermedia de dicho potencial.

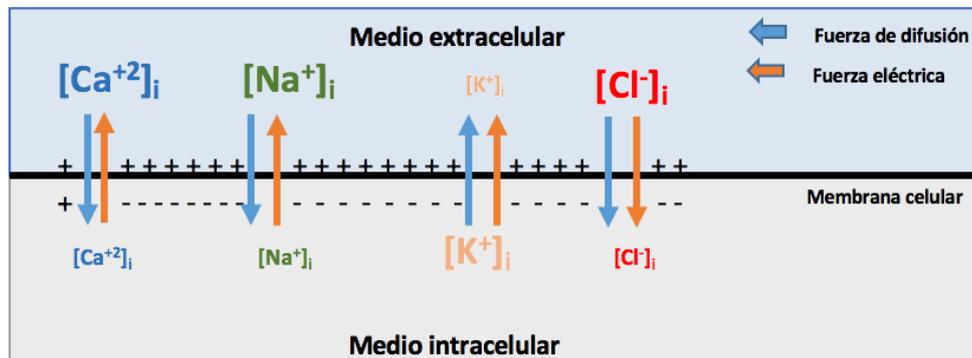


Figura 6: Principales iones en los fenómenos eléctricos cardíacos. Fuerzas eléctricas y de difusión en un potencial de acción. Fuente: elaboración propia

### 2.3.2. Conducción a través de los canales iónicos

En primera aproximación, el comportamiento de un canal iónico se asemeja al funcionamiento de una resistencia variable como elemento eléctrico, pues soporta tensiones a ambos lados y, por lo tanto, presenta una diferencia de potencial (Figura 6).

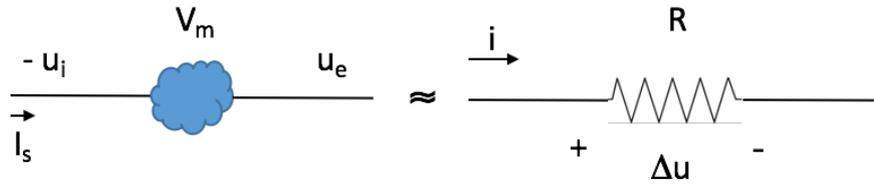


Figura 7: Comportamiento resistivo de un canal iónico. Fuente: elaboración propia

Podemos definir, a continuación, la densidad de corriente para un ion determinado que atraviesa la membrana celular a través de un canal iónico, mediante la siguiente ecuación (Ferrero Corral, 1994):

$$\vec{j} = z \cdot F \cdot C \cdot \mu \cdot \frac{d\vec{F}}{dm} \quad (1)$$

siendo  $z$  la valencia del ion;  $F$ , la constante de Faraday, o lo que es lo mismo, carga transportada por un mol de partículas con valencia  $\pm 1$  en valor absoluto;  $C$ , la concentración del ion;  $\mu$ , la movilidad del medio y  $\frac{d\vec{F}}{dm}$  la velocidad.

Teniendo en cuenta tanto la fuerza de difusión como la de campo eléctrico, la densidad de corriente total será la suma de las densidades de corriente generadas por cada una de las dos fuerzas (Ferrero Corral, 1994), obteniendo:

$$\vec{J}_{D,s} = z \cdot F \cdot C \cdot \mu \cdot \frac{d\vec{F}_D}{dm} = z \cdot F \cdot R \cdot T \cdot \mu \cdot \vec{\nabla}C \quad (2)$$

$$\vec{J}_{E,s} = z \cdot F \cdot C \cdot \mu \cdot \frac{d\vec{F}_E}{dm} = -z^2 \cdot F^2 \cdot \mu \cdot C_s \cdot \vec{\nabla}U \quad (3)$$

$$\vec{J}_s = J_{D,s} + \vec{J}_{E,s} = -\mu_s \cdot F \cdot z_D (R \cdot T \cdot \vec{\nabla}C + F \cdot z_D \cdot C_s \cdot \vec{\nabla}U) \quad (4)$$

siendo  $R$  la constante universal de los gases J·mol/K; la temperatura,  $T$ , en grados Kelvin y  $\vec{\nabla}$ , que representa tanto el gradiente de concentración ( $C$ ) como el de potencial ( $U$ ).

De la última ecuación (4) se deduce que el potencial de equilibrio de un ion determinado se alcanzará cuando la densidad de corriente valga cero, esto es, cuando las dos fuerzas valgan lo mismo pero tengan sentidos opuestos (Ferrero Corral, 1994). De aquí se obtiene la siguiente ecuación:

$$E_s = u_i - u_e = \frac{R \cdot T}{z_s \cdot F} \cdot \ln \frac{[S]_e}{[S]_i} \quad (5)$$

siendo  $[S]_e$  y  $[S]_i$  las concentraciones del ion en cuestión en el medio extra e intracelular, respectivamente;  $u_i$  y  $u_e$  equivalen a los potenciales intra y extracelular, respectivamente.

Teniendo en cuenta tanto las ecuaciones anteriores como el circuito eléctrico que representa cómo funciona un canal iónico (Figura 7), la corriente iónica que atraviesa un canal iónico queda definida de la siguiente forma (Ferrero Corral, 1994):

$$i_s = \frac{z_s^2 \cdot F^2}{\int_i^e \frac{dx}{A_c(x)\mu_s(x)C_s(x)}} \cdot (V_m - E_s) = \gamma_s \cdot (V_m - E_s) \quad (6)$$

siendo  $A_c$  el área transversal del canal y  $\gamma_s$  la conductancia unitaria del mismo.

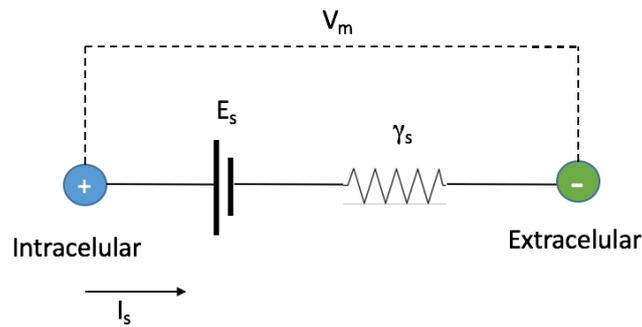


Figura 8: Circuito eléctrico equivalente a un canal iónico. Fuente: elaboración propia

No obstante, cualquier tipo de célula excitable, y en particular, los cardiomiocitos, se componen de poblaciones de canales iónicos, no de un único canal. Si seleccionamos una población de un tipo de canal determinado y suponiendo que todos los canales sean idénticos, ésta se podría representar como un conjunto de circuitos como el de la Figura 8, todos ellos conectados en paralelo. En un instante en particular, los canales  $n$  de la misma familia podrían estar abiertos (por los cuales circularía la corriente) o cerrados, de forma que definimos (Ferrero Corral, 1994):

$$f_s(V_m, t) = \frac{N^{\circ} \text{ canales iónicos abiertos}(V_m, t)}{N^{\circ} \text{ total de canales iónicos de una familia}} \quad (7)$$

siendo  $f_s$  la probabilidad de encontrar un canal abierto. El número de canales abiertos depende del tiempo ya que en cada instante habrá un potencial distinto, por lo que  $f_s$  dependerá tanto del tiempo como del  $V_m$ . Así pues, conociendo  $f_s$  y el número de canales de una familia ( $N_s$ ), se obtiene la conductancia de esa población de canales,  $g_s(V_m, t)$ . Con esto y partiendo de la corriente generada en un único canal, se deduce la corriente iónica para un tipo de ion a través de toda la membrana celular (Ferrero Corral, 1994):

$$I_s = N_s \cdot \gamma_s(V_m) \cdot f_s(V_m, t) = g_s(V_m, t) \cdot (V_m - E_s) \quad (8)$$

En conclusión, el circuito eléctrico que representa el comportamiento de la célula completa sería el que se representa en la Figura 8:

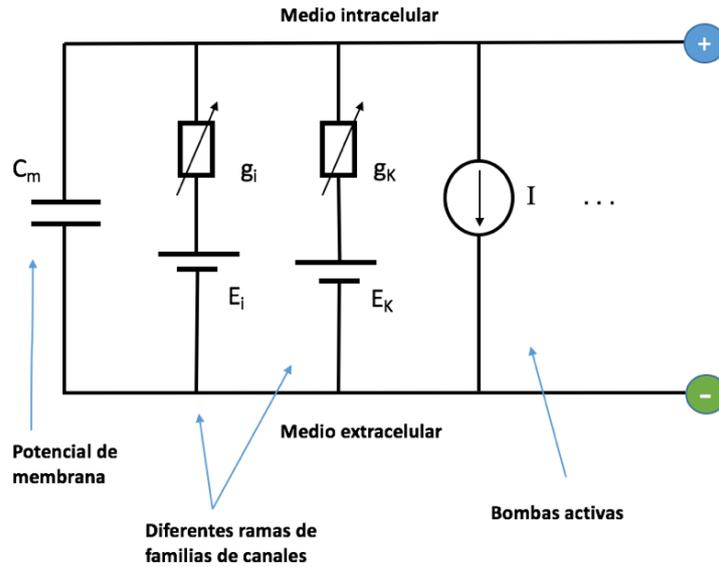


Figura 9: Circuito eléctrico equivalente a la membrana celular completa. Fuente: elaboración propia

Y matemáticamente, podemos definir cómo se comporta la membrana celular de toda una célula considerando las corrientes iónicas de las distintas poblaciones de canales, la capacidad de la membrana celular,  $C_m$ , la corriente procedente de los estímulos externos generados por las células vecinas y por el resto de mecanismos de transporte que tienen lugar a través de la membrana (Ferrero Corral, 1994) de la siguiente forma:

$$C_m \frac{dV_m}{dt} + \sum_s g_s(V_m, t) \cdot (V_m - E_s) + \sum_{B,I} I_{B,I} + I_{estímulo} = 0 \quad (9)$$

Cuando el potencial de membrana sea constante en el tiempo (Ferrero Corral, 1994), la célula estará en su potencial de reposo; esto ocurrirá cuando la densidad de corriente neta que atraviesa la membrana sea nula. En el caso particular de una célula miocárdica, el potencial de reposo tiene un valor aproximadamente igual al potencial de equilibrio del  $K^+$ , debido a que los canales iónicos de potasio permanecen abiertos durante el reposo celular.

### 2.3.3. Modelado de las corrientes iónicas

Las diferentes  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -hélices que constituyen las proteínas – canal pueden desplazarse y girar en respuesta a cambios en el potencial de membrana ya que pueden poseer carga eléctrica. Como resultado de esos movimientos, un canal iónico puede abrirse o cerrarse, y la probabilidad de que lo haga depende del potencial de membrana. Se dice, por tanto, que un canal tiene compuertas de activación (se abren) o inactivación (se cierran) al variar el  $V_m$  (Thakor et al., 1998).

La apertura o el cierre de una compuerta es un proceso de primer orden regido por una ecuación diferencial ordinaria, de primer orden y coeficientes  $f_\infty(V_m)$  y  $\tau_f(V_m)$ :

$$\frac{df_s}{dt} = \alpha_s \cdot (1 - f_s) - \beta_s \cdot f_s \quad (10)$$

siendo  $\alpha_s$  la tasa de apertura del canal y  $\beta_s$  la tasa de cierre del mismo. Ambas tasas dependen del potencial de membrana, lo que confiere a la conductancia equivalente del canal carácter no lineal.

El término  $f_\infty$  de la ecuación diferencial de una compuerta representa la fracción estacionaria de compuertas abiertas. Este término puede ser creciente con el potencial de membrana, y en tal caso la compuerta tenderá a abrirse al aumentar  $V_m$  y se tratará, por tanto, de una compuerta de activación; por el contrario, si decrece con el potencial, la compuerta tenderá a cerrarse cuando el  $V_m$  crezca y será una compuerta de inactivación. El término  $\tau_f$  de la ecuación diferencial de una compuerta representa la constante de tiempo de apertura o cierre de la misma. Obtenemos estas dos expresiones igualando la ecuación (10) a cero:

$$f_\infty(V_m) = \frac{\alpha_s(V_m)}{\alpha_s(V_m) + \beta_s(V_m)} \quad (11)$$

$$\tau_f(V_m) = \frac{1}{\alpha_s(V_m) + \beta_s(V_m)} \quad (12)$$

### 2.3.4. Potencial de acción en el músculo cardíaco

Podemos definir, ahora sí, el potencial de acción (PA) como la variación transitoria del potencial de membrana que resulta de una sucesión de aperturas y cierres de distintos tipos de canales iónicos. En efecto, el potencial de membrana variará en el tiempo debido a los cambios en las corrientes iónicas tanto positivas como negativas que atravesarán la misma. En particular, el potencial de acción en los cardiomiocitos se puede dividir en cuatro fases (Ferrero Corral 1994) observables en la Figura 9:

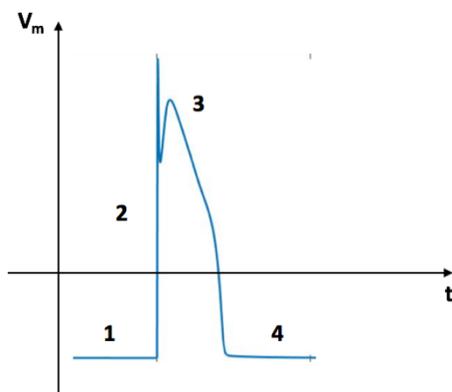


Figura 10: Potencial de acción en los cardiomiocitos. Fase 1: célula en reposo; Fase 2: despolarización; Fase 3: meseta y repolarización; Fase 4: vuelta al reposo. Fuente: elaboración propia.

1. Inicialmente, la célula se encuentra en reposo ya que la mayoría de los canales iónicos están cerrados.

2. El potencial de acción en el músculo cardíaco se inicia por la apertura de dos tipos de canales: 1) los canales rápidos de sodio, los cuales permiten que grandes cantidades de  $\text{Na}^+$  entren en la célula desde el líquido extracelular y 2) los canales lentos de calcio, también denominados canales de calcio de tipo L. Estos se diferencian de los anteriores en que se abren con mayor lentitud y, lo que es más importante, permanecen abiertos durante varias décimas de segundo, mientras que los primeros se abren únicamente durante unas milésimas de

segundo antes de inactivarse (Guyton & Hall, 2011).

3. Cuando el potencial de acción alcanza su valor máximo, las compuertas de inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  se cierran y comienzan a abrirse los canales de  $\text{K}^+$ . Mientras que los canales de calcio de tipo L permanecen abiertos, pasa una gran cantidad de iones  $\text{Ca}^{+2}$  al interior de la fibra muscular cardíaca, lo que mantiene un periodo prolongado de

despolarización y da lugar a la meseta del potencial de acción. Asimismo, los iones de calcio que entran durante la fase de meseta son los responsables de activar el proceso contráctil del músculo, fenómeno que resulta muy relevante en este Trabajo Fin de Grado.

4. Cuando los canales lentos de calcio se cierran por inactivación, aumenta rápidamente la permeabilidad de la membrana a los iones  $K^+$ , devolviendo inmediatamente el potencial de membrana a su nivel de reposo y finalizando, así, el potencial de acción (Guyton & Hall, 2011).

## 2.4. EL PAPEL DEL CALCIO EN LOS CARDIOMIOCITOS

### 2.4.1. Acoplamiento excitación – contracción

La contracción muscular es un proceso que depende, en gran medida, de la concentración de  $Ca^{+2}$  libre en el citoplasma que se encuentra a su vez regulada en gran medida por el retículo sarcoplásmico, pues ejerce como depósito de iones calcio, los cuales se liberarán cuando el cardiomiocito se contraiga.

El retículo sarcoplásmico (RS) es un sistema extenso de conductos limitados por membranas intracelulares que rodean, sin tocarla, a cada miofibrilla, formando una cisterna repleta de calcio. Cada segmento del RS empieza y acaba en una cisterna terminal la cual, junto con las invaginaciones membranales llamadas túbulos transversos (túbulos T), forman unas estructuras llamadas tríadas o RS de unión (JRS). Aquellas regiones del retículo que no se encuentran próximas a los túbulos T se denominan RS longitudinal (LRS) y las cuales presentan la función de transportar el  $Ca^{+2}$  al interior del RS durante la relajación muscular.

Las principales proteínas que participan en los procesos de captación, almacenaje y liberación de iones calcio en y desde el RS son la ATPasa de  $Ca^{+2}$  (SERCA) y el canal de liberación de  $Ca^{+2}$  denominado receptor de rianodina (RyR) (Reyes-Juárez & Zarain-Herzberg, 2006).

Denominamos al mecanismo mediante el cual el potencial de acción provoca la contracción de las miofibrillas musculares como <<acoplamiento excitación – contracción>>. Cuando se produce la despolarización del potencial de acción, los canales de calcio tipo L (CaL) presentes en los túbulos T se abren, lo que implica que el  $Ca^{+2}$  entre del espacio extracelular al subespacio con el objetivo de contraer las miofibrillas, pero la cantidad de calcio que entra por CaL no es suficiente. Entonces, intervienen los canales de RyR, los cuales se abren cuando detectan una subida de la concentración de  $Ca^{+2}$  produciéndose una salida masiva de calcio desde el depósito, que sí conseguirá llegar a las miofibrillas y provocar la contracción.

Sin el calcio procedente de los túbulos T, la fuerza de la contracción del músculo cardíaco se reduciría de manera considerable, pues el retículo sarcoplásmico del músculo cardíaco no almacena el calcio suficiente como para generar una contracción completa (Guyton & Hall, 2011).

Al final de la meseta del potencial de acción cardíaco se interrumpe de forma súbita la entrada de  $Ca^{+2}$  hacia el interior de la fibra muscular y los iones calcio del sarcoplasma se bombean rápidamente hacia el exterior de las fibras musculares, hacia el RS y hacia el espacio de los

túbulos T – líquido extracelular (Figura 10). El  $\text{Ca}^{+2}$  se elimina de la célula mediante el intercambiador sodio – calcio ( $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ )(NCX), el cual introduce  $\text{Na}^{+2}$  al interior de la célula y expulsa  $\text{Ca}^{+2}$  (Guyton & Hall, 2011).

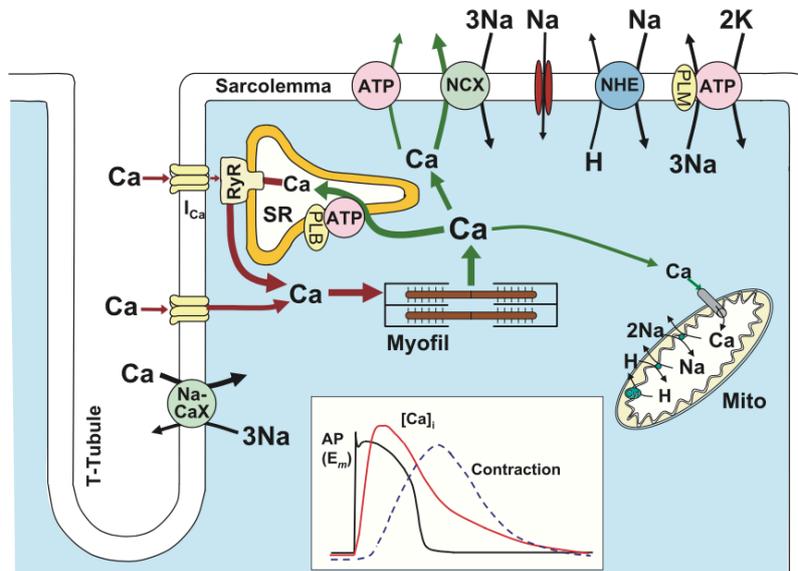


Figura 11: Mecanismos para acoplamiento de excitación - contracción y relajación en el músculo cardíaco. Transporte del  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Na}^{+}$  en miocitos ventriculares. La gráfica muestra el potencial de acción (AP) respecto al tiempo, el transitorio de calcio y la contracción medida en un miocito ventricular de conejo a  $37^{\circ}\text{C}$ . Siendo NCX el intercambiador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ ; ATP, ATPasa; PLB, fosfolambano; PLM, fosfolemán; SR, retículo sarcoplásmico. Fuente: tomada de (Bers & Despa, 2006).

He aquí una de las razones que ha motivado este trabajo, pues resulta fundamental estudiar la importancia de la regulación del calcio intracelular que, como se ha comentado anteriormente, juega un papel imprescindible en la contracción muscular y, por tanto, en la actividad contráctil del corazón.

#### 2.4.2. Influencia de las mutaciones en la dinámica de $\text{Ca}^{+2}$

Resulta interesante, por tanto, analizar aquellos aspectos que puedan modificar el funcionamiento de todos los mecanismos que intervienen en la liberación del  $\text{Ca}^{+2}$  durante cada potencial de acción. Por ejemplo, según Neco et al., 2012, se demostró que una mutación presente en los canales de liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  del receptor de rianodina en la membrana del RS de ratón provocaba una actividad ralentizada de las células marcapasos presentes en el nodo sinusal (Capel & Terrar, 2015).

Un estudio reciente de Glukhov et al., 2015 corrobora también que la actividad de las células creadoras del potencial de acción se ve alterada cuando se les elimina a ciertos ratones la proteína calsequestrina, que está presente en el RS y actúa como tampón (buffer) de calcio y que juega un papel fundamental en el proceso de acoplamiento excitación – contracción, expuesto anteriormente. Estos ratones mostraron bradicardia y una variabilidad en la frecuencia cardíaca latido a latido. Además, mostraron una tasa inestable con frecuentes pausas entre “trenes” de potenciales de acción. Este comportamiento anormal se asoció con la liberación anómala de  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo sarcoplásmico. En concreto, las pausas fueron acompañadas por

niveles elevados de concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  diastólico. Los autores de dicho estudio propusieron que dichas pausas observadas entre los transitorios de  $\text{Ca}^{+2}$  eran causadas por una liberación excesiva de  $\text{Ca}^{+2}$  sarcoplásmico que, a su vez, fueron consecuencia de a) inhibición de la corriente  $I_{\text{CaL}}$  y/o b) disminución en el contenido de  $\text{Ca}^{+2}$  presente en el SR por debajo de un nivel umbral necesario para la generación de liberaciones espontáneas de dichos iones calcio (Capel & Terrar, 2015).

#### 2.4.3. Influencia de los fármacos en la dinámica de $\text{Ca}^{+2}$

Vinogradova et al., 2000, demostraron la evidencia de que el uso de fármacos selectivos jugaba un papel importante en el mantenimiento y la regulación de la actividad del marcapasos en el nodo sinusal de conejo. En particular, se centraron en una enzima dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  para la que hay evidencias muy convincentes sobre su importancia durante cada potencial de acción, que es la CaMKII. En dicho estudio se recalcó que la enzima en cuestión tiene propiedades para trabajar como un detector de frecuencia y por eso es muy adecuado para la regulación de la actividad de las células marcapasos. El inhibidor de CaMKII KN93 (pero no su análogo activo, KN92) ralentizó considerablemente o incluso detuvo la actividad del marcapasos (Capel & Terrar, 2015).

El fosfolambano regula la captación de  $\text{Ca}^{+2}$  en el retículo sarcoplásmico también ha sido objeto de estudio. Xie et al., 2015, estudiaron los efectos de KN93, KN92 y el péptido inhibidor de la autocalmitina (AIP) sobre los potenciales de acción espontáneos en miocitos del nodo sinusal de cobaya, obteniendo resultados muy similares a los del conejo (Capel & Terrar, 2015).

#### 2.4.4. Influencia de la dinámica de $\text{Ca}^{+2}$ en las arritmias cardíacas

En ocasiones, el latido de las aurículas no está coordinado con el de los ventrículos, de manera que las aurículas no ejercen como bombas de llenado de los ventrículos, provocando una alteración de la función cardíaca denominada arritmia. Las causas de las arritmias cardíacas suelen ser una de las siguientes alteraciones del sistema de ritmicidad – conducción del corazón, o una combinación de ellas (Guyton & Hall, 2011):

- Ritmicidad anormal del marcapasos
- Desplazamiento del marcapasos desde el nodo sinusal a otra parte del corazón
- Bloqueos en distintos puntos de la propagación del impulso a través del corazón
- Vías anormales de transmisión del impulso
- Generación espontánea de impulsos anormales en casi cualquier parte del corazón.

Las células del nodo sinusal, así como algunas células en las aurículas, el nódulo AV y el sistema His-Purkinje poseen la propiedad de la actividad del marcapasos o la automaticidad. Como ya se ha introducido, en estas células se pueden originar descargas eléctricas en forma de potenciales de acción de manera espontánea, sin la necesidad de cualquier aporte de energía o estímulo externo. Esta actividad de marcapasos espontánea se ve afectada por el comportamiento iónico. En particular, una acumulación excesiva de  $\text{Ca}^{+2}$  es un riesgo para las células ya que induce la posible existencia de arritmias.

En ocasiones puede ocurrir que a partir de un potencial de acción se originen espontáneamente una serie de latidos cardíacos, y que estos provoquen una despolarización posterior que alcance

el umbral de activación y se inicie un nuevo potencial antes de que el anterior haya terminado (Jalife et al., 2011).

Existen dos posibles fenómenos: las postdespolarizaciones tempranas (EADs) y las postdespolarizaciones tardías (DADs) (véase Figura 11).

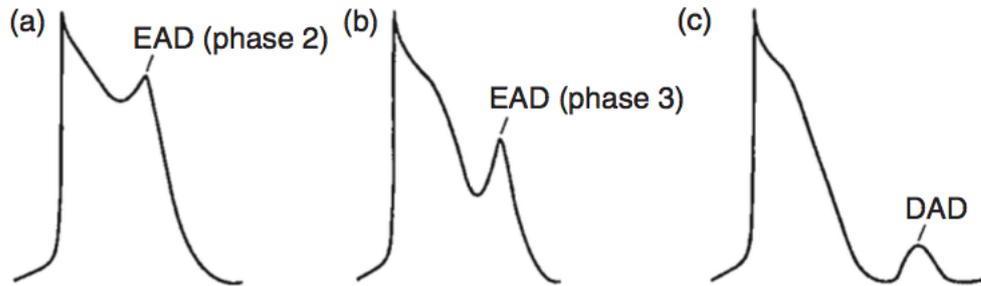


Figura 12: a) postdespolarización temprana (EAD) en la fase 2 del PA; b) postdespolarización temprana (EAD) en la fase 3 del PA; c) postdespolarización tardía (DAD). Fuente: tomada de (Jalife et al., 2011).

Tanto las EADs como las DADs pueden dar lugar a potenciales de acción prematuros pudiendo causar arritmias cardíacas.

### **3. OBJETIVOS**

En vista de todo lo expuesto en el capítulo de Introducción, se ha considerado que es de interés el desarrollo de un paquete software que permita simular los efectos de las variaciones de las corrientes iónicas en la dinámica del calcio. Por ello, los objetivos del presente Trabajo Fin de Grado pueden enunciarse como sigue:

OBJETIVO 1: Desarrollar un paquete software que permita simular computacionalmente las corrientes iónicas, el potencial de acción y la evolución temporal de la concentración intracelular de calcio, basado en el modelo matemático de Decker-Rudy (Decker et al. 2009) que corresponde a un cardiomiocito ventricular aislado de epicardio de perro.

OBJETIVO 2: Utilizar el software desarrollado para simular el efecto que ejercen sobre la concentración intracelular de calcio las variaciones en las corrientes iónicas a través de los canales iónicos, intercambiadores iónicos y bombas iónicas tanto del sarcolema como del retículo sarcoplásmico. Dichas variaciones serían, en un caso real, consecuencia bien del efecto de fármacos o bien del efecto de mutaciones genéticas.

OBJETIVO 3: Cuantificar, mediante un análisis sistemático de sensibilidad basado en índices definidos a tal efecto, los efectos de dichas variaciones sobre un conjunto de biomarcadores preclínicos de calcio definidos a partir de la curva de evolución temporal de calcio obtenida mediante el software desarrollado.

## **4. DESARROLLO DEL SOFTWARE**

En este capítulo se explican los métodos y los recursos que se han desarrollado para poder diseñar el software de simulación de potenciales de acción, corrientes iónicas y concentración de calcio mencionado en los objetivos y que se controla gracias a una interfaz gráfica de usuario (GUI). El software se ha desarrollado en lenguaje MATLAB®. Gracias a dicha interfaz, se ha creado una herramienta capaz de estudiar y simular el efecto que tanto fármacos como mutaciones pueden ejercer sobre la regulación intracelular de calcio, el cual es fundamental en la contracción cardíaca y en la arritmogénesis. En concreto, se ha seleccionado un modelo matemático de cardiomiocito ventricular de perro por ser este animal muy utilizado en experimentación debido a la similitud entre sus potenciales de acción cardiacos y los correspondientes a corazón humano.

Una vez seleccionado el modelo, se ha desarrollado un programa MATLAB que permite computar, mediante métodos numéricos que se describirán más adelante, los potenciales de acción, corrientes iónicas y transitorias de calcio en presencia de distintas variaciones de las corrientes iónicas, bloqueando y/o potenciando las mismas (es decir, multiplicando dichas corrientes por factores menores que la unidad, para reducir, o mayores que la unidad, para potenciar), lo cual deriva en unos valores de la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{+2}]_i$ ) diferentes según las distintas variaciones.

Gracias a la herramienta GUIDE de MATLAB, se ha diseñado una interfaz gráfica usuario (GUI) que controla el software de cálculo y que permite introducir los parámetros de entrada, ejecutar el modelo y obtener mediante gráficas los resultados que caracterizan el estado celular.

Por último, se ha realizado en modo *post*-proceso un análisis de sensibilidad para poder estudiar, de forma más intuitiva, la relevancia de cada corriente en la regulación intracelular del calcio.

Todos los aspectos mencionados del software desarrollado se detallan en el resto de este capítulo.

### **4.1. MODELO COMPUTACIONAL DE EPICARDIO CANINO**

Para poder realizar todas las simulaciones en cardiomiocitos ventriculares caninos se ha empleado el modelo de Decker – Rudy (Decker et al., 2009), el cual representa un rango muy amplio de comportamientos dependientes de la frecuencia de estimulación observados experimentalmente en la célula y el tejido cardíaco, incluyendo el potencial de acción, la duración del mismo (APD), la adaptación, restitución y acomodación.

En particular, este modelo considera las corrientes iónicas, distinguiendo entre aquellos canales, bombas o intercambiadores presentes en la membrana celular y las que se encuentran en el retículo sarcoplásmico. Las corrientes presentes en el modelo aparecen en la Figura 12 y son las siguientes:

- $I_{Na,L}$ , componente lenta de la corriente de  $Na^+$
- $I_{Na}$ , corriente de  $Na^+$
- $I_{Na,b}$ , corriente de fondo de  $Na^+$
- $I_{NaCa,i}$ , intercambiador  $Na^+/Ca^{+2}$
- $I_{Cab}$ , corriente de fondo de  $Ca^{+2}$
- $I_{pca}$ , bomba de  $Ca^{+2}$  presente en el sarcolema
- $I_{to1}$ , corriente transitoria de salida
- $I_{Kr}$ , componente rápida de la corriente de  $K^+$
- $I_{Ks}$ , componente lenta de la corriente de  $K^+$
- $I_{K1}$ , corriente de  $K^+$  dependiente del tiempo
- $I_{NaK}$ , corriente de la bomba  $Na^+/K^+$
- $CT_{NaCl}$ , co-transportador  $Na^+/Cl^-$
- $CT_{KCl}$ , co-transportador  $K^+/Cl^-$
- $I_{Ca,L}$ , corriente del canal de  $Ca^{+2}$  tipo L
- $I_{to2}$ , corriente de salida transitoria de  $Cl^-$  dependiente del  $Ca^{+2}$
- $I_{NaCa,ss}$ , intercambiador  $Na^+/Ca^{+2}$  (localizado en el subespacio del RS)
- $I_{diff,ss}$ , difusión iónica del subespacio al subespacio local de  $I_{CaL}$
- $I_{rel}$ , corriente de liberación del JSR
- $I_{tr}$ , transferencia de  $Ca^{+2}$  del NSR al JSR
- $I_{leak}$ , corriente de fuga del NSR

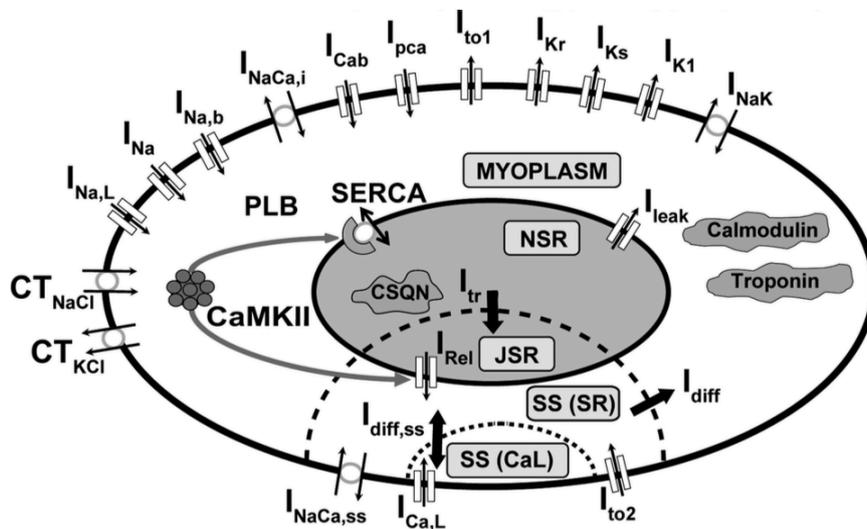


Figura 13: Modelo dinámico de Hund-Rudy del miocito epicárdico canino. Véanse en el texto las abreviaturas. Fuente: tomada de (Decker et al., 2009).

En la Figura 13 se pueden observar también los cuatro subespacios en los que se divide la célula según este modelo: el subespacio más pequeño es aquel que se encuentra más próximo a los

canales de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L (SS (CaL)); el siguiente, el subespacio cercano al retículo sarcoplásmico (SS (SR)); y por último se distinguen el retículo sarcoplásmico de unión (JSR) y el de red (NSR).

Asimismo, aparecen una serie de proteínas que hacen de tampones del  $\text{Ca}^{+2}$ , a las cuales dicho ion se unirá para poder ser transportado. Éstas son la calmodulina, troponina y calsequestrina. Se contemplan a su vez la kinasa de  $\text{Ca}^{+2}$  dependiente de la calmodulina, la bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) y el fosfolambano (PLB).

Por último, cabe recalcar que este modelo se compone de 46 variables de estado, entre las que se encuentran el  $V_m$ , o iones como el  $\text{K}_i$ ,  $\text{Na}_i$ ,  $\text{Cl}_i$ ,  $\text{Ca}_i$  o el calcio intracelular presente en el NSR o JSR, y las cuales dependen del tiempo. Ello equivale a decir que el modelo está constituido por un sistema de 46 ecuaciones diferenciales no lineales del tipo descrito en los apartados 2.3.2. y 2.3.3. de esta memoria. Además, incluye una serie de constantes necesarias para poder calcular las diferentes variables que contiene el modelo, como son las corrientes iónicas.

En las simulaciones originales realizadas por Decker, se comprobó que  $I_{\text{to1}}$  juega un papel limitado potenciando el pico de  $I_{\text{Ca,L}}$  y la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo sarcoplásmico para potenciales de acción propagados, pero modula el curso del tiempo en la restitución de la duración del PA (Decker et al., 2009).

La corriente  $I_{\text{Ks}}$  interviene de forma fundamental en la reducción del APD en intervalos diastólicos cortos. En cambio, presenta poca relevancia en la repolarización del PA en ciclos más largos.

La corriente  $I_{\text{Ca,L}}$  juega un papel crítico en la acomodación del APD y en la tasa de dependencia (rate dependence) de la restitución del APD. La entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  vía  $I_{\text{Ca,L}}$  a tasas rápidas deriva en un aumento en la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ , el cual introduce  $\text{Na}^+$  y expulsa  $\text{Ca}^{+2}$  al medio extracelular, lo que, a su vez, aumenta la salida de  $\text{Na}^+$  a través de la corriente de salida  $I_{\text{NaK}}$ . Este aumento de la corriente de salida de  $I_{\text{NaK}}$  conlleva la acomodación del APD.

Los resultados de las simulaciones originales realizadas por Decker demostraron que dicho modelo representa de forma correcta la base mecánica de aquellos fenómenos dependientes de la frecuencia cardíaca para poder determinar la respuesta cardíaca frente a ritmos de estimulación rápidos e irregulares, como podría ser el caso de una arritmia (Decker et al., 2009).

## 4.2. IMPLEMENTACIÓN COMPUTACIONAL DEL MODELO

Una vez planteado el modelo con el que trabajar, el siguiente paso es elegir un método de resolución de todas las ecuaciones que aparecen en el mismo. En particular, éstas se van a resolver con el programa informático MATLAB, empleando métodos numéricos por diferencias finitas. Para ello se hará uso de la función *ode15s*, la cual resuelve sistemas de ecuaciones *stiff* (rígidos) con una exactitud de primer a quinto orden. Los resultados de *ode15s* se materializan en un vector de tiempo *Ti* y una matriz *StateVars* que incluye los valores de todas las variables de estado en los instantes de tiempo que corresponden al vector *Ti*.

El programa desarrollado consta de dos módulos principales que se comunican entre sí y que son *scripts* (ficheros .m) de MATLAB, además de dos módulos auxiliares que permitirán, en el

caso del primero, visualizar cada corriente iónica y, en el caso del segundo, analizar ciertos parámetros (biomarcadores preclínicos) que definen los transitorios de  $Ca^{+2}$ . Esta estructura modular del software desarrollado se esquematiza en la Figura 13.

El módulo principal, *Decker\_main*, es el encargado de controlar el proceso de cómputo y el flujo de información. Su funcionamiento se basa en la recepción de unos parámetros de configuración de la simulación (*settings*) entre los cuales figuran el período de estimulación (*BCL*), el número de estímulos (*NumStim*) y otros parámetros secundarios que, por lo general, se mantendrán en su valor por defecto en todas las simulaciones. A su vez, permite introducir los factores que multiplican las conductancias de las corrientes iónicas, los efectos de cuyas variaciones se han estudiado posteriormente. Estos factores son los que van a permitir modelar o bien el bloqueo o la potenciación de una corriente mediante un fármaco, o bien la sobreexpresión o inhibición de la misma en consecuencia de una mutación celular. En particular, en este estudio se ha multiplicado cada corriente por 0, 0.3 y 0.7, reduciendo en todos estos casos el efecto de dicha corriente, ya sea por un fármaco que la ha bloqueado o por una mutación que ha inhibido su efecto a nivel celular; además, se ha multiplicado cada corriente por uno, el cual es el valor de control que ha permitido comparar los resultados, y por último, se han multiplicado todas las corrientes por 2, de forma que se ha duplicado su efecto, o bien por un fármaco que la ha activado o bien simulando la sobreexpresión de esa corriente debido a una mutación. Cada uno de los cambios mencionados se ha llevado a cabo por separado; es decir, una simulación particular corresponde a la multiplicación de una sola corriente por uno de los factores multiplicativos mencionados (0, 0.3, 0.7, 1, 2) manteniendo el resto de corrientes inalteradas.

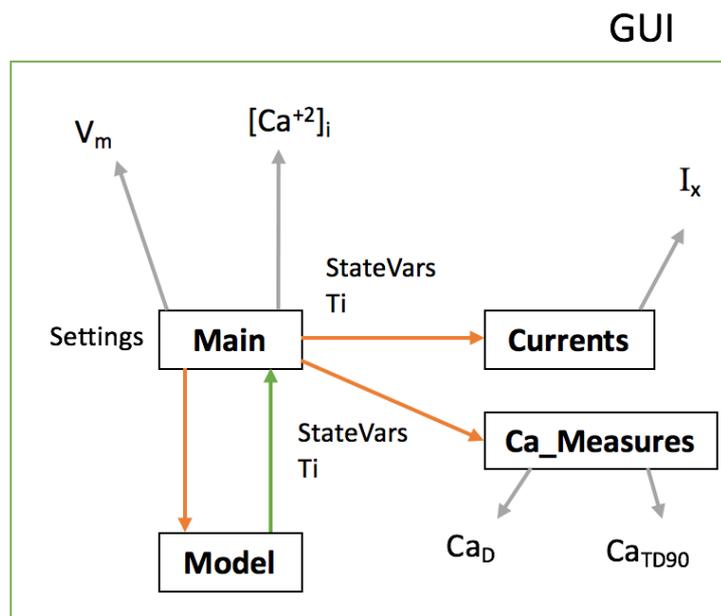


Figura 14: Implementación computacional de la interfaz de usuario (GUI) que permite ejecutar el modelo de Decker – Rudy y visualizar los resultados.

Una vez que el módulo *Decker\_main* ha recibido todos los parámetros de entrada, llama de forma secuencial al segundo módulo que contiene el modelo, denominado *Decker\_model*,

proporcionándole en cada llamada los parámetros de configuración de la simulación y los valores actuales de cada variable de estado. En cada llamada, *Decker\_main* llama al módulo *Decker\_model* de manera secuencial para que vaya resolviendo paso de tiempo por paso de tiempo el sistema de ecuaciones diferenciales no lineales por diferencias finitas empleando la función *ode15s* de MATLAB.

El *Decker\_model* contiene todas las ecuaciones que corresponden al modelo de Decker – Rudy, escritas en sintaxis de MATLAB. Este módulo recibe del módulo principal los *settings*, calcula todas las variaciones de los parámetros en un paso de tiempo y le devuelve a *main*, a través de la función *ode15s*, todos los valores. *Main* recibe dichos valores, los gestiona y vuelve a llamar a *model* para que avance un paso de tiempo más y así sucesivamente. En otras palabras, el módulo principal es el encargado de controlar todo el proceso y *model* contiene las ecuaciones y las resuelve, calculando los incrementos de las variables de estado en cada paso de tiempo. Una vez ha terminado la simulación, el resultado incluye un vector de tiempo, llamado *Ti* y una matriz, denominada *StateVars*. Dicha matriz contiene, por columnas, las 46 variables de estado que componen el modelo y por filas, sus valores en todos los instantes de tiempo.

Tras la finalización de la simulación, el programa nos permite visualizar cualquier variable de estado, entre las cuales se encuentran el potencial de membrana o la concentración de calcio intracelular. Pero si además se quiere ver gráficamente las distintas corrientes iónicas, teniendo en cuenta que cada una de ellas resulta de la combinación matemática de determinadas variables de estado, puede hacerse gracias a un tercer módulo desarrollado: el módulo de post-proceso llamado *Currents*, que contiene todas las ecuaciones que definen las corrientes iónicas del modelo y las cuales se pueden calcular gracias a la matriz *StateVars*.

A continuación, resultó necesaria la creación de un cuarto módulo denominado *Ca\_Measures*. Este módulo ha sido programado con el fin de medir de manera automática una serie de biomarcadores preclínicos asociados a los transitorios de calcio. Se consideran biomarcadores porque indican el estado de la célula referente al calcio y están relacionados con la contractilidad y con la proarritmicidad. Los biomarcadores seleccionados se pueden observar en la Figura 14 y son:

- La concentración sistólica de calcio ( $Ca_S$ ), que es el valor más alto que alcanza respecto al tiempo la concentración de  $Ca_i$  durante un potencial de acción.
- La concentración diastólica de calcio ( $Ca_D$ ) que, por el contrario, es el menor valor de dicha concentración en cada latido.
- La duración transitoria del calcio intracelular, que corresponde al tiempo transcurrido desde el inicio del transitorio (del latido) hasta el instante en que el calcio intracelular alcanza un valor equivalente al 30% de su excursión máxima ( $Ca_{TD30}$ ) o al 90% de la misma ( $Ca_{TD90}$ ).
- Por último, se detecta también la derivada máxima ascendente ( $Ca_{DotMax}$ ), la cual permitirá cuantificar lo rápido que aumenta la  $[Ca^{+2}]_i$  en función del tiempo.

El funcionamiento del algoritmo de *Ca\_Measures*, a grandes rasgos, se basa en derivar, en primer lugar y, si esa derivada supera cierto umbral, el cual ha sido previamente establecido,

entonces se determina la existencia de un transitorio de calcio. Una vez se ha detectado el transitorio de calcio, donde haya un pico en la derivada, corresponderá al biomarcador  $Ca_{DotMax}$ . El punto máximo en ese intervalo será el  $Ca_S$ , así como el mínimo será el  $Ca_D$ . Asimismo, se detecta  $Ca_{TD30}$  cuando la derivada ha disminuido un 30% del total, y  $Ca_{TD90}$ , cuando ya ha descendido un 90%.

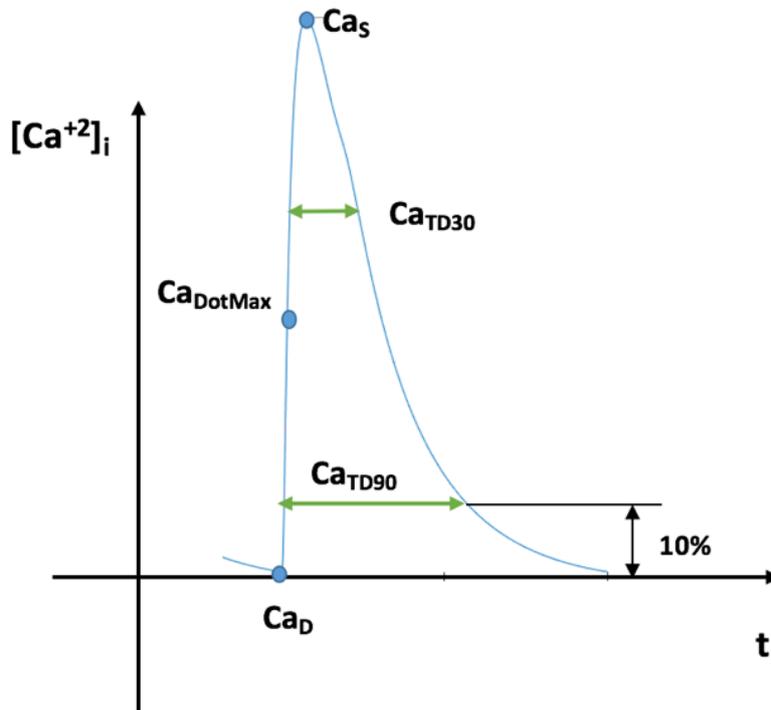


Figura 15: : Representación gráfica de un transitorio de calcio. Concentración del calcio intracelular respecto al tiempo. Señalados en el gráfico el  $Ca_S$ , el calcio sistólico; el  $Ca_D$ , el calcio diastólico; el  $Ca_{TD30}$ , instante en el que se ha repolarizado un 30%;  $Ca_{TD90}$ , instante en que se ha repolarizado un 90%;  $Ca_{DotMax}$ , máxima derivada ascendente.

Para poder hacer uso de este módulo de *post*-proceso, el módulo *Decker\_main* recibe la orden de almacenar en un fichero \*.mat los valores de la concentración del calcio intracelular, para poder luego ejecutar *Ca\_Measures*.

Los códigos MATLAB completos de los cuatro módulos descritos se listan en su totalidad en el Anexo de esta memoria.

### 4.3. MANUAL DE USUARIO

En este apartado se encuentra explicado el funcionamiento de la interfaz gráfica de usuario (GUI) que se ha diseñado empleando la herramienta *guide* de MATLAB para poder realizar todos los pasos necesarios que permitirán simular todas las corrientes iónicas y el efecto de bloquear o activar las mismas sobre la concentración del calcio intracelular.

A continuación, se explica de manera detallada los pasos a seguir para poner en funcionamiento dicha GUI y obtener los resultados deseados.

1. En primer lugar, abrimos el programa MATLAB versión R2015a y tecleamos, en la línea de comandos, el nombre de la GUI: *GUI\_calcio*, y aparecerá la ventana siguiente (Figura 15):

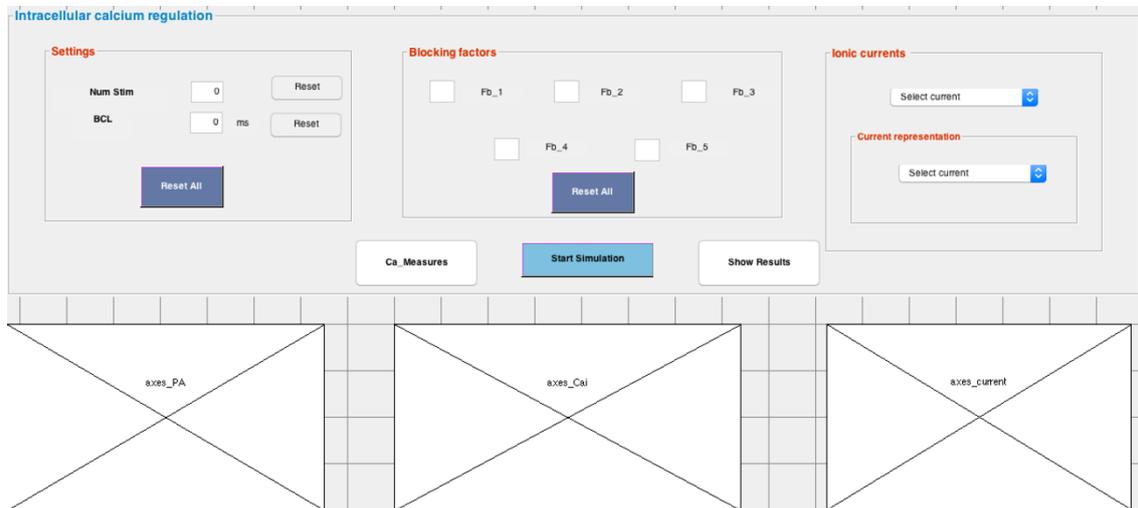


Figura 16: Interfaz gráfica de usuario (GUI) que simula la regulación del calcio intracelular.

2. En la zona superior izquierda se pueden establecer los parámetros de configuración, *settings*, en particular, el número de estímulos y el período de estimulación (BCL), en milisegundos (Figura 16). El producto de ambos parámetros será el que determine el tiempo que durará la simulación. Por ejemplo, en caso de seleccionar un BCL de 1000 milisegundos y un número de estímulos igual a 600, nuestra simulación durará 600 segundos. Si escogemos un BCL de 500 ms, tendremos que establecer 1200 estímulos para que la simulación dure lo mismo.

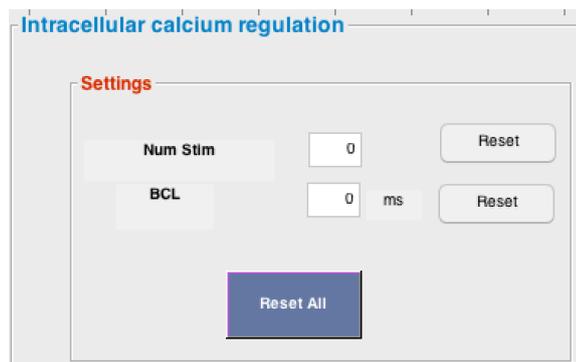


Figura 17: Sección de la GUI en la cual se establecen los parámetros de entrada, Settings.

3. En la zona superior central de la interfaz podemos establecer cinco factores de bloqueo diferentes, que serán los que luego multipliquen a la corriente iónica que seleccionemos en el siguiente

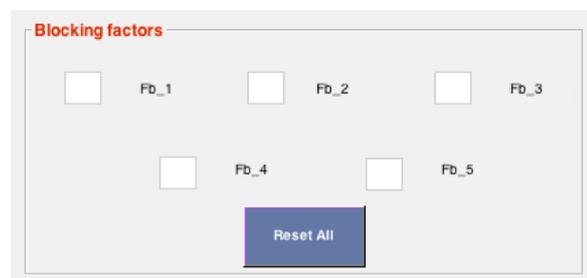


Figura 18: Área para establecer los factores de bloqueo que multiplican a las corrientes iónicas

menú. Estos factores podrán tomar valores inferiores, iguales o superiores a 1 (Figura 17). Por ejemplo, se podrían establecer como factores de bloqueo: 0, 0.3, 0.7, 1 y 2, de manera que las conductancias de la corriente iónica que queramos se verá multiplicada por esos valores.

4. En el área superior derecha encontramos dos listas de menú desplegable (Figura 18). La primera de ellas sirve para seleccionar la corriente iónica que queremos que quede multiplicada por los cinco factores de bloqueo elegidos en el paso anterior. Tenemos la opción, también, de seleccionar todas las corrientes, lo que implicaría que todas ellas quedarían multiplicadas por los factores de bloqueo establecidos (aunque esta opción no se ha utilizado en el presente Trabajo Fin de Grado). La lista inferior a ésta sirve para seleccionar la corriente que queremos visualizar gráficamente. En este caso, no podrán elegirse todas, sino que únicamente podrán ser visualizadas de manera individual. En ambas listas se contemplan todas las corrientes incluidas en el modelo de Decker (apartado 4.1).

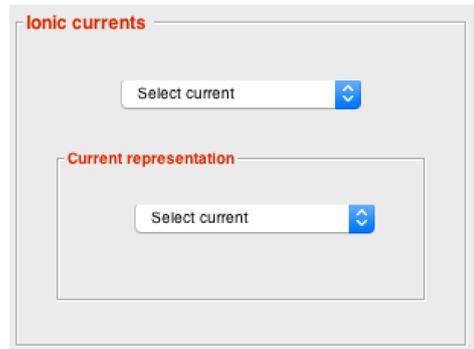


Figura 19: Listas desplegables que permiten seleccionar tanto la corriente que queremos bloquear o activar; y la corriente que queremos visualizar gráficamente.

5. Los tres botones que aparecen en la parte central son, de izquierda a derecha (Figura 19): el botón *Ca\_Measures*, que realiza todas las medidas de los biomarcadores preclínicos establecidos que, como ya se ha mencionado, incluyen el calcio sistólico o el diastólico. Los datos de los transitorios quedan almacenados en un fichero \*.mat para poder trabajar, posteriormente, con ellos. El botón *Start Simulation*, como su nombre indica, es el que tendremos que apretar en primer lugar para que ejecute la simulación, obtener todos los valores que toman las variables de estado en cada instante de tiempo, y poder, después, ejecutar el módulo *Ca\_Measures*. Por último, el botón *Show Results* nos permitirá visualizar tres gráficas correspondientes al potencial de acción, a la concentración de calcio intracelular y a la corriente iónica que hayamos elegido que sea representada en el paso anterior.

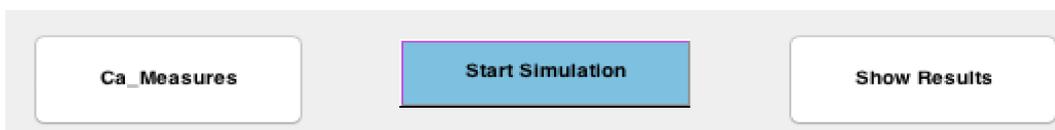


Figura 20: Botones de la GUI que ejecutan la simulación, el módulo *Ca\_Measures* y que permiten la visualización de los resultados gráficamente.

6. Por último, en caso de que se quieran ver las gráficas habiendo pulsado *Show Results*, éstas aparecerían en la zona inferior de la interfaz (Figura 20). Estas gráficas podrán ampliarse mediante la herramienta Zoom y ver los resultados de manera preliminar. Además, en la gráfica central, correspondiente al calcio intracelular, aparecerán marcas correspondientes a los biomarcadores detectados por *Ca\_Measures*, de forma similar a la Figura 14.

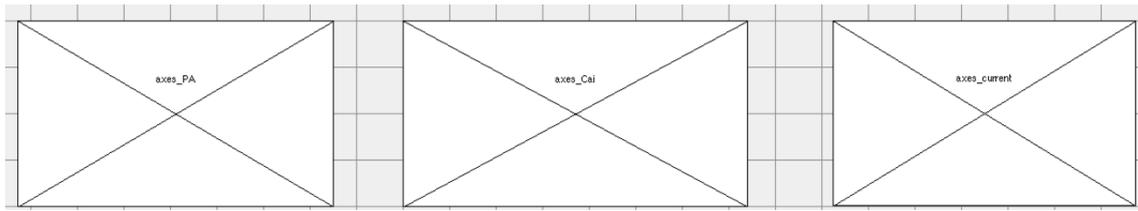


Figura 21: Sección donde se representan gráficamente a la izquierda, el PA; en el centro, el calcio intracelular; a la derecha, la corriente iónica seleccionada.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Mediante el software que ha sido desarrollado y presentado en el apartado anterior, se han realizado diversas simulaciones bloqueando y potenciando los distintos canales iónicos, bombas e intercambiadores del retículo sarcoplásmico y de la membrana celular. Se han estudiado valores desde el 0% al 200% respecto a los valores de control. Posteriormente, se ha realizado un análisis de sensibilidad de los efectos de estas variaciones en una serie de biomarcadores del  $Ca_i$  a diferentes períodos de estimulación.

### **5.1. RESULTADOS DE LAS SIMULACIONES CONTROL**

En primer lugar, resulta imprescindible realizar una serie de simulaciones control. Éstas servirán para posteriormente analizar los distintos cambios que se contemplen sobre las distintas corrientes analizadas.

Se ha establecido el mismo tiempo de simulación (1000 s) en todas las simulaciones para garantizar que todas ellas estén completamente estabilizadas y, además, realizar siempre los análisis y las comparaciones entre los distintos biomarcadores de interés en el valor obtenido a los 1000 s de simulación. En particular, en las simulaciones de control representadas en la Figura 21 se ha empleado un período de estimulación (BCL) de 1000 ms.

En la Figura 21 se muestra gráficamente la evolución temporal del potencial de membrana en la esquina superior izquierda; en el segundo gráfico se observa la concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular en función del tiempo; en la tercera gráfica se muestra la evolución temporal de la concentración de calcio presente tanto en el JSR como en el NSR; en los siguientes gráficos se muestra la evolución temporal de distintas corrientes iónicas; en concreto, de las corrientes  $I_{Na}$ ,  $I_{NaL}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  e  $I_{to1}$ .

Se observa con claridad que en el potencial de acción la forma es la esperable; es decir, se produce una despolarización muy rápida seguida de una configuración de espiga y domo y una repolarización más lenta, como corresponde a un potencial de acción cardíaco ventricular canino. Además, el potencial de reposo tiene un valor aproximado de -90 mV, llegando a alcanzar aproximadamente 30 mV en el pico de despolarización, los cuales son valores típicos de PA de perro.

Respecto a los transitorios de  $Ca^{+2}$ , se observa una pequeña fase de subida rápida que descenderá más lentamente. Asimismo, se observa una diferencia evidente entre el comportamiento del  $Ca^{+2}$  presente en el NSR, el cual disminuye muy rápidamente durante la sístole, mientras que el  $Ca^{+2}$  presente en el JSR sufre fluctuaciones mucho menos severas.

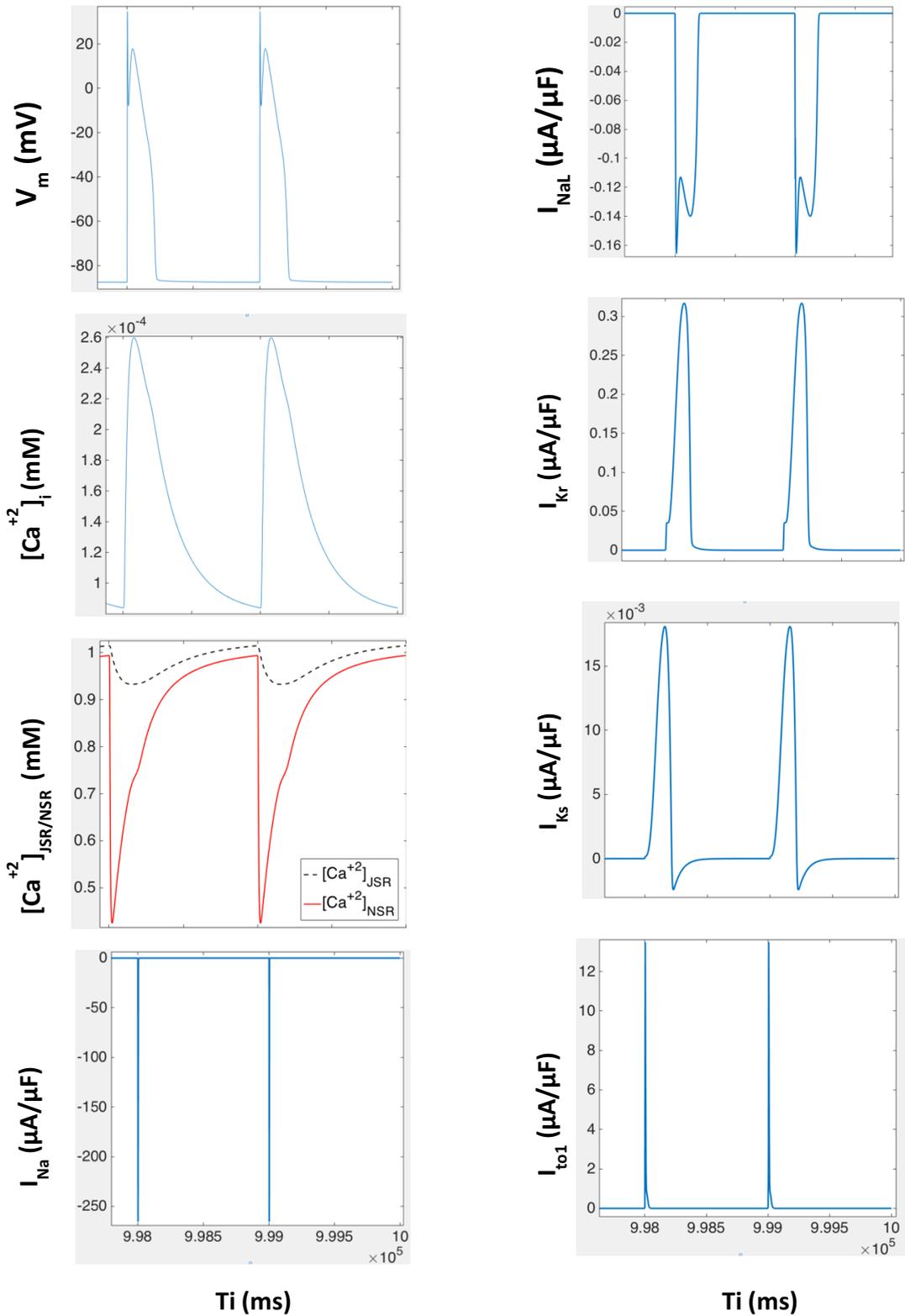


Figura 22: De arriba abajo, de izquierda a derecha, simulaciones control de: potencial de membrana; concentración intracelular de calcio; concentraciones de calcio en el JSR y NSR; corriente de sodio; corriente lenta de sodio; corriente rápida de potasio; corriente lenta de potasio; corriente transitoria de salida. Todas ellas con BCL de 1000 ms y tiempo simulado 1000 s.

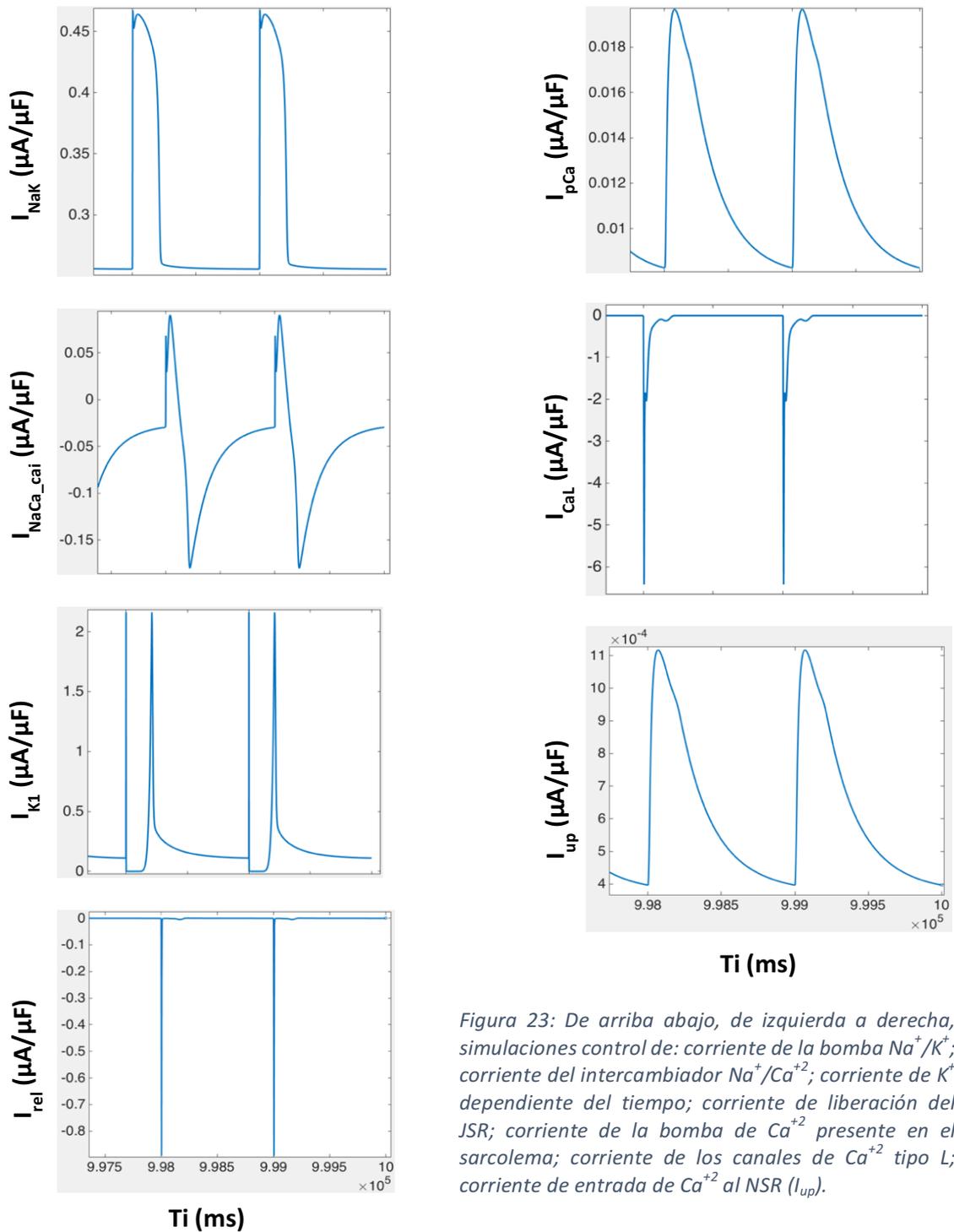


Figura 23: De arriba abajo, de izquierda a derecha, simulaciones control de: corriente de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; corriente del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ ; corriente de  $\text{K}^+$  dependiente del tiempo; corriente de liberación del JSR; corriente de la bomba de  $\text{Ca}^{+2}$  presente en el sarcolema; corriente de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L; corriente de entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al NSR ( $I_{up}$ ).

En cuanto a las corrientes iónicas, en las Figuras 21 y 22, se observa claramente la diferencia entre aquellas que son entrantes, y por lo tanto, toman valores negativos ( $I_{Na}$ ,  $I_{NaL}$ ,  $I_{CaL}$  e  $I_{rel}$ ), y todas las demás que, como son salientes, toman valores positivos. Observamos que  $I_{Na}$  desciende de forma súbita y vuelve a su valor inicial muy rápidamente, lo que representa como los canales iónicos de  $\text{Na}^+$  se abren y se cierran en un intervalo de tiempo muy pequeño. En cambio, la corriente  $I_{NaL}$  toma valores negativos de forma rápida pero vuelve a sus valores

iniciales más despacio.  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  tienen comportamientos similares, como se observa en la gráfica. La mayor diferencia observable es que  $I_{Ks}$  alcanza de forma breve valores negativos, lo cual indica que, durante breves instantes de tiempo, tenderá a entrar en la célula, mientras que  $I_{Kr}$  únicamente será saliente.

La corriente propia de la bomba  $Na^+/K^+$  ( $I_{NaK}$ ) presenta una subida muy rápida seguida de una fase de bajada progresiva. La corriente del intercambiador  $Na^+/Ca^{+2}$  parte desde valores negativos (que corresponden al funcionamiento directo) aumentando hasta alcanzar valores positivos (funcionamiento inverso), volviendo a descender rápidamente hasta valores negativos. Este intercambiador, normalmente, introduce 3 iones  $Na^+$  y expulsa un ion  $Ca^{+2}$  de la célula pero, durante unos breves instantes de tiempo, introduce calcio al espacio intracelular y expulsa  $Na^+$ , por eso sus fluctuaciones. La corriente  $I_{K1}$  tiene una subida y una bajada muy rápida, debida a su carácter rectificador, volviendo a aumentar poco después y descendiendo de forma más lenta. La corriente  $I_{rel}$  es entrante, y por ello tiene un aumento (en valor absoluto), que corresponde a la liberación de calcio del RS, seguido de una bajada (en valor absoluto) cuando los receptores de ryanodina se inactivan. La corriente  $I_{pca}$  presenta una forma muy similar a la de un transitorio de calcio.  $I_{CaL}$ , en cambio, es una corriente entrante y por ello es descendente y negativa. Por último,  $I_{up}$ , presenta una subida rápida pero una bajada progresiva respecto al tiempo.

## 5.2. EFECTO DE LAS VARIACIONES DE LAS CORRIENTES IÓNICAS

A continuación, se llevaron a cabo simulaciones utilizando los factores multiplicativos de los que se habló en el apartado de Desarrollo de Software. Cada una de las corrientes iónicas del modelo de Decker – Rudy se multiplicó por los factores 0, 0.3, 0.7 y 2, además del control (1). Los cambios más significativos se observaron en las corrientes que figuran en las Figuras 23 y 24.

Según se observa en la Figura 23 (a), el potencial de membrana en un cardiomiocito ventricular de perro se ve alterado según distintas variaciones en la corriente  $I_{NaK}$  de la siguiente forma: en caso de que su efecto se vea reducido en un 30%, la duración del PA disminuirá, siendo menor también la despolarización; si por el contrario, se duplica el efecto de  $I_{NaK}$ , el APD aumentará y se alcanzará un pico de despolarización mayor. Respecto a los transitorios de calcio (Figura 23 (b)), cabe destacar un gran aumento de los valores en caso de bloquear  $I_{NaK}$  un 30%, siendo un poco mayores al doble respecto a los valores de control; por el contrario, se observa una bajada mucho menos severa de los valores de calcio en caso de activar  $I_{NaK}$  un 100% ( $G_{NaK} \times 2$ ). Esto va ligado a lo que se observa en la Figura 23 (c), pues se ve claramente un aumento de  $I_{NaK}$  cuando es bloqueada y por el contrario, disminuye su efecto cuando es potenciada.

Las variaciones producidas en la corriente  $I_{up}$  no afectan de manera muy evidente el  $V_m$  (Figura 24 (a)). En caso de que el efecto de dicha corriente se reduzca un 30% prácticamente no produce ningún cambio respecto al potencial de control. Se observa, en cambio, un ligero aumento en el APD en caso de duplicar el efecto de  $I_{up}$ . En cuanto a los transitorios de calcio (Figura 24 (b)) cabe destacar que el bloqueo de  $I_{up}$  reduce ligeramente la  $[Ca^{+2}]_i$  mientras que, multiplicándola por dos, la  $[Ca^{+2}]_i$  aumenta en torno al doble. Estos efectos se corroboran también en la Figura 24 (c), pues la gráfica obtenida es muy similar.

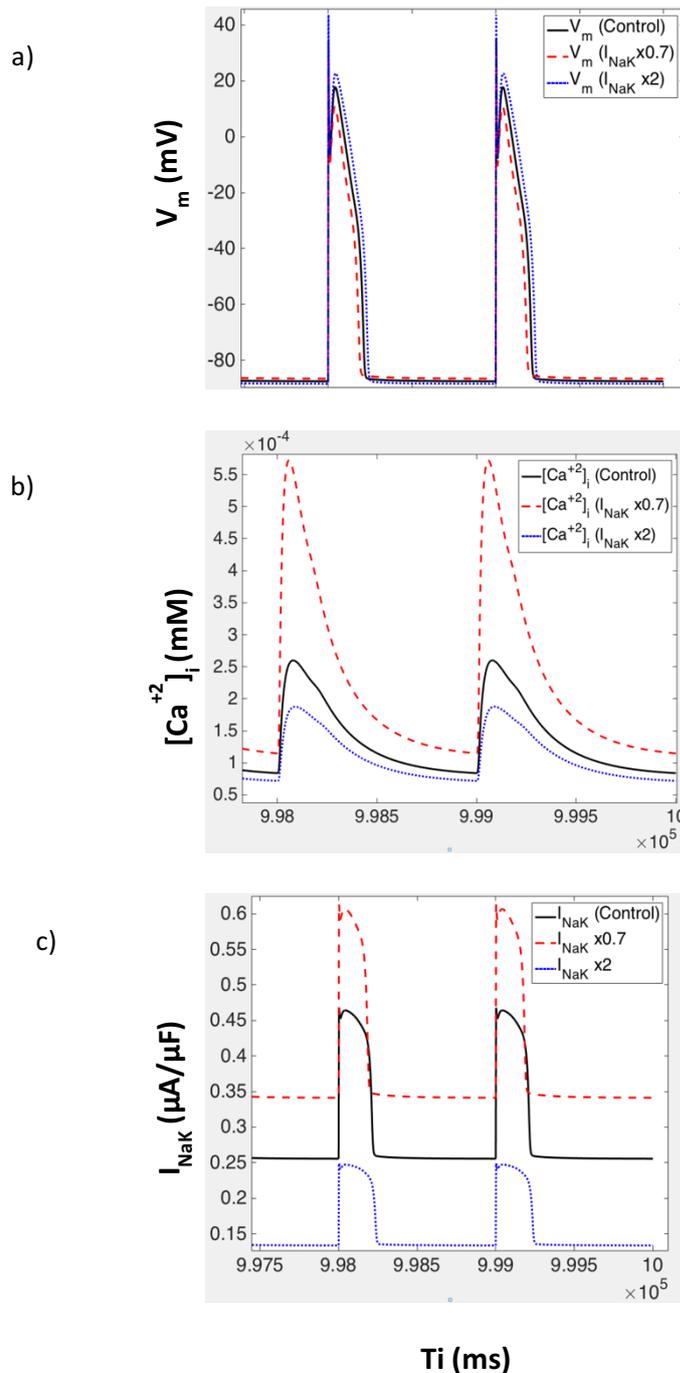


Figura 24: Evolución temporal de a)  $V_m$  con  $G_{NaK}$  x0.7, x1 y x2; b) Transitorios de calcio con  $G_{NaK}$  x0.7, x1 y x2; c)  $I_{NaK}$  con  $G_{NaK}$  x0.7, x1 y x2

Los cambios producidos en  $I_{CaL}$  apenas afectan al  $V_m$  en los cardiomiocitos caninos (Figura 25 (a)). Se observa un ligero aumento en el pico de la meseta si dicha corriente está multiplicada por dos. En caso de que se multiplique por 0.7, el pico de la meseta alcanza valores ligeramente menores que el control. Similar a lo ocurrido con  $I_{up}$ , la  $[Ca^{+2}]_i$  aumenta notablemente si se duplica el efecto de  $I_{CaL}$ , mientras que en caso de reducirse su efecto un 30%, se observa un leve descenso de dicha concentración (Figura 25 (b)). Asimismo, la Figura 25 (c) muestra como los

canales CaL se cierran antes en caso de duplicar el efecto de  $I_{CaL}$ . Esto es debido a que se alcanza con mayor rapidez la presencia de iones  $Ca^{+2}$  en la célula, lo cual confirma lo anterior.

Cabe destacar también el papel de  $I_{Kr}$  sobre el potencial de membrana, el cual verá reducida su amplitud si se multiplica  $G_{Kr}$  x2 y aumentada si se multiplica  $G_{Kr}$  x0.7 (Figura 26 (a)). El efecto de esta corriente sobre los transitorios de calcio no es tan evidente como en los tres casos anteriores. No obstante, sí se producen fluctuaciones de la siguiente manera: la amplitud del transitorio se reduce ligeramente si se duplica el efecto de esta corriente, mientras que se observa un pequeño aumento de la amplitud del transitorio si se reduce el efecto de  $I_{Kr}$ .

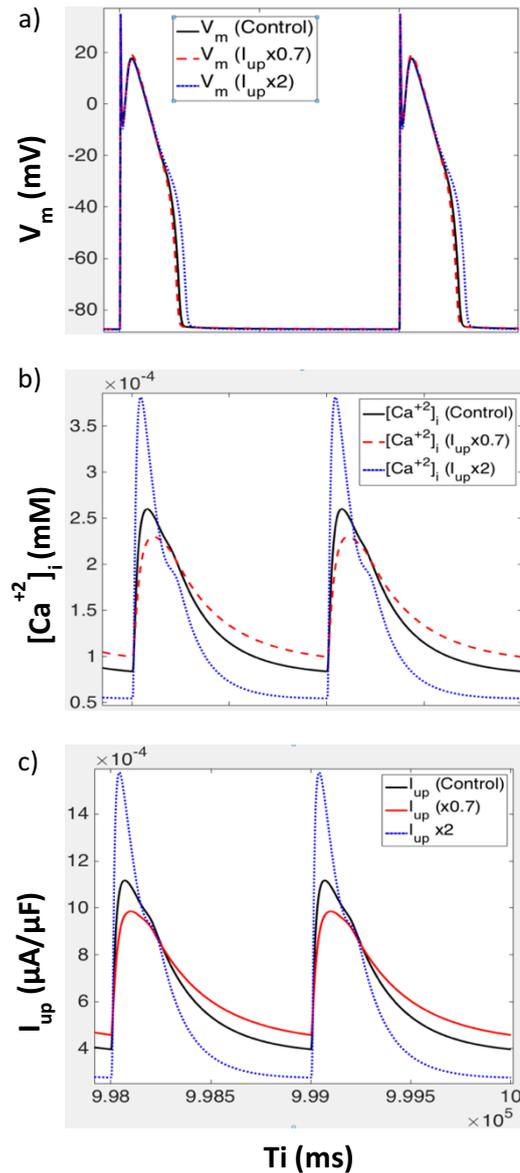


Figura 25: Evolución temporal de a)  $V_m$  con  $G_{up}$  x0.7, x1 y x2; b) Transitorios de calcio con  $G_{up}$  x0.7, x1 y x2; c)  $I_{upK}$  con  $G_{upK}$  x0.7, x1 y x2

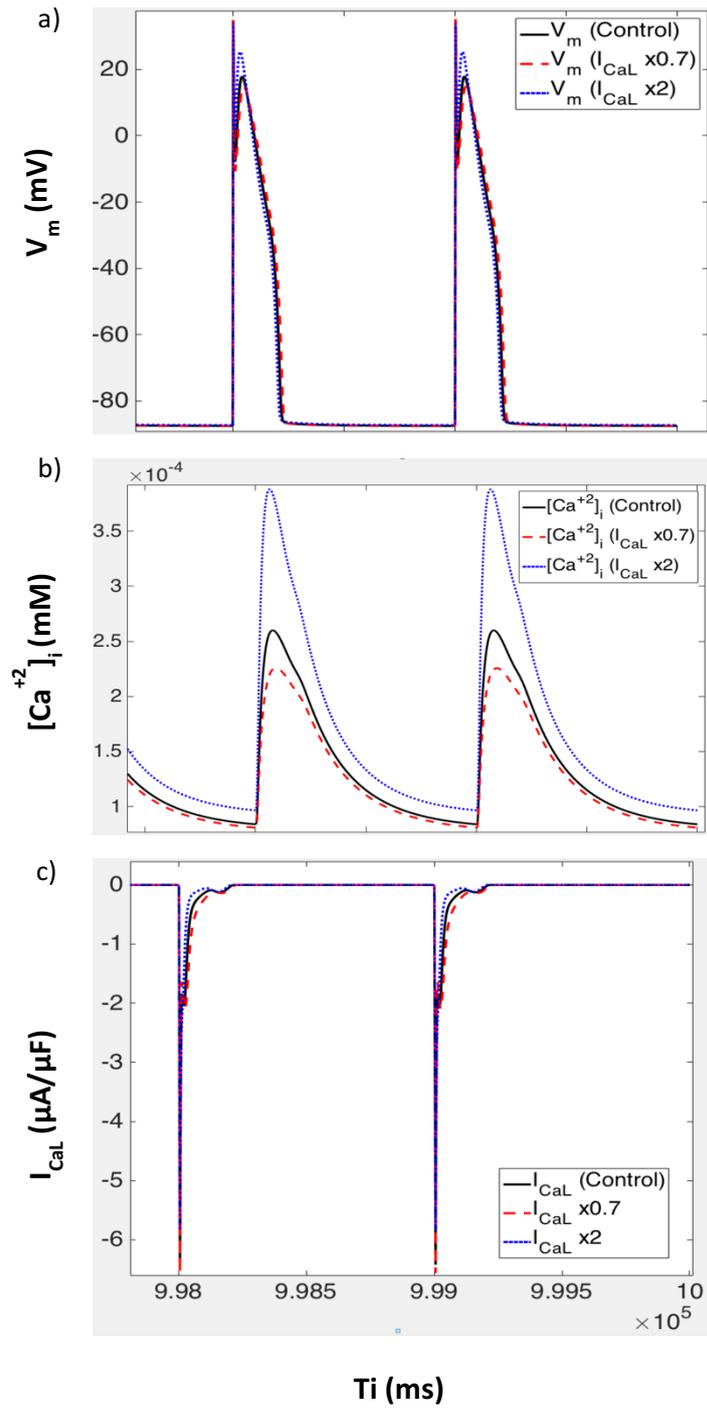


Figura 26: Evolución temporal de a)  $V_m$  con  $G_{CaL} \times 0.7, x1$  y  $x2$ ; b) Transitorios de calcio con  $G_{CaL} \times 0.7, x1$  y  $x2$ ; c)  $I_{CaL}$  con  $G_{CaL} \times 0.7, x1$  y  $x2$

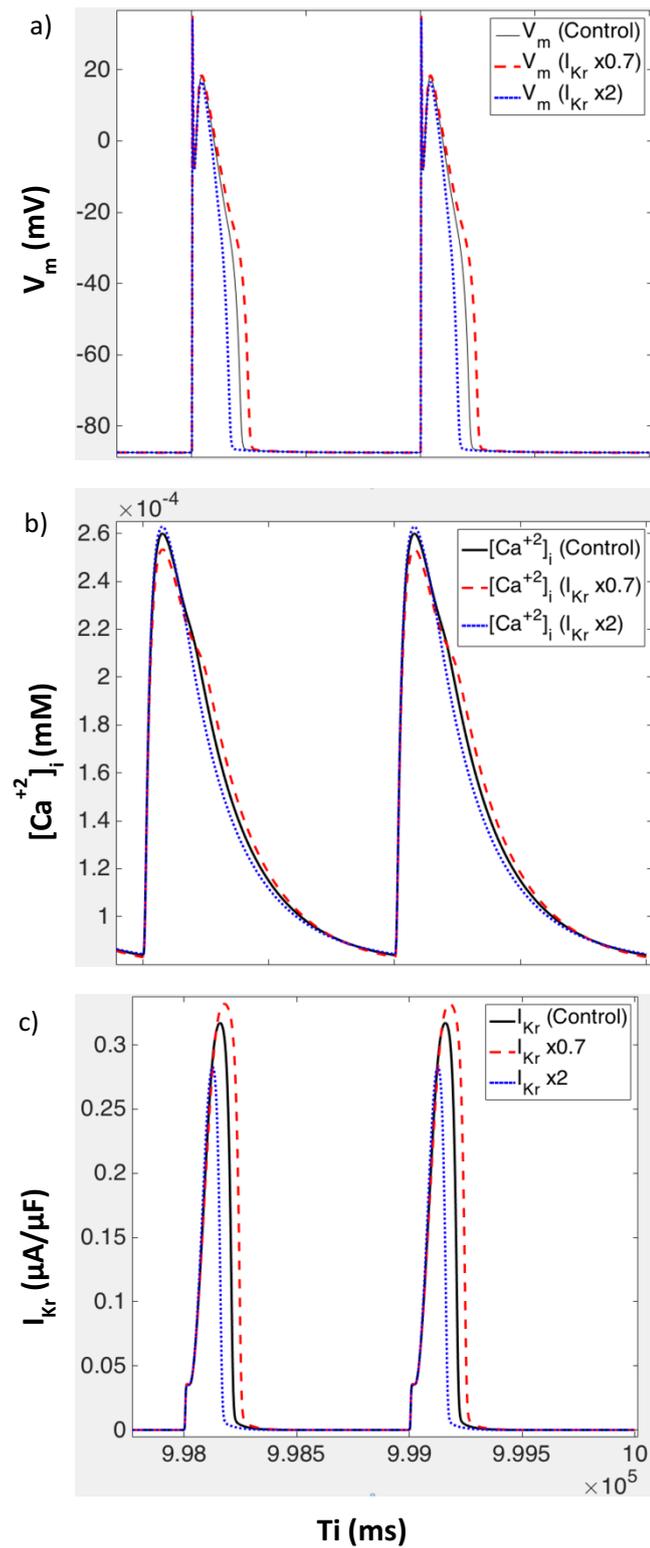


Figura 27: Evolución temporal de a)  $V_m$  con  $G_{K_r} \times 0.7, x1$  y  $x2$ ; b) Transitorios de calcio con  $G_{K_r} \times 0.7, x1$  y  $x2$ ; c)  $I_{K_r}$  con  $G_{K_r} \times 0.7, x1$  y  $x2$

### 5.3. EFECTO DE LOS FACTORES DE BLOQUEO SOBRE BIOMARCADORES DE CALCIO

En este apartado se van a analizar los resultados obtenidos mediante el módulo *Ca\_Measures* expuesto en el capítulo de Desarrollo de Software.

De manera sistemática, se han realizado numerosas simulaciones, todas ellas con una duración de 1000 s y con tres períodos de estimulación distintos: 1000 ms, 500 ms y 333 ms, con el fin de simular un ritmo cardíaco normal y otros dos con taquicardias menos y más severas, respectivamente. Como ya se ha explicado, los factores de bloqueo por los cuales se han multiplicado las conductancias de cada corriente iónica son: 0, 0.3, 0.7 y 2.

Tras la ejecución de *Ca\_Measures*, los datos quedan guardados en un fichero para que, posteriormente, se puedan procesar. En particular, se ha decidido presentarlos en diagramas de barras con el fin de detectar, de manera muy visual e intuitiva, aquellas corrientes que más afectan en la regulación del calcio intracelular.

Según las simulaciones realizadas, el calcio diastólico está regulado principalmente por la bomba SERCA, es decir,  $I_{up}$  (Figura 25). Éste aumenta considerablemente a medida que bloqueamos dicha corriente pero, en cambio, disminuye en torno a un 40% cuando activamos  $I_{up}$  un 100%. Por el contrario, el  $Ca_s$  disminuye ligeramente cuando  $I_{up}$  es bloqueada, y aumenta al duplicar su efecto. Cabe destacar también el gran aumento de la máxima derivada cuando  $I_{up}$  se duplica, y lo mucho que ésta disminuye al bloquear esta corriente.

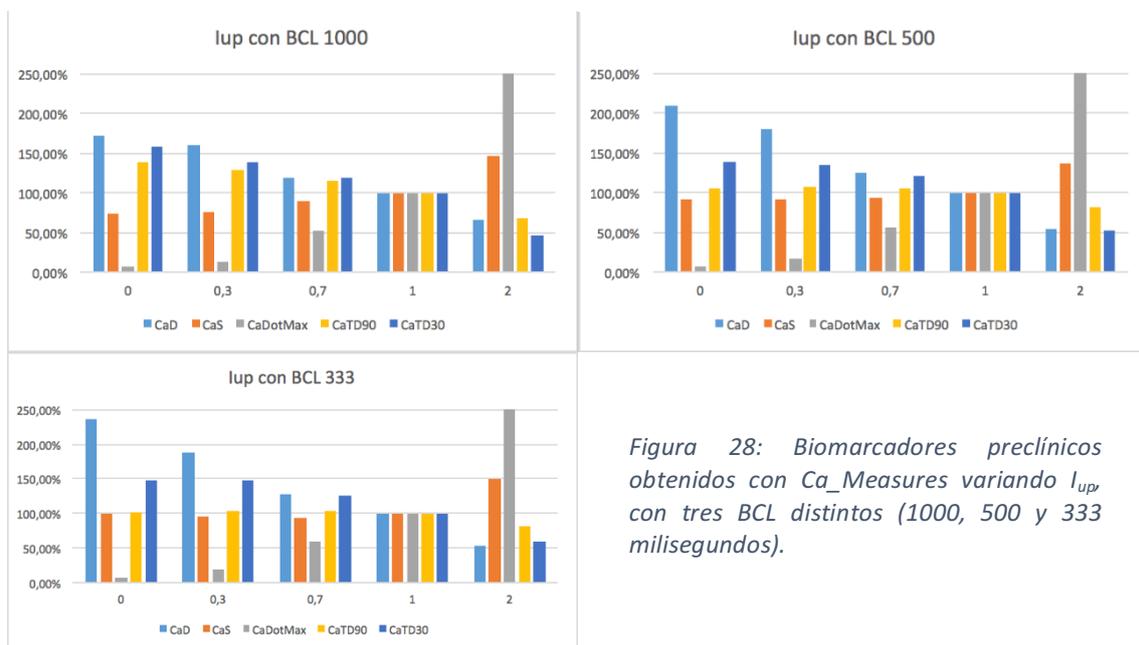


Figura 28: Biomarcadores preclínicos obtenidos con *Ca\_Measures* variando  $I_{up}$  con tres BCL distintos (1000, 500 y 333 milisegundos).

En el caso de la bomba sodio – potasio ( $I_{NaK}$ ), es necesario recalcar que el modelo de Decker - Rudy dio numerosos problemas a la hora de bloquear la misma. Es por este motivo que sólo se disponen de datos de la reducción de su efecto en un 30% (x0.7) y de su aumento en un 100% (x2). El papel de esta bomba es muy relevante en los cardiomiocitos caninos (Figura 26),

regulando el calcio sistólico a cualquier período de estimulación, así como provocando una subida muy severa de la máxima derivada ascendente, lo cual implica una entrada de  $Ca^{+2}$  muchísimo más rápida. A medida que aumenta el BCL, se observa que  $I_{NaK}$  interviene más en la duración transitoria del calcio al 90% ( $Ca_{TD90}$ ).

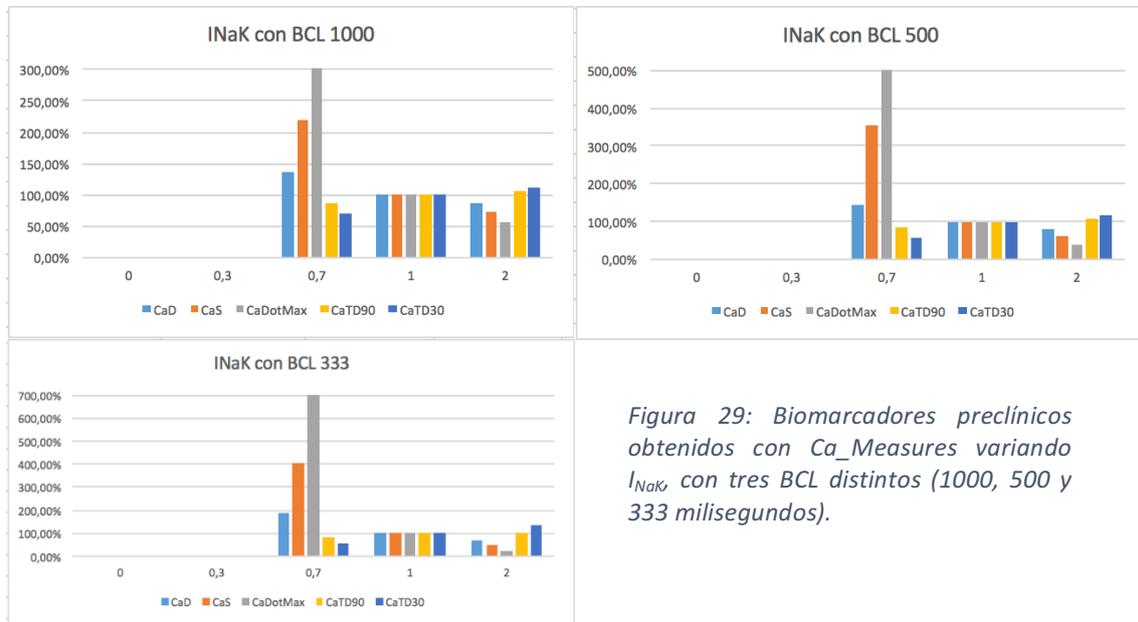


Figura 29: Biomarcadores preclínicos obtenidos con  $Ca\_Measures$  variando  $I_{NaK}$  con tres BCL distintos (1000, 500 y 333 milisegundos).

La corriente correspondiente a los canales de calcio tipo L también juega un papel importante en la regulación del calcio intracelular (Figura 27). En particular, a medida que aumenta la frecuencia de estimulación, ésta interviene cada vez más en la regulación tanto del  $Ca_S$  y del  $Ca_D$ , como de la duración transitoria de calcio, teniendo su efecto más destacado en un BCL de 333 ms y afectando sobre todo al calcio sistólico y a  $Ca_{TD90}$ . Como se observa en las gráficas, el modelo de Decker – Rudy presentó problemas a la hora de eliminar el efecto de  $I_{CaL}$ , por lo que no se disponen de valores en el factor de bloqueo 0.

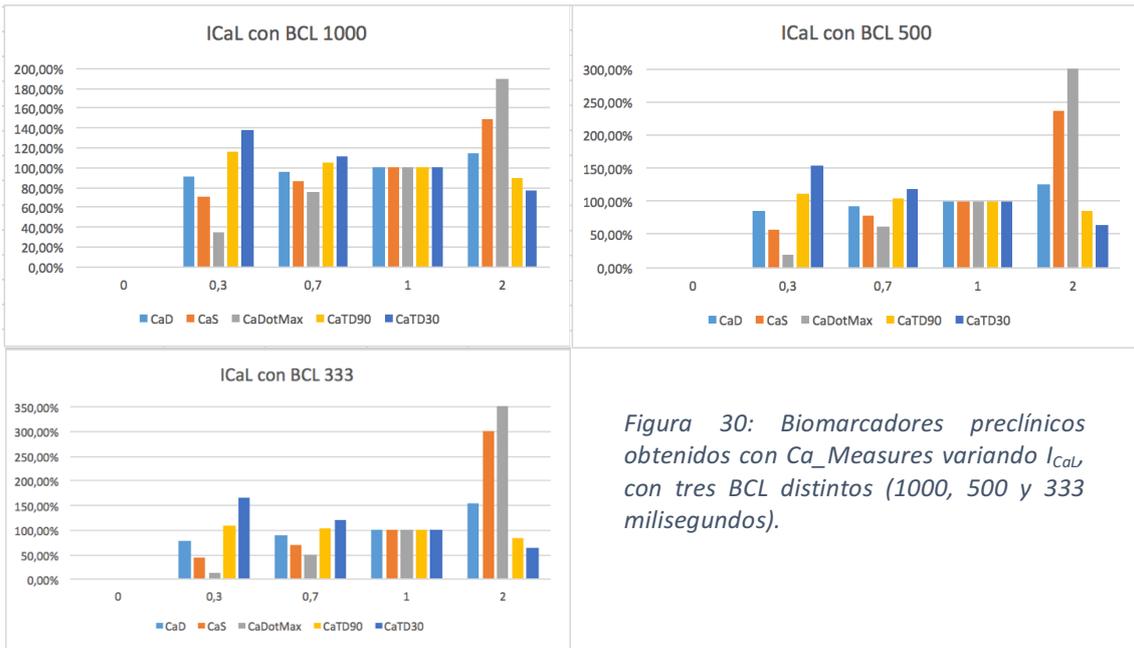


Figura 30: Biomarcadores preclínicos obtenidos con  $Ca\_Measures$  variando  $I_{CaL}$ , con tres BCL distintos (1000, 500 y 333 milisegundos).

La influencia del intercambiador  $Na^+/Ca^{+2}$  es mayor cuanto más alto es el período de estimulación y cuanto más se inhibe su efecto, aumentando alrededor de un 170% el calcio sistólico cuando se anula el efecto de  $I_{NaCa}$ . También se observa una gran influencia de este intercambiador en la  $Ca_{DotMax}$  (Figura 28).

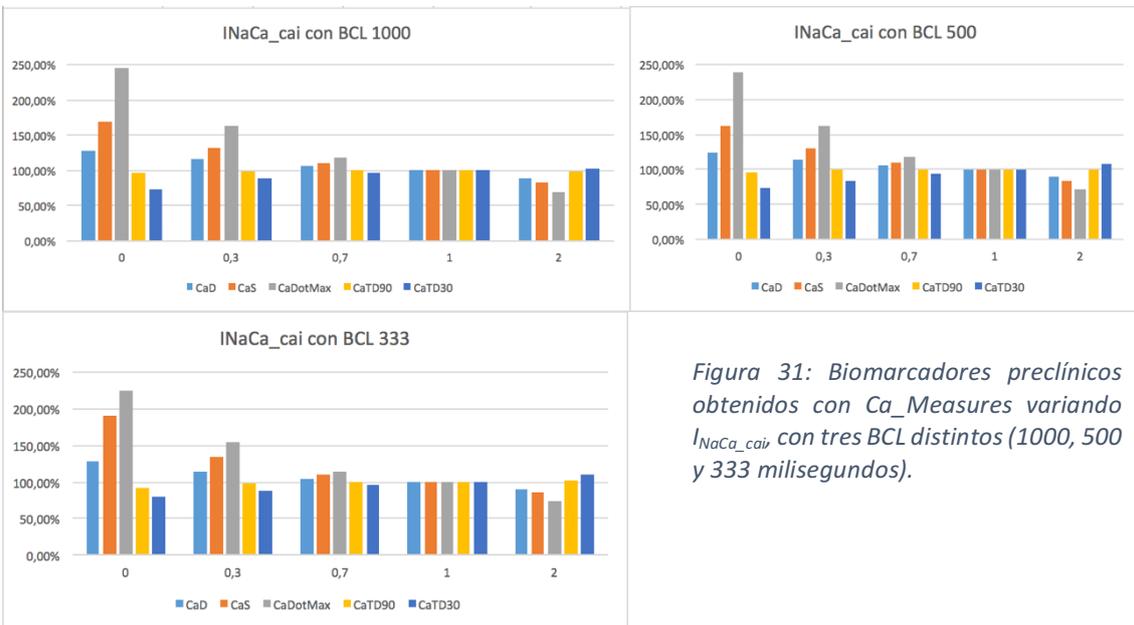


Figura 31: Biomarcadores preclínicos obtenidos con  $Ca\_Measures$  variando  $I_{NaCa\_cai}$ , con tres BCL distintos (1000, 500 y 333 milisegundos).

Una vez comentado el efecto de las corrientes más influyentes y que más intervienen en la regulación del calcio intracelular, resulta necesario destacar el papel tan poco significativo que juega la liberación del calcio a través de los receptores de rianodina,  $I_{rel}$  (Figura 29 E).

En la Figura 29 se contemplan variaciones de distintas corrientes iónicas, todas ellas con un período de estimulación de 1000 ms. El efecto que presentan todas ellas sobre la regulación del calcio intracelular no es muy grande pero, por ejemplo, se produce un aumento del  $Ca_D$  cuando se anula la presencia de  $I_{Kr}$  o un aumento progresivo de la  $Ca_{TD30}$  a medida que se aumenta el factor de bloqueo de  $I_{Ks}$ .

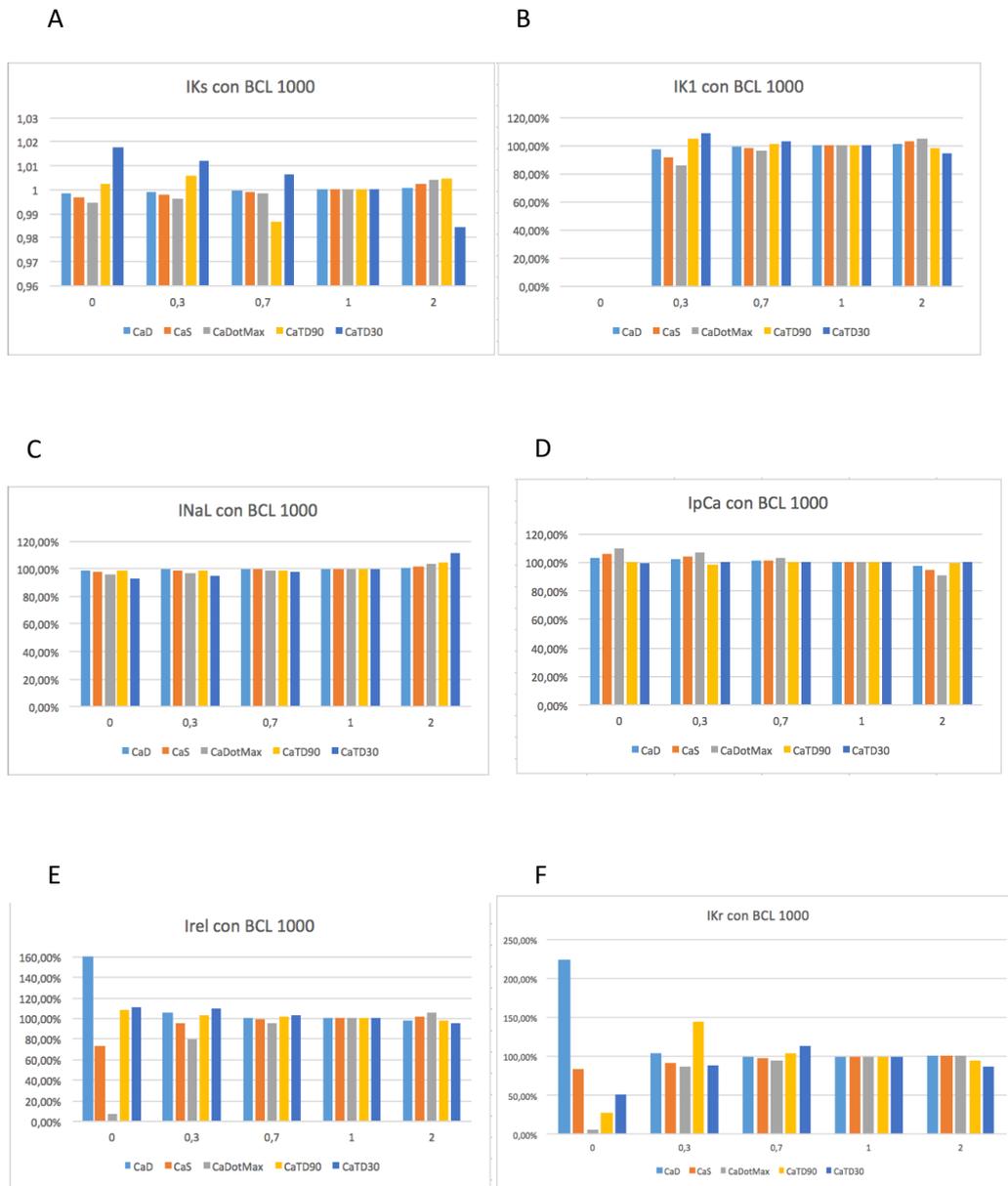


Figura 32: Biomarcadores preclínicos obtenidos con  $Ca\_Measures$  variando: A)  $I_{Ks}$  B)  $I_{K1}$  C)  $I_{NaL}$  D)  $I_{pCa}$  E)  $I_{rel}$  F)  $I_{Kr}$ , con período de estimulación de 1000 ms.

## 5.4. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD

Una vez obtenidos los datos que caracterizan los parámetros del calcio intracelular, se procedió al procesamiento de los mismos. Para ello, se empleó un análisis de sensibilidad monovariable, el cual se basaba en lo siguiente:

Para cada biomarcador preclínico 'c' (por ejemplo, la concentración sistólica de calcio  $Ca_S$ ) y parámetro del modelo 'p' (por ejemplo, el factor multiplicativo de la corriente  $I_{NaK}$ ), se calcularon el porcentaje de cambio ( $D_{c,p,a}$ ), sensibilidad ( $S_{c,p}$ ) y sensibilidad relativa ( $R_{c,p}$ ) como

$$D_{c,p,a} = \frac{(c_{p,a} - c_{control})}{c_{control}} \cdot 100 \quad (13)$$

$$S_{c,p} = \frac{\Delta D_{c,p,a}}{\Delta a} = \frac{D_{c,p,+100\%} - D_{c,p,-30\%}}{1.3} \quad (14)$$

$$R_{c,p} = \frac{S_{c,p}}{|S_{c,p}|_{max,c}} \quad (15)$$

donde  $c_{p,a}$  y  $c_{control}$  son la magnitud del biomarcador preclínico 'c' cuando el parámetro 'p' es aumentado por 'a' y bajo condiciones de control, respectivamente, y siendo  $|S_{c,p}|_{max,c}$  el máximo valor absoluto entre todas las sensibilidades obtenidas para la característica 'c' (Romero et al. , 2011).

La Tabla 1 muestra la sensibilidad de los biomarcadores del calcio intracelular estudiados (primera columna) respecto a variaciones en las diferentes corrientes iónicas (fila superior) para cada uno de los períodos de estimulación. Aquellos valores que se encuentran marcados en negrita tienen un efecto positivo (es decir, el biomarcador crece cuando la corriente aumenta), mientras que las sensibilidades negativas quedan señaladas en cursiva. Para facilitar la interpretación visual de la tabla, se ha empleado una escala de color degradado de manera que aquellos tonos más anaranjados e intensos corresponden a las sensibilidades relativas mayores mientras que los tonos más amarillentos implican la falta de relación entre el parámetro y el biomarcador. Esta tabla constituye la compilación comparativa de los resultados de todas las simulaciones realizadas en el marco del presente Trabajo Fin de Grado utilizando el software desarrollado a tal efecto.

Para un BCL de 1000 ms, se observa que las corrientes que más afectan en el calcio diastólico, ambas de manera inversa, son  $I_{up}$  e  $I_{NaK}$ . La corriente que más relación muestra con el calcio sistólico es  $I_{NaK}$ , seguida de  $I_{CaL}$  e  $I_{up}$ . En concreto, el efecto de las variaciones de  $I_{NaK}$  en el  $Ca_D$  es un 0'9% en relación con  $I_{up}$ , mientras que el efecto de  $I_{CaL}$  e  $I_{rel}$  en el  $Ca_S$  son de un 0'42% y un 0,02%, respectivamente, comparado con  $I_{NaK}$ . Las corrientes  $I_{NaK}$ ,  $I_{up}$  e  $I_{CaL}$  presentan los mayores valores de sensibilidad relativa respecto a la derivada máxima, en orden descendente.  $I_{NaK}$  tiene una relación inversa mientras que las otras dos corrientes presentan una relación directa. Con respecto a la duración del transitorio de calcio se observa que es  $I_{up}$  la corriente más influyente.

Acorde a estas simulaciones, para un período de estimulación de 500 ms, se obtiene que, de nuevo, es  $I_{up}$  la corriente que más influye en el  $Ca_D$ , seguida de  $I_{NaK}$  e  $I_{CaL}$ . Tanto  $I_{up}$  como  $I_{NaK}$  tienen un efecto negativo sobre dicho biomarcador. El  $Ca_S$  se ve afectado en su mayor parte por  $I_{NaK}$ , con una relación inversa. En particular, el efecto de las variaciones de  $I_{NaK}$  en el  $Ca_D$  es de un 0'88% respecto a  $I_{up}$ , mientras que el efecto de  $I_{CaL}$  e  $I_{up}$  en el  $Ca_S$  son de un 0'54% y 0'15%, respectivamente, en comparación con  $I_{NaK}$ .

Para un BCL de 333 ms, pasa a ser la corriente de la bomba  $Na^+/K^+$  la que presenta una sensibilidad relativa mayor respecto al calcio diastólico, obteniéndose que el efecto de las variaciones de  $I_{up}$  y de  $I_{CaL}$  en el  $Ca_D$  son de un 0'66% y un 0'57%, respectivamente, respecto a  $I_{NaK}$ . También respecto a esta última, obtenemos que el efecto en el  $Ca_S$  de  $I_{CaL}$  y de  $I_{up}$  es de un 0'79% y 0'19%, respectivamente. A ritmos cardíacos muy elevados, por tanto, se puede concluir que la corriente  $I_{NaK}$  es la más influyente en todos los biomarcadores preclínicos analizados en este trabajo. En la duración del transitorio de calcio tanto  $I_{CaL}$  como  $I_{up}$  también tienen un papel relevante.

## A

BCL 1000														
Rc,p	IKr	IKs	IK1	INa	INaL	INaK	INaCa_cai	INaCa_ss	ICaL	IpCa	Irel	Iup	Ito1	
CaD	0,028	0,002	0,031	0,038	0,024	0,953	0,318	0,304	0,349	0,068	0,054	1,000	0,013	
CaS	0,025	0,002	0,031	0,023	0,017	1,000	0,178	0,220	0,422	0,046	0,017	0,393	0,011	
CaDotMax	0,020	0,002	0,026	0,017	0,014	1,000	0,160	0,187	0,370	0,038	0,035	0,827	0,019	
CaTD90	0,189	0,038	0,071	0,009	0,123	0,433	0,033	0,056	0,320	0,012	0,069	1,000	0,007	
CaTD30	0,378	0,030	0,111	0,043	0,194	0,575	0,074	0,087	0,486	0,003	0,110	1,000	0,065	

## B

BCL 500														
Rc,p	IKr	IKs	IK1	INa	INaL	INaK	INaCa_cai	INaCa_ss	ICaL	IpCa	Irel	Iup	Ito1	
CaD	0,009	0,001	0,034	0,061	0,037	0,880	0,220	0,219	0,437	0,056	0,037	1,000	0,003	
CaS	0,017	0,001	0,030	0,032	0,018	1,000	0,084	0,121	0,541	0,030	0,010	0,148	0,004	
CaDotMax	0,014	0,001	0,025	0,025	0,015	1,000	0,073	0,103	0,559	0,025	0,016	0,373	0,008	
CaTD90	0,101	0,002	0,089	0,084	0,123	0,869	0,024	0,077	0,728	0,020	0,050	1,000	0,048	
CaTD30	0,120	0,008	0,061	0,053	0,038	0,900	0,190	0,238	0,786	0,050	0,111	1,000	0,042	

## C

BCL 333														
Rc,p	IKr	IKs	IK1	INa	INaL	INaK	INaCa_cai	INaCa_ss	ICaL	IpCa	Irel	Iup	Ito1	
CaD	0,014	0,001	0,043	0,071	0,029	1,000	0,131	0,157	0,568	0,047	0,020	0,663	0,018	
CaS	0,038	0,002	0,059	0,065	0,021	1,000	0,082	0,144	0,792	0,040	0,011	0,194	0,011	
CaDotMax	0,010	0,001	0,015	0,015	0,004	1,000	0,020	0,034	0,412	0,010	0,005	0,114	0,003	
CaTD90	0,250	0,040	0,191	0,072	0,057	0,919	0,070	0,143	0,933	0,012	0,116	1,000	0,033	
CaTD30	0,010	0,001	0,022	0,070	0,048	1,000	0,205	0,308	0,749	0,063	0,041	0,879	0,0003	

Tabla 1: Comparación de las sensibilidades relativas de los biomarcadores preclínicos del  $Ca^{+2}$  debido a variaciones en las propiedades de las corrientes iónicas. El naranja indica la máxima sensibilidad relativa de un biomarcador en particular. Los valores en cursiva indican que el biomarcador y el parámetro varían inversamente.

Los resultados obtenidos en este estudio son coherentes, en gran medida, con los obtenidos por Romero et al., 2011. Aunque en dicho estudio los biomarcadores estudiados correspondían mayoritariamente al potencial de acción y no al transitorio de calcio intracelular, el calcio sistólico y diastólico sí fueron medidos y caracterizados. En el estudio mencionado, el calcio sistólico se veía influido por  $I_{CaL}$ ,  $I_{NaK}$  y por  $I_{NaCa}$  (esta última solo en reducciones severas). En la

bibliografía se han encontrado, además, evidencias que apoyan el papel tan importante que ejerce  $I_{NaK}$  modulando el  $Ca_s$  durante la contracción celular (Romero et al., 2011).

## **6. CONCLUSIONES**

De acuerdo con el modelo utilizado, el software desarrollado y las simulaciones realizadas con el mismo, se puede concluir que los efectos tanto de las variaciones de la corriente de la bomba sodio - potasio como de las de la bomba SERCA en la regulación del calcio intracelular son mucho mayores que las del intercambiador sodio - calcio y, especialmente, que las de la corriente de liberación de calcio a través de los receptores de ryanodina.

Se ha demostrado la gran influencia de la bomba sodio - potasio en los cardiomiocitos ventriculares de perro, que se manifiesta en el alto valor de las sensibilidades relativas para cualquier biomarcador preclínico de calcio estudiado, adquiriendo más importancia a medida que aumenta la frecuencia cardíaca.

El nivel diastólico de calcio está regulado prácticamente por igual por la bomba sodio – potasio y la cocorrente de liberación de calcio, disminuyendo considerablemente la influencia de la bomba SERCA sobre éste a un periodo de estimulación de 333 ms (180 latidos por minuto). Por el contrario, el nivel sistólico de calcio es controlado, para cualquier período de estimulación, por la bomba sodio – potasio.

Con respecto al software desarrollado, ha resultado de gran utilidad para poder ejecutar una serie de simulaciones sistemáticas, extraer conclusiones cuantitativas y comparativas y realizar un exhaustivo análisis de sensibilidad. El resultado de su implantación ha sido satisfactorio, ya que ha permitido cubrir una amplia gama de comportamientos celulares y ha servido como herramienta de apoyo en la investigación. Además, ha posibilitado la modificación sistemática de las distintas corrientes iónicas presentes tanto en el retículo sarcoplásmico como en la membrana celular. Su implementación ha permitido la extracción de una serie de biomarcadores preclínicos de calcio, los cuales resultan de gran relevancia en la contractilidad celular.

Podemos concluir que, gracias al uso de modelos computacionales, es posible realizar análisis de forma sistemática que simulen comportamientos celulares normales y alterados (simulando mutaciones y/o acción de fármacos), en experimentos en los que únicamente con modelos biológicos sería muy complicado. Asimismo, gracias a este software, se ha logrado determinar aquellas corrientes iónicas que presentan una gran influencia en la regulación intracelular del calcio, lo cual es de gran utilidad para poder controlar la contractilidad celular y prevenir arritmias.

## **7. LIMITACIONES Y POSIBLES MEJORAS**

En primer lugar, se debe recalcar la gran utilidad de los modelos matemáticos computacionales, ya que permiten establecer numerosas condiciones que sería complicado realizar en experimentos *in vivo*. No obstante, los modelos son incapaces de reproducir la complejidad eléctrica y química de la vida con total exactitud y completitud. Asimismo, este estudio se ha realizado en cardiomiocitos ventriculares de perro, los cuales presentan numerosas similitudes con las células humanas, pero seguro existirán discrepancias.

Se debería seguir profundizando este análisis buscando en la bibliografía referencias que corroboren los datos aquí presentados en humanos, aunque seguro no sería tarea fácil ya que no se disponen de una gran variedad de datos similares en células humanas. Además, el objeto de estudio ha sido el calcio intracelular y no existen antecedentes que realicen un modelado sistemático de la regulación del mismo, ni un análisis de sensibilidad de los biomarcadores preclínicos seleccionados como relevantes en el presente trabajo.

Asimismo, el modelo de Decker – Rudy ha presentado algunos inconvenientes a la hora de bloquear un 100% corrientes como  $I_{NaK}$ ,  $I_{CaL}$  o  $I_{K1}$ , lo cual ha impedido realizar un análisis de sensibilidad completo, teniendo en cuenta todos los factores de bloqueo que se seleccionaron inicialmente.

Por otra parte, se podría seguir avanzando buscando aquellos fármacos que tengan el efecto que se ha pretendido simular con los distintos factores de bloqueo, así como una búsqueda de mutaciones que podrían causar una sobreexpresión o inhibición de algún canal iónico determinado.

Por último, se podría perfeccionar el software desarrollado de manera que todo el análisis de sensibilidad se realizara de forma automática y no manualmente, como se ha llevado a cabo en este trabajo. La idea sería añadir un botón en la interfaz de usuario y que únicamente el usuario tuviera que pulsarlo y todos los cálculos se resolvieran de forma muy rápida y automática. También se podría realizar un software más avanzado incorporando un mayor número de modelos computacionales con el fin de comparar datos entre distintos modelos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Bers, D., & Despa, S. (2006). Cardiac Myocytes Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> Regulation in Normal and Failing Hearts. *Journal Of Pharmacological Sciences*, 100(5), 315-322.

Capel, R., & Terrar, D. (2015). The importance of Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms for the initiation of the heartbeat. *Frontiers In Physiology*, 6.

Decker, K., Heijman, J., Silva, J., Hund, T., & Rudy, Y. (2009). Properties and ionic mechanisms of action potential adaptation, restitution, and accommodation in canine epicardium. *AJP: Heart And Circulatory Physiology*, 296(4), H1017-H1026.

Drake, R., Vogl, W., & Mitchell, A. (2010). *Gray Anatomía para estudiantes* (2<sup>a</sup> ed., pp. 180 - 191). Barcelona: Elsevier.

Glukhov A. V., Kalyanasundaram A., Lou Q., Hage L. T., Hansen B. J., Belevych A. E., et al. (2015). Calsequestrin 2 deletion causes sinoatrial node dysfunction and atrial arrhythmias associated with altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling and degenerative fibrosis within the mouse atrial pacemaker complex. *Eur. Heart J.* 36, 686–697.

Guyton, A., & Hall, J. (2011). *Guyton & Hall, tratado de fisiología médica* (12<sup>a</sup> ed.). Barcelona: Elsevier España.

Jalife, J., Delmar, M., Anumonwo, J., Berenfeld, O., & Kalifa, J. (2011). *Basic Cardiac Electrophysiology for the Clinician* (2<sup>a</sup> ed.). Somerset: Wiley.

Moore, K., Dalley, A., & Agur, A. (2013). *Anatomía con orientación clínica* (7<sup>a</sup> ed.). L'Hospitalet de Llobregat: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.

Neco P., Torrente A. G., Mesirca P., Zorio E., Liu N., Priori S. G., et al. (2012). Paradoxical effect of increased diastolic Ca<sup>2+</sup> release and decreased sinoatrial node activity in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 126, 392–401.

Reyes-Juárez, J., & Zarain-Herzberg, Á. (2006). Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. *Archivos De Cardiología De México*, 76, 18-32.

Romero, L., Carbonell, B., Trenor, B., Rodríguez, B., Saiz, J., & Ferrero, J. (2011). Systematic characterization of the ionic basis of rabbit cellular electrophysiology using two ventricular models. *Progress In Biophysics And Molecular Biology*, 107, 60 - 73.

Thakor, N., Ferrero, J., Saiz, J., Gramatikov, B., & Ferrero-Corral, J. (1998). *Electrophysiologic Models of Heart Cells and Cell Networks* (15th ed., pp. 73 - 83).



---

## ANEXOS

# MÓDULO MAIN

```
%=====
% Main module for the HH model
% by Chema Ferrero
% Takes the dY value from the HHmodel.m code generated by COR
% Y: state variable vector
% Y = {V , n , m , h}
%
% * Usage:
%
% * Settings can be stored in a structure and passed to the main
function *
% * These settings include (among other things):
%
% * - BCL (pacing cycle length in ms)
%
% * - TSim (duration of the simulation in
milliseconds) *
% * - NumStim (number of APs to calculate)
%
% * - storeLast (the number of beats that will be
stored) *
% * - etc
%
% *
% * Example:
%
% * settings.BCL = 100; settings.TSim = 600; settings.Amp_stim =
-20; *
% * [currents, State, t] = HH_main(settings);
%
% * plot(t, StateVars(:,1));
%
% *
%
% * The program will return a structure with all individual
currents, a complete overview of the state vector over time and a list
of the evaluated time points.
%
% * This m-file depends on the following files:
%
%=====
%function [currents,State,Ti]=HH_main(settings);
function [StateVars,Ti]=Decker_main(settings);
settings = setDefaultSettings(settings);
StateVars = [];
Ti=[];
x0 = getInitialVector(settings); % Initial conditions
t_start = tic;
h4 = waitbar(0, ' Paciencia, que ya termino ;-)' );
```

```

    progress=0;
    t0 = clock;
    opts= odeset('RelTol',1e-6);
    for p=1:settings.NumStim
        %disp(['Calculating AP ', num2str(p), ' / ',
num2str(settings.NumStim)]);
        [t,X]=ode15s('Decker_model',[0
settings.BCL],x0,opts,settings);

        waitbar(p/settings.NumStim,h4)
        x0=[X(end,1:end)];

        if p > settings.NumStim - settings.storeLast
            Ti=[Ti; t+(settings.BCL*(p-1-(settings.NumStim -
settings.storeLast)))]);
            StateVars=[StateVars; X];
        end
    end

    close(h4)
    t_elapsed = toc(t_start)

end

function StateInit = getInitialVector(data)
    StateInit = [0.0114911034744777, 0.993914988616979,
1.01475649943057, 8.38749860095482e-5, 0.000119239795531548,
0.00011296707102434, 20.6683603724432, 20.6683605553303,
0.99996982093287, 5.89853003114132e-11, 1.9237001017021e-9,
7.49117189549873e-6, 2.26882961412491e-5, 8.01952813127322e-17,
1.23556404128518e-10, 4.06959064407486e-6, 0.476679784307081,
0.0138769647384953, 0.00371438476499172, 0.000248553788631871,
0.000644426171899078, 8.62495047666861e-5, 1.12344645485893e-5,
0.255181042718489, 0.0512272866698557, 0.0045705849736195,
0.000152923243503507, 0.132814156809568, 0.053324572164618,
0.00713656414955778, 0.000318368292970148, 1.05292905767805e-5,
0.319611809402137, 0.00101841101248412, 0.991354143386887,
0.99709036251243, 0.00101841101248412, 0.000714227102027745,
1.76776038804228e-5, 0.997976503910799, 0.947581184798815,
0.996044894628276, 144.907134343314, 8.01031392415197,
8.01033434859049, -87.4947322902196];

% Initial conditions commented in COR-generated code
end

function settings = setDefaultSettings(settings)
% in the future, the stimulation parameters will override those in the
COR-generated code
    if ~isfield(settings, 'dt'), settings.dt = 0.01; end % time
step for forward euler method
    % if ~isfield(settings, 'TSim'), settings.TSim = 600; end %
duration of the simulation in milliseconds
    if ~isfield(settings, 'NumStim'), settings.NumStim= 10; end
    if ~isfield(settings, 'storeLast'), settings.storeLast =
settings.NumStim; end
    if ~isfield(settings, 'StimOffset'), settings.StimOffset = 0; end
% offset of the first stimuli in milliseconds
    if ~isfield(settings, 'BCL'), settings.BCL = 1000; end
    if ~isfield(settings, 'CI'), settings.CI = settings.BCL; end
    if ~isfield(settings, 'Amp_stim'), settings.Amp_stim = -40; end

```

```

    if ~isfield(settings, 'Dur_stim'), settings.Dur_stim = 1; end
    if ~isfield(settings, 'Amp_extra'), settings.Amp_extra =
settings.Amp_stim; end
    if ~isfield(settings, 'Dur_extra'), settings.Dur_extra =
settings.Dur_stim; end
    if ~isfield(settings, 'K_o'), settings.K_o = 5.4; end
    if ~isfield(settings, 'Na_o'), settings.Na_o = 140; end
    if ~isfield(settings, 'Cl_o'), settings.Cl_o = 100; end
    if ~isfield(settings, 'IKsB'), settings.IKB = 0.0; end
    if ~isfield(settings, 'IKsB'), settings.INaB = 0.0; end
    if ~isfield(settings, 'IKsB'), settings.ILB = 0.0; end
    if ~isfield(settings, 'fKs'), settings.fKs = 1.0; end
    if ~isfield(settings, 'fpCa'), settings.fpCa = 1.0; end
    if ~isfield(settings, 'fNaCa_cai'), settings.fNaCa_cai = 1.0; end
    if ~isfield(settings, 'fNaCa_ss_sr'), settings.fNaCa_ss_sr = 1.0;
end
    if ~isfield(settings, 'fup'), settings.fup = 1.0; end
    if ~isfield(settings, 'fCaL'), settings.fCaL = 1.0; end
    if ~isfield(settings, 'fNa'), settings.fNa = 1.0; end
    if ~isfield(settings, 'fNaK'), settings.fNaK = 1.0; end
    if ~isfield(settings, 'fNaL'), settings.fNaL = 1.0; end
    if ~isfield(settings, 'ftol'), settings.ftol = 1.0; end
    if ~isfield(settings, 'frel'), settings.frel = 1.0; end
    if ~isfield(settings, 'fKr'), settings.fKr = 1.0; end
    if ~isfield(settings, 'fIKl'), settings.fIKl = 1.0; end

end

```

# MÓDULO MODEL

```
=====
% CellML file: C:\Profesional\Investigaci n\Model Repository\Single
cell\Canine\Decker COR2Matlab\decker_2009.cellml
% CellML model: decker_2009
% Date and time: 24/10/2015 at 20:10:40
%-----
% Conversion from CellML 1.0 to MATLAB (init) was done using COR
(0.9.31.1409)
% Copyright 2002-2015 Dr Alan Garny
% http://cor.physiol.ox.ac.uk/ - cor@physiol.ox.ac.uk
%-----
% http://www.cellml.org/
%=====
=====

function dY = Decker_model(time, Y, flags, settings)

%-----
% Initial conditions
%-----

% Y = [0.0114911034744777, 0.993914988616979, 1.01475649943057,
8.38749860095482e-5, 0.000119239795531548, 0.00011296707102434,
20.6683603724432, 20.6683605553303, 0.99996982093287,
5.89853003114132e-11, 1.9237001017021e-9, 7.49117189549873e-6,
2.26882961412491e-5, 8.01952813127322e-17, 1.23556404128518e-10,
4.06959064407486e-6, 0.476679784307081, 0.0138769647384953,
0.00371438476499172, 0.000248553788631871, 0.000644426171899078,
8.62495047666861e-5, 1.12344645485893e-5, 0.255181042718489,
0.0512272866698557, 0.0045705849736195, 0.000152923243503507,
0.132814156809568, 0.053324572164618, 0.00713656414955778,
0.000318368292970148, 1.05292905767805e-5, 0.319611809402137,
0.00101841101248412, 0.991354143386887, 0.99709036251243,
0.00101841101248412, 0.000714227102027745, 1.76776038804228e-5,
0.997976503910799, 0.947581184798815, 0.996044894628276,
144.907134343314, 8.01031392415197, 8.01033434859049, -
87.4947322902196];

% YNames = {'CaMK_trap', 'Ca_JSR', 'Ca_NSR', 'Ca_i', 'Ca_ss_CaL',
'Ca_ss_sr', 'Cl_i', 'Cl_ss', 'C', 'CI', 'CI_star', 'C_star', 'O',
'OI', 'O_star', 'xr', 'C1', 'C10', 'C11', 'C12', 'C13', 'C14', 'C15',
'C2', 'C3', 'C4', 'C5', 'C6', 'C7', 'C8', 'C9', 'O1', 'hL', 'mL', 'h',
'j', 'm', 'Irel', 'al', 'ilf', 'ils', 'i2f', 'K_i', 'Na_i',
```

```

'Na_ss_sr', 'Vm'};
% YUnits = {'dimensionless', 'mM', 'mM', 'mM', 'mM', 'mM', 'mM', 'mM',
'dimensionless', 'dimensionless', 'dimensionless', 'dimensionless',
'dimensionless', 'mM_per_ms', 'dimensionless', 'dimensionless',
'dimensionless', 'dimensionless', 'mM', 'mM', 'mM', 'mV'};
% YComponents = {'CaMK_active', 'Ca', 'Ca', 'Ca', 'Ca', 'Ca', 'Ca', 'Cl',
'Cl', 'ICaL', 'ICaL', 'ICaL', 'ICaL', 'ICaL', 'ICaL', 'ICaL', 'ICaL',
'IKr_xr_gate', 'IKs', 'IKs', 'IKs', 'IKs', 'IKs', 'IKs', 'IKs', 'IKs',
'IKs', 'IKs', 'IKs', 'IKs', 'IKs', 'IKs', 'IKs', 'IKs',
'INaL_hL_gate', 'INaL_mL_gate', 'INa_h_gate', 'INa_j_gate',
'INa_m_gate', 'Irel', 'Ito1_a_gate', 'Ito1_ilf_gate', 'Ito1_ils_gate',
'Ito2_i2f_gate', 'K', 'Na', 'Na', 'membrane'};

```

```

%-----
% State variables
%-----

```

```

% 1: CaMK_trap (dimensionless) (in CaMK_active)
% 2: Ca_JSR (mM) (in Ca)
% 3: Ca_NSR (mM) (in Ca)
% 4: Ca_i (mM) (in Ca)
% 5: Ca_ss_CaL (mM) (in Ca)
% 6: Ca_ss_sr (mM) (in Ca)
% 7: Cl_i (mM) (in Cl)
% 8: Cl_ss (mM) (in Cl)
% 9: C (dimensionless) (in ICaL)
% 10: CI (dimensionless) (in ICaL)
% 11: CI_star (dimensionless) (in ICaL)
% 12: C_star (dimensionless) (in ICaL)
% 13: O (dimensionless) (in ICaL)
% 14: OI (dimensionless) (in ICaL)
% 15: O_star (dimensionless) (in ICaL)
% 16: xr (dimensionless) (in IKr_xr_gate)
% 17: C1 (dimensionless) (in IKs)
% 18: C10 (dimensionless) (in IKs)
% 19: C11 (dimensionless) (in IKs)
% 20: C12 (dimensionless) (in IKs)
% 21: C13 (dimensionless) (in IKs)
% 22: C14 (dimensionless) (in IKs)
% 23: C15 (dimensionless) (in IKs)
% 24: C2 (dimensionless) (in IKs)
% 25: C3 (dimensionless) (in IKs)
% 26: C4 (dimensionless) (in IKs)
% 27: C5 (dimensionless) (in IKs)
% 28: C6 (dimensionless) (in IKs)
% 29: C7 (dimensionless) (in IKs)
% 30: C8 (dimensionless) (in IKs)
% 31: C9 (dimensionless) (in IKs)
% 32: O1 (dimensionless) (in IKs)
% 33: hL (dimensionless) (in INaL_hL_gate)
% 34: mL (dimensionless) (in INaL_mL_gate)
% 35: h (dimensionless) (in INa_h_gate)
% 36: j (dimensionless) (in INa_j_gate)

```

```

% 37: m (dimensionless) (in INa_m_gate)
% 38: Irel (mM_per_ms) (in Irel)
% 39: a1 (dimensionless) (a in Ito1_a_gate)
% 40: ilf (dimensionless) (in Ito1_ilf_gate)
% 41: ils (dimensionless) (in Ito1_ils_gate)
% 42: i2f (dimensionless) (in Ito2_i2f_gate)
% 43: K_i (mM) (in K)
% 44: Na_i (mM) (in Na)
% 45: Na_ss_sr (mM) (in Na)
% 46: Vm (mV) (in membrane)

%-----
%-----
% Constants
%-----
%-----

CT_K_Cl_max = 1.77e-5; % mM_per_ms (in CT_K_Cl)
CT_Na_Cl_max = 2.46108e-5; % mM_per_ms (in CT_Na_Cl)
CaMK_0 = 0.05; % dimensionless (in CaMK_active)
Km = 0.0015; % mM (in CaMK_active)
alpha_CaMK = 0.05; % per_ms (in CaMK_active)
beta_CaMK = 0.00068; % per_ms (in CaMK_active)
BSLmax = 1.124; % mM (in Ca)
BSRmax = 0.047; % mM (in Ca)
KmBSL = 0.0087; % mM (in Ca)
KmBSR = 0.00087; % mM (in Ca)
cmdn_bar = 0.05; % mM (in Ca)
csqnbar = 10.0; % mM (in Ca)
km_cmdn = 0.00238; % mM (in Ca)
km_trpn = 0.0005; % mM (in Ca)
kmcsqn = 0.8; % mM (in Ca)
tau_diff = 0.2; % ms (in Ca)
tau_diff_ss = 2.0; % ms (in Ca)
trpn_bar = 0.07; % mM (in Ca)
PCa = 0.00015552; % L_per_F_ms (in ICaL)
gamma_Cai = 1.0; % dimensionless (in ICaL)
gamma_Cao = 0.341; % dimensionless (in ICaL)
thetal = 1.0; % per_ms (theta in ICaL)
theta_I = 1.0e-6; % per_ms (in ICaL)
PCab = 1.99508e-7; % L_per_F_ms (in ICab)
gamma_Ca_i = 1.0; % dimensionless (in ICab)
gamma_Ca_o = 0.341; % dimensionless (in ICab)
gClb = 0.000225; % mS_per_uF (in IClb)
g_K1_max = 0.5; % mS_per_uF (in IK1)
gKp = 0.00276; % mS_per_uF (in IKp)
gKr_max = 0.0138542; % mS_per_uF (in IKr)
gKs_max = 0.0826; % mS_per_uF (in IKs)
KmCa_act = 0.000125; % mM (in INaCa)
KmCai = 0.0036; % mM (in INaCa)
KmCao = 1.3; % mM (in INaCa)
KmNai = 12.3; % mM (in INaCa)
KmNao = 87.5; % mM (in INaCa)
Vmax = 4.5; % uA_per_uF (in INaCa)
etal = 0.27; % dimensionless (eta in INaCa)
ksat = 0.32; % dimensionless (in INaCa)
V_half = -92.0; % mV (in INaK)
ibarnak = 1.4; % uA_per_uF (in INaK)
kmko = 1.5; % mM (in INaK)
kmnai = 2.6; % mM (in INaK)
sigma = 1.0; % dimensionless (in INaK)

```

```

tau_hL = 600.0;    % ms (in INaL_hL_gate)
gNaL = 0.0065;    % mS_per_uF (in INaL)
PNab = 3.2e-9;    % L_per_F_ms (in INab)
g_Na = 9.075;     % mS_per_uF (in INa)
nsrbar = 15.0;    % mM (in ILeak)
KmpCa = 0.0005;   % mM (in IpCa)
gpCa = 0.0575;    % uA_per_uF (in IpCa)
K_beta = 0.28;    % mM (in IreI)
Krel_infinity = 1.0; % mM (in IreI)
Krel_tau = 0.0123; % mM (in IreI)
beta_0 = 4.75;    % ms (in IreI)
delta_beta_0 = 1.0; % dimensionless (in IreI)
h_beta = 10.0;    % dimensionless (in IreI)
h_rel = 8.0;     % dimensionless (in IreI)
kappa = 0.1125;  % mM_per_uA_per_uF_per_ms_per_ms (in IreI)
gto1 = 0.497458; % mS_per_uF (in Ito1)
tau_i2f = 8.0;   % ms (in Ito2_i2f_gate)
Ito2_max_scaling_factor = 1.0; % dimensionless (in Ito2)
PCl = 9.0e-7;    % L_per_F_ms (in Ito2)
kCa_ito2 = 0.4; % mM_per_ms (in Ito2)
zCl = -1.0;     % dimensionless (in Ito2)
tautr = 25.0;   % ms (in Itr)
delta_iupCaMK_bar = 0.75; % dimensionless (in Iup)
delta_kmPLB_bar = 0.00017; % mM (in Iup)
iupbar = 0.004375; % mM_per_ms (in Iup)
kmCaMK = 0.15;   % mM (in Iup)
kmup = 0.00092; % mM (in Iup)
a2 = 0.0011;    % cm (a in cell_geometry)
l = 0.01;       % cm (in cell_geometry)
Ca_o = 1.8;     % mM (in model_parameters)
Cl_o = 100.0;   % mM (in model_parameters)
F = 96485.0;   % C_per_mole (in model_parameters)
K_o = 5.4;     % mM (in model_parameters)
Na_o = 140.0;  % mM (in model_parameters)
R = 8314.0;    % J_per_kmole_K (in model_parameters)
T = 310.0;    % kelvin (in model_parameters)
prnak = 0.01833; % dimensionless (in reversal_potentials)

```

```

%-----
% Computed variables
%-----

```

```

% CT_K_Cl (mM_per_ms) (in CT_K_Cl)
% CT_Na_Cl (mM_per_ms) (in CT_Na_Cl)
% CaMK_active (dimensionless) (in CaMK_active)
% Idiff (mM_per_ms) (in Ca)
% Idiff_ss (mM_per_ms) (in Ca)
% bcsqn (dimensionless) (in Ca)
% bmyo (dimensionless) (in Ca)
% bss_cal (dimensionless) (in Ca)
% bss_sr (dimensionless) (in Ca)
% Idiff_Cl (mM_per_ms) (in Cl)
% ACT_infinity (dimensionless) (in ICaL)
% ACT_tau (ms) (in ICaL)
% ICaL (uA_per_uF) (in ICaL)
% ICaL_max (uA_per_uF) (in ICaL)
% IV_beta_infinity_star (dimensionless) (in ICaL)
% IV_beta_star (dimensionless) (in ICaL)
% IV_infinity (dimensionless) (in ICaL)
% IV_infinity_star (dimensionless) (in ICaL)
% IV_tau (ms) (in ICaL)

```

```

% IV_tau_star (ms) (in ICaL)
% OI_star (dimensionless) (in ICaL)
% alpha1 (per_ms) (alpha in ICaL)
% beta1 (per_ms) (beta in ICaL)
% delta1 (per_ms) (delta in ICaL)
% delta_I (per_ms) (in ICaL)
% x (per_ms) (in ICaL)
% x_star (per_ms) (in ICaL)
% y (per_ms) (in ICaL)
% y_star (per_ms) (in ICaL)
% ICab (uA_per_uF) (in ICab)
% IClb (uA_per_uF) (in IClb)
% K1 (dimensionless) (in IK1_K1_gate)
% alpha_k1 (dimensionless) (in IK1_K1_gate)
% beta_k1 (dimensionless) (in IK1_K1_gate)
% IK1 (uA_per_uF) (in IK1)
% gK1 (mS_per_uF) (in IK1)
% IKp (uA_per_uF) (in IKp)
% Kp (dimensionless) (in IKp)
% r (dimensionless) (in IKr_r_gate)
% tau_xr (ms) (in IKr_xr_gate)
% xr_infinity (dimensionless) (in IKr_xr_gate)
% IKr (uA_per_uF) (in IKr)
% gKr (mS_per_uF) (in IKr)
% IKs (uA_per_uF) (in IKs)
% O2 (dimensionless) (in IKs)
% OKs (dimensionless) (in IKs)
% alpha2 (per_ms) (alpha in IKs)
% beta2 (per_ms) (beta in IKs)
% delta2 (per_ms) (delta in IKs)
% eta2 (per_ms) (eta in IKs)
% gKs (mS_per_uF) (in IKs)
% gamma (per_ms) (in IKs)
% omega (per_ms) (in IKs)
% psi (per_ms) (in IKs)
% theta2 (per_ms) (theta in IKs)
% INaCa (uA_per_uF) (in INaCa)
% INaCa_cai (uA_per_uF) (in INaCa)
% INaCa_ss_sr (uA_per_uF) (in INaCa)
% denom_1 (dimensionless) (in INaCa)
% denom_2 (dimensionless) (in INaCa)
% denom_3 (mM4) (in INaCa)
% denom_4 (mM4) (in INaCa)
% denom_ss_1 (dimensionless) (in INaCa)
% denom_ss_2 (dimensionless) (in INaCa)
% denom_ss_3 (mM4) (in INaCa)
% denom_ss_4 (mM4) (in INaCa)
% num_ss (mM4_uA_per_uF) (in INaCa)
% numerator (mM4_uA_per_uF) (in INaCa)
% INaK (uA_per_uF) (in INaK)
% PK (dimensionless) (in INaK)
% PNa (dimensionless) (in INaK)
% fv (dimensionless) (in INaK)
% phil (dimensionless) (phi in INaK)
% hL_infinity (dimensionless) (in INaL_hL_gate)
% amL (per_ms) (in INaL_mL_gate)
% bmL (per_ms) (in INaL_mL_gate)
% INaL (uA_per_uF) (in INaL)
% ah (per_ms) (in INa_h_gate)
% bh (per_ms) (in INa_h_gate)
% aj (per_ms) (in INa_j_gate)

```

```

% bj (per_ms) (in INa_j_gate)
% am (per_ms) (in INa_m_gate)
% bm (per_ms) (in INa_m_gate)
% INab (uA_per_uF) (in INab)
% phi2 (dimensionless) (phi in INab)
% INa (uA_per_uF) (in INa)
% Ileak (mM_per_ms) (in Ileak)
% IpCa (uA_per_uF) (in IpCa)
% alpha_rel (mM_per_uA_per_uF_per_ms) (in Irel)
% beta_tau (ms) (in Irel)
% delta_beta_CaMK (dimensionless) (in Irel)
% rel_infinity (mM_per_ms) (in Irel)
% tau_rel (ms) (in Irel)
% a_infinity (dimensionless) (in Ito1_a_gate)
% alpha_a (per_ms) (in Ito1_a_gate)
% beta_a (per_ms) (in Ito1_a_gate)
% tau_a (ms) (in Ito1_a_gate)
% alpha_ilf (per_ms) (in Ito1_ilf_gate)
% beta_ilf (per_ms) (in Ito1_ilf_gate)
% alpha_ils (per_ms) (in Ito1_ils_gate)
% beta_ils (per_ms) (in Ito1_ils_gate)
% Ito1 (uA_per_uF) (in Ito1)
% rtol (dimensionless) (in Ito1)
% alpha_i2f (per_ms) (in Ito2_i2f_gate)
% beta_i2f (per_ms) (in Ito2_i2f_gate)
% i2f_infinity (dimensionless) (in Ito2_i2f_gate)
% Ito2 (uA_per_uF) (in Ito2)
% Ito2_max (uA_per_uF) (in Ito2)
% KCa_ito2 (dimensionless) (in Ito2)
% Itr (mM_per_ms) (in Itr)
% Iup (mM_per_ms) (in Iup)
% delta_iupCaMK (dimensionless) (in Iup)
% delta_kmPLB (mM) (in Iup)
% Idiff_Na (mM_per_ms) (in Na)
% AF (uF_mole_per_C) (in cell_geometry)
% Acap (cm2) (in cell_geometry)
% Vjsr (uL) (in cell_geometry)
% Vmyo (uL) (in cell_geometry)
% Vnsr (uL) (in cell_geometry)
% Vsr (uL) (in cell_geometry)
% Vss_CaL (uL) (in cell_geometry)
% Vss_sr (uL) (in cell_geometry)
% ageo (cm2) (in cell_geometry)
% vcell (uL) (in cell_geometry)
% caiont (uA_per_uF) (in membrane)
% clont (uA_per_uF) (in membrane)
% i_Stim (uA_per_uF) (in membrane)
% kiont (uA_per_uF) (in membrane)
% naiont (uA_per_uF) (in membrane)
% past (ms) (in membrane)
% ECl (mV) (in reversal_potentials)
% EK (mV) (in reversal_potentials)
% EKs (mV) (in reversal_potentials)
% ENa (mV) (in reversal_potentials)

%-----
%-----
% Computation
%-----
%-----

```

```

% time (ms)

EK = R*T/F*log(K_o/Y(43));
ECl = -R*T/F*log(Cl_o/Y(7));
CT_K_Cl = CT_K_Cl_max*(EK-ECl)/(EK+87.8251-ECl);
ENa = R*T/F*log(Na_o/Y(44));
CT_Na_Cl = CT_Na_Cl_max*(ENa-ECl)^4.0/((ENa-ECl)^4.0+87.8251^4.0);
Idiff = (Y(6)-Y(4))/tau_diff;
Idiff_ss = (Y(6)-Y(5))/tau_diff_ss;
bmyo =
1.0/(1.0+cmdn_bar*km_cmdn/(Y(4)+km_cmdn)^2.0+km_trpn*trpn_bar/(Y(4)+km
_trpn)^2.0);
ICab =
PCab*4.0*Y(46)*F^2.0/(R*T)*(gamma_Ca_i*Y(4)*exp(2.0*Y(46)*F/(R*T))-
gamma_Ca_o*Ca_o)/(exp(2.0*Y(46)*F/(R*T))-1.0);
IpCa = settings.fpCa*gpCa*Y(4)/(KmpCa+Y(4));
numerator = 0.8*Vmax*(Y(44)^3.0*Ca_o*exp(eta1*Y(46)*F/(R*T))-
Na_o^3.0*Y(4)*exp((eta1-1.0)*Y(46)*F/(R*T)));
denom_1 = 1.0+(KmCa_act/Y(4))^2.0;
denom_2 = 1.0+ksat*exp((eta1-1.0)*Y(46)*F/(R*T));
denom_3 =
KmCao*Y(44)^3.0+KmNao^3.0*Y(4)+KmNai^3.0*Ca_o*(1.0+Y(4)/KmCai);
denom_4 =
KmCai*Na_o^3.0*(1.0+(Y(44)/KmNai)^3.0)+Y(44)^3.0*Ca_o+Na_o^3.0*Y(4);
INaCa_cai =
settings.fNaCa_cai*numerator/(denom_1*denom_2*(denom_3+denom_4));
num_ss = 0.2*Vmax*(Y(45)^3.0*Ca_o*exp(eta1*Y(46)*F/(R*T))-
Na_o^3.0*Y(6)*exp((eta1-1.0)*Y(46)*F/(R*T)));
denom_ss_1 = 1.0+(KmCa_act/Y(6))^2.0;
denom_ss_2 = 1.0+ksat*exp((eta1-1.0)*Y(46)*F/(R*T));
denom_ss_3 =
KmCao*Y(45)^3.0+KmNao^3.0*Y(6)+KmNai^3.0*Ca_o*(1.0+Y(6)/KmCai);
denom_ss_4 =
KmCai*Na_o^3.0*(1.0+(Y(45)/KmNai)^3.0)+Y(45)^3.0*Ca_o+Na_o^3.0*Y(6);
INaCa_ss_sr =
settings.fNaCa_ss_sr*num_ss/(denom_ss_1*denom_ss_2*(denom_ss_3+denom_s
s_4));
INaCa = INaCa_cai+INaCa_ss_sr;
ageo = 2.0*pi*a2*a2+2.0*pi*a2*1;
Acap = ageo*2.0;
AF = 1.0*1.0*Acap/(F*1.0);
vcell = 1000.0*pi*a2*a2*1;
Vmyo = vcell*0.678;
Ileak = 0.004375/nsrbar*Y(3);
CaMK_active = CaMK_0*(1.0-Y(1))/(1.0+Km/Y(6))+Y(1);
delta_iupCaMK =
delta_iupCaMK_bar*CaMK_active*1.0/(kmCaMK+CaMK_active*1.0);
delta_kmPLB =
delta_kmPLB_bar*CaMK_active*1.0/(kmCaMK+CaMK_active*1.0);
Iup = settings.fup*(delta_iupCaMK+1.0)*iupbar*Y(4)/(Y(4)+kmup-
delta_kmPLB);
Vnsr = vcell*0.0552;
Vss_sr = vcell*0.02;
dY(4, 1) = bmyo*(-(ICab+IpCa-2.0*INaCa)*AF/(Vmyo*2.0)+(Ileak-
Iup)*Vnsr/Vmyo+Idiff*Vss_sr/Vmyo);
bss_sr =
1.0/(1.0+BSRmax*KmBSR/(KmBSR+Y(6))^2.0+BSLmax*KmBSL/(KmBSL+Y(6))^2.0);
Vjsr = vcell*0.0048;
dY(6, 1) = -bss_sr*(Idiff+Idiff_ss-
(2.0*INaCa_ss_sr*AF/(2.0*Vss_sr)+Y(38)*Vjsr/Vss_sr));
bss_cal =

```

```

1.0/(1.0+BSRmax*KmBSR/(KmBSR+Y(5))^2.0+BSLmax*KmBSL/(KmBSL+Y(5))^2.0);
ICaL_max =
PCa*4.0*Y(46)*F^2.0/(R*T)*(gamma_Cai*Y(5)*exp(2.0*Y(46)*F/(R*T))-
gamma_Cao*Ca_o)/(exp(2.0*Y(46)*F/(R*T))-1.0);
ICaL = settings.fCaL*ICaL_max*(Y(13)+Y(15));
Vss_CaL = vcell*0.002;
dY(5, 1) = -bss_cal*(ICaL*AF/(2.0*Vss_CaL)-Idiff_ss*Vss_sr/Vss_CaL);
Itr = (Y(3)-Y(2))/tautr;
dY(3, 1) = Iup-(Ileak+Itr*Vjsr/Vnsr);
bcsqn = 1.0/(1.0+kmcsqn*csqnbar/(Y(2)+kmcsqn)^2.0);
dY(2, 1) = bcsqn*(Itr-Y(38));
dY(1, 1) = alpha_CaMK*CaMK_active*(CaMK_active-Y(1))-beta_CaMK*Y(1);
Idiff_Cl = (Y(8)-Y(7))/tau_diff;
IClb = gClb*(Y(46)-ECl);
dY(7, 1) = -(IClb*AF/(-1.0*Vmyo)-
(CT_Na_Cl+CT_K_Cl+Idiff_Cl*Vss_sr/Vmyo));
Ito2_max = PCl*zCl^2.0*Y(46)*F^2.0/(R*T)*(Y(7)-
Cl_o*exp(Y(46)*F/(R*T)))/(1.0-exp(Y(46)*F/(R*T)));
KCa_ito2 = 1.0-1.0/(1.0+(Y(38)/kCa_ito2)^2.0);
Ito2 = Ito2_max*Ito2_max_scaling_factor*Y(42)*KCa_ito2;
dY(8, 1) = -(Ito2*AF/(-1.0*Vss_sr)+Idiff_Cl);
OI_star = 1.0-(Y(9)+Y(13)+Y(12)+Y(15)+Y(10)+Y(14)+Y(11));
ACT_infinity = 1.0/(1.0+exp(-(Y(46)-13.56)/9.45));
ACT_tau =
0.59+0.8*exp(0.052*(Y(46)+13.0))/(1.0+exp(0.132*(Y(46)+13.0)));
alphaI = ACT_infinity/ACT_tau;
deltaI = 3.0/(1.0+(0.003/Y(5))^4.0);
IV_infinity = (1.0/(1.0+exp((Y(46)+17.5)/3.0))+0.25)/1.25;
IV_tau =
1.0/(1.0/(24.828*(1.0+exp((Y(46)+49.1)/10.349)))+1.0/(30.553*(1.0+exp(
-(Y(46)+0.213)/10.807))));
y = (1.0-IV_infinity)/IV_tau;
betaI = (1.0-ACT_infinity)/ACT_tau;
x = IV_infinity/IV_tau;
dY(9, 1) = -(alphaI+deltaI+y)*Y(9)+betaI*Y(13)+thetaI*Y(12)+x*Y(10);
dY(13, 1) = -(betaI+deltaI+y)*Y(13)+alphaI*Y(9)+thetaI*Y(15)+x*Y(14);
IV_infinity_star = (1.0/(1.0+exp((Y(46)+17.5)/3.0))+0.0001)/1.0001;
IV_beta_infinity_star = 25.0-17.5/(1.0+(0.003/Y(5))^4.0);
IV_beta_star = 1.0/(IV_beta_infinity_star*(1.0+exp(-
(Y(46)+0.213)/10.807)));
IV_tau_star =
1.0/(1.0/(24.828*(1.0+exp((Y(46)+49.1)/10.349)))+IV_beta_star);
y_star = (1.0-IV_infinity_star)/IV_tau_star;
x_star = IV_infinity_star/IV_tau_star;
dY(12, 1) = -
(alphaI+thetaI+y_star)*Y(12)+deltaI*Y(9)+betaI*Y(15)+x_star*Y(11);
dY(15, 1) = -
(betaI+thetaI+y_star)*Y(15)+deltaI*Y(13)+alphaI*Y(12)+x_star*OI_star;
delta_I = theta_I*x*y_star*deltaI/(y*x_star*thetaI);
dY(10, 1) = -
(alphaI+delta_I+x)*Y(10)+y*Y(9)+theta_I*Y(11)+betaI*Y(14);
dY(14, 1) = -
(betaI+delta_I+x)*Y(14)+y*Y(13)+theta_I*OI_star+alphaI*Y(10);
dY(11, 1) = -
(alphaI+theta_I+x_star)*Y(11)+delta_I*Y(10)+y_star*Y(12)+betaI*OI_star
;
gK1 = g_K1_max*sqrt(K_o/5.4);
alpha_k1 = 1.02/(1.0+exp(0.2385*(Y(46)-EK-59.215)));
beta_k1 = (0.49124*exp(0.08032*(Y(46)-EK+5.476))+exp(0.06175*(Y(46)-
EK-594.31)))/(1.0+exp(-0.5143*(Y(46)-EK+4.753)));
K1 = alpha_k1/(alpha_k1+beta_k1);

```

```

IK1 = settings.fIK1*gK1*K1*(Y(46)-EK);
Kp = 1.0/(1.0+exp((7.488-Y(46))/5.98));
IKp = gKp*Kp*(Y(46)-EK);
gKr = gKr_max*sqrt(K_o/5.4);
r = 1.0/(1.0+exp((Y(46)+10.0)/15.4));
IKr = settings.fKr*gKr*Y(16)*r*(Y(46)-EK);
xr_infinity = 1.0/(1.0+exp(-(Y(46)+10.085)/4.25));
tau_xr = 1.0/(0.0006*(Y(46)-1.7384)/(1.0-exp(-0.136*(Y(46)-1.7384)))+0.0003*(Y(46)+38.3608)/(exp(0.1522*(Y(46)+38.3608))-1.0));
dY(16, 1) = (xr_infinity-Y(16))/tau_xr;
gKs = gKs_max*(1.0+0.6/(1.0+(3.8e-5/Y(4))^1.4));
O2 = 1.0-(Y(17)+Y(24)+Y(25)+Y(26)+Y(27)+Y(28)+Y(29)+Y(30)+Y(31)+Y(18)+Y(19)+Y(20)+Y(21)+Y(22)+Y(23)+Y(32));
OKs = Y(32)+O2;
EKs = R*T/F*log((K_o+prnak*Na_o)/(Y(43)+prnak*Y(44)));
IKs = settings.fKs*gKs*OKs*(Y(46)-EKs);
alpha2 = 0.01486459798086*exp(0.02987730123588*Y(46)*F/(R*T));
beta2 = 0.08398631219983*exp(-0.05546105712664*Y(46)*F/(R*T));
dY(17, 1) = -4.0*alpha2*Y(17)+beta2*Y(24);
gamma = 0.01460066118316*exp(0.24464953099645*Y(46)*F/(R*T));
delta2 = 0.0031173268874*exp(-0.42625451944376*Y(46)*F/(R*T));
dY(24, 1) = -
(3.0*alpha2+beta2+gamma)*Y(24)+4.0*alpha2*Y(17)+2.0*beta2*Y(25)+delta2*Y(28);
dY(25, 1) = -
(2.0*alpha2+2.0*beta2+2.0*gamma)*Y(25)+3.0*alpha2*Y(24)+3.0*beta2*Y(26)+delta2*Y(29);
dY(26, 1) = -
(alpha2+3.0*beta2+3.0*gamma)*Y(26)+2.0*alpha2*Y(25)+4.0*beta2*Y(27)+delta2*Y(30);
dY(27, 1) = -(4.0*beta2+4.0*gamma)*Y(27)+alpha2*Y(26)+delta2*Y(31);
dY(28, 1) = -(3.0*alpha2+delta2)*Y(28)+beta2*Y(29)+gamma*Y(24);
dY(29, 1) = -
(2.0*alpha2+beta2+gamma+delta2)*Y(29)+3.0*alpha2*Y(28)+2.0*beta2*Y(30)+2.0*gamma*Y(25)+2.0*delta2*Y(18);
dY(30, 1) = -
(alpha2+2.0*beta2+2.0*gamma+delta2)*Y(30)+2.0*alpha2*Y(29)+3.0*beta2*Y(31)+3.0*gamma*Y(26)+2.0*delta2*Y(19);
dY(31, 1) = -
(3.0*beta2+3.0*gamma+delta2)*Y(31)+alpha2*Y(30)+4.0*gamma*Y(27)+2.0*delta2*Y(20);
dY(18, 1) = -(2.0*alpha2+2.0*delta2)*Y(18)+beta2*Y(19)+gamma*Y(29);
dY(19, 1) = -
(alpha2+beta2+gamma+2.0*delta2)*Y(19)+2.0*alpha2*Y(18)+2.0*beta2*Y(20)+2.0*gamma*Y(30)+3.0*delta2*Y(21);
dY(20, 1) = -
(2.0*beta2+2.0*gamma+2.0*delta2)*Y(20)+alpha2*Y(19)+3.0*gamma*Y(31)+3.0*delta2*Y(22);
dY(21, 1) = -(alpha2+3.0*delta2)*Y(21)+beta2*Y(22)+gamma*Y(19);
dY(22, 1) = -
(beta2+gamma+3.0*delta2)*Y(22)+alpha2*Y(21)+2.0*gamma*Y(20)+4.0*delta2*Y(23);
theta2 = 0.08953830641102;
eta2 = 0.07731990097331*exp(-0.06472612248871*Y(46)*F/(R*T));
dY(23, 1) = -(4.0*delta2+theta2)*Y(23)+gamma*Y(22)+eta2*Y(32);
psi = 0.58638228663014*exp(0.28205554331496*Y(46)*F/(R*T));
omega = 0.7940545995864*exp(-0.08017378192977*Y(46)*F/(R*T));
dY(32, 1) = -(eta2+psi)*Y(32)+omega*O2+theta2*Y(23);
INa = settings.fNa*g_Na*Y(37)^3.0*Y(35)*Y(36)*(Y(46)-ENa);
phil = sigma*(Y(46)-V_half)*F/(R*T);

```

```

fv = 1.0/(1.0+exp(-phil));
PK = K_o/(K_o+kmko);
PNa = (Y(44)/(Y(44)+kmnai))^3.0;
INaK = settings.fNaK*ibarnak*fv*PK*PNa;
INaL = settings.fNaL*gNaL*Y(34)^3.0*Y(33)*(Y(46)-ENa);
hL_infinity = 1.0/(1.0+exp((Y(46)+91.0)/6.1));
dY(33, 1) = (hL_infinity-Y(33))/tau_hL;
amL = 0.32*(Y(46)+47.13)/(1.0-exp(-0.1*(Y(46)+47.13)));
bmL = 0.08*exp(-Y(46)/11.0);
dY(34, 1) = amL*(1.0-Y(34))-bmL*Y(34);

if (Y(46) >= -40.0)
    ah = 0.0;
else
    ah = 0.135*exp((80.0+Y(46))/-6.8);
end;

if (Y(46) >= -40.0)
    bh = 1.0/(0.13*(1.0+exp((Y(46)+10.66)/-11.1)));
else
    bh = 3.56*exp(0.079*Y(46))+3.1e5*exp(0.35*Y(46));
end;

dY(35, 1) = ah*(1.0-Y(35))-bh*Y(35);

if (Y(46) >= -40.0)
    aj = 0.0;
else
    aj = (-1.2714e5*exp(0.2444*Y(46))-6.948e-5*exp(-
0.04391*Y(46)))*(Y(46)+37.78)/(1.0+exp(0.311*(Y(46)+79.23)));
end;

if (Y(46) >= -40.0)
    bj = 0.3*exp(-2.535e-7*Y(46))/(1.0+exp(-0.1*(Y(46)+32.0)));
else
    bj = 0.1212*exp(-0.01052*Y(46))/(1.0+exp(-0.1378*(Y(46)+40.14)));
end;

dY(36, 1) = aj*(1.0-Y(36))-bj*Y(36);
am = 0.32*(Y(46)+47.13)/(1.0-exp(-0.1*(Y(46)+47.13)));
bm = 0.08*exp(-Y(46)/11.0);
dY(37, 1) = am*(1.0-Y(37))-bm*Y(37);
phi2 = F*Y(46)/(R*T);
INab = F*PNab*phi2*(Y(44)*exp(phi2)-Na_o)/(exp(phi2)-1.0);
delta_beta_CaMK =
delta_beta_0/(1.0+(K_beta/(1.0*CaMK_active))^h_beta);
beta_tau = beta_0*(1.0+delta_beta_CaMK);
alpha_rel = beta_tau*kappa;
tau_rel = beta_tau/(1.0+Krel_tau/Y(2));
rel_infinity =
settings.frel*ICaL*alpha_rel/(1.0+(Krel_infinity/Y(2))^h_rel);
dY(38, 1) = -(rel_infinity+Y(38))/tau_rel;
rto1 = exp(Y(46)/550.0);
Ito1 = settings.fto1*gto1*Y(39)^3.0*Y(40)*Y(41)*rto1*(Y(46)-EK);
alpha_a = 1.0/(1.2089*(1.0+exp((Y(46)-18.4099)/-29.3814)));
beta_a = 3.5/(1.0+exp((Y(46)+100.0)/29.3814));
tau_a = 1.0/(alpha_a+beta_a);
a_infinity = 1.0/(1.0+exp((Y(46)+9.437)/-7.133));
dY(39, 1) = (a_infinity-Y(39))/tau_a;
beta_ilf = 1.0/(9.7953*(1.0+exp((Y(46)+19.0)/-9.0)));

```

```

alpha_ilf = 0.025/(1.0+exp((Y(46)+58.0)/5.0));
dY(40, 1) = alpha_ilf*(1.0-Y(40))-beta_ilf*Y(40);
beta_ils = 1.0/(9.7953*(1.0+exp((Y(46)+19.0)/-9.0)));
alpha_ils = 1.0/(250.0*(1.0+exp((Y(46)+60.0)/5.0)));
dY(41, 1) = alpha_ils*(1.0-Y(41))-beta_ils*Y(41);
alpha_i2f = 0.025/(1.0+exp((Y(46)+58.0)/5.0));
beta_i2f = 1.0/(5.0*(1.0+exp((Y(46)+19.0)/-9.0)));
i2f_infinity = alpha_i2f/(alpha_i2f+beta_i2f);
dY(42, 1) = (i2f_infinity-Y(42))/tau_i2f;
past = floor(time/settings.BCL)*settings.BCL;

if ((time-past >= settings.StimOffset) && (time-past <=
settings.StimOffset+settings.Dur_stim))
    i_Stim = settings.Amp_stim;
else
    i_Stim = 0.0;
end;

dY(43, 1) = -((IKs+IKr+IKl+Itol+IKp+i_Stim-2.0*INaK)*AF/Vmyo-CT_K_Cl);
Idiff_Na = (Y(45)-Y(44))/tau_diff;
dY(44, 1) = -((3.0*INaCa+3.0*INaK+INa+INaL+INab)*AF/Vmyo-
(CT_Na_Cl+Idiff_Na*vss_sr/Vmyo));
dY(45, 1) = -(3.0*INaCa_ss_sr*AF/Vss_sr+Idiff_Na);
Vsr = vcell*0.06;
caiont = IcaL+IcaB+IpcCa-2.0*(INaCa+INaCa_ss_sr);
naiont = INa+3.0*(INaCa+INaCa_ss_sr)+3.0*INaK+INaL+INab;
kiont = IKr+IKs+IKl+IKp+-2.0*INaK+Itol+i_Stim;
clont = IClb+Ito2;
dY(46, 1) = -(naiont+kiont+caiont+clont);

%=====
% End of file
%=====
=====

```

# MÓDULO CURRENTS

```
%=====
% Modulo Currents
% Este modulo permite visualizar graficamente todas las
% corrientes ionicas presentes en el modelo de Decker - Rudy
% Autora: Estefania Renu Carretero
%-----
% Constants
%-----
R = 8314.0;
T = 310.0;
F = 96485.0;
gamma_Cao = 0.341;
Ca_o = 1.8;
Na_o = 140.0;
g_Na = 9.075;
g_Kl_max = 0.5;
K_o = 5.4;
delta_iupCaMK_bar = 0.75;
CaMK_0 = 0.05;
Km = 0.0015;
kmCaMK = 0.15;
iupbar = 0.004375;
kmup = 0.00092;
delta_kmPLB_bar = 0.00017;
gKr_max = 0.0138542;
gKs_max = 0.0826;
prnak = 0.01833;
ibarnak = 1.4;
sigma = 1.0;
V_half = -92.0;
kmko = 1.5;
kmnai = 2.6;
gNaL = 0.0065;
Vmax = 4.5;
etal = 0.27;
KmCa_act = 0.000125;
ksat = 0.32;
KmCao = 1.3;
KmCai = 0.0036;
KmNao = 87.5;
KmNai = 12.3;
gtol = 0.497458;
beta_0 = 4.75;
delta_beta_0 = 1.0;
K_beta = 0.28;
h_beta = 10.0;
kappa = 0.1125;
Krel_tau = 0.0123;
Krel_infinity = 1.0;
h_rel = 8.0;
```

```

%-----
% Currents Computation
%-----
    IpCa= 0.0575.*StateVars1000c(:,4)/(0.0005+StateVars1000c(:, 4));
    ICaL_max= 0.00015552.*4.0.*StateVars1000c(:,
46).*96485.0.^2.0./(8314.0.*310.0).*(1.0.*StateVars1000c(:,
5).*exp(2.0.*StateVars1000c(:, 46).*96485.0./(8314.0.*310.0))-
0.341.*1.8)./(exp(2.0.*StateVars1000c(:,
46).*96485.0./(8314.0.*310.0))-1.0);
    ICaL= ICaL_max.*(StateVars1000c(:, 13)+StateVars1000c(:, 15));
    INa =
9.075.*StateVars1000c(:,37).^3.0.*StateVars1000c(:,35).*StateVars1000c
(:,36).*(StateVars1000c(:, 46)-
(R.*T./F.*log(Na_o./StateVars1000c(:,44))));
    gK1 = g_K1_max.*sqrt(K_o./5.4);
    EK = (R.*T./F).*log(K_o./StateVars1000c(:, 43));
    alpha_k1 = 1.02./(1.0+exp(0.2385.*(StateVars1000c(:,46)-EK-
59.215)));
    beta_k1 = (0.49124.*exp(0.08032.*(StateVars1000c(:,46)-
EK+5.476))+exp(0.06175.*(StateVars1000c(:,46)-EK-594.31)))/(1.0+exp(-
0.5143.*(StateVars1000c(:,46)-EK+4.753)));
    K1 = alpha_k1./(alpha_k1+beta_k1);
    IK1 = gK1.*K1.*(StateVars1000c(:, 46)-EK);
    CaMK_active = CaMK_0.*(1.0-StateVars1000c(:,
1))./(1.0+Km./StateVars1000c(:, 6))+StateVars1000c(:, 1);
    delta_iupCaMK =
delta_iupCaMK_bar.*CaMK_active.*1.0/(kmCaMK+CaMK_active.*1.0);
    delta_kmPLB =
delta_kmPLB_bar.*CaMK_active.*1.0/(kmCaMK+CaMK_active.*1.0);
    Iup = (delta_iupCaMK+1.0).*iupbar.*StateVars1000c(:,
4)./(StateVars1000c(:, 4)+kmup-delta_kmPLB);
    r = 1.0./(1.0+exp((StateVars1000c(:, 46)+10.0)/15.4));
    gKr = gKr_max.*sqrt(K_o./5.4);
    IKr = gKr.*StateVars1000c(:, 16).*r.*(StateVars1000c(:, 46)-EK);
    gKs = gKs_max.*(1.0+0.6./(1.0+(3.8e-5./StateVars1000c(:, 4)).^1.4));
    O2 = 1.0-(StateVars1000c(:, 17)+StateVars1000c(:,
24)+StateVars1000c(:,25)+StateVars1000c(:,26)+StateVars1000c(:,27)+Sta
teVars1000c(:,28)+StateVars1000c(:,29)+StateVars1000c(:,30)+StateVars1
000c(:,31)+StateVars1000c(:,18)+StateVars1000c(:,19)+StateVars1000c(:,
20)+StateVars1000c(:,21)+StateVars1000c(:,
22)+StateVars1000c(:,23)+StateVars1000c(:, 32));
    OKs = StateVars1000c(:,32)+O2;
    EKs = R.*T./F.*log((K_o+prnak.*Na_o)./(StateVars1000c(:,
43)+prnak.*StateVars1000c(:, 44)));
    IKs = gKs.*OKs.*(StateVars1000c(:, 46)-EKs);
    phil = sigma.*(StateVars1000c(:, 46)-V_half).*F./(R.*T);
    fv = 1.0./(1.0+exp(-phil));
    PK = K_o./(K_o+kmko);
    PNa = (StateVars1000c(:, 44)./(StateVars1000c(:, 44)+kmnai)).^3.0;
    INaK = ibarnak.*fv.*PK.*PNa;
    ENa = R.*T./F.*log(Na_o./StateVars1000c(:, 44));
    INaL = gNaL.*StateVars1000c(:,34).^3.0.*StateVars1000c(:,
33).*(StateVars1000c(:, 46)-ENa);
    numerator = 0.8.*Vmax.*(StateVars1000c(:,
44).^3.0.*Ca_o.*exp(etal.*StateVars1000c(:, 46).*F./(R.*T))-
Na_o.^3.0.*StateVars1000c(:, 4).*exp((etal-1.0).*StateVars1000c(:,
46).*F./(R.*T)));
    denom_1 = 1.0+(KmCa_act./StateVars1000c(:, 4)).^2.0;
    denom_2 = 1.0+ksat.*exp((etal-1.0).*StateVars1000c(:,
46).*F./(R.*T));

```

```

denom_3 = KmCao.*StateVars1000c(:,
44).^3.0+KmNao.^3.0.*StateVars1000c(:,
4)+KmNai.^3.0.*Ca_o.*(1.0+StateVars1000c(:, 4)./KmCai);
denom_4 = KmCai.*Na_o.^3.0.*(1.0+(StateVars1000c(:,
44)./KmNai).^3.0)+StateVars1000c(:,
44).^3.0.*Ca_o+Na_o.^3.0.*StateVars1000c(:, 4);
INaCa_cai = numerator./(denom_1.*denom_2.*(denom_3+denom_4));
rtol = exp(StateVars1000c(:,46)./550.0);
Ito1 =
gtol.*StateVars1000c(:,39).^3.0.*StateVars1000c(:,40).*StateVars1000c(
:,41).*rtol.*(StateVars1000c(:,46)-EK);
delta_beta_CaMK =
delta_beta_0./(1.0+(K_beta./(1.0.*CaMK_active)).^h_beta);
beta_tau = beta_0.*(1.0+delta_beta_CaMK);
alpha_rel = beta_tau.*kappa;
rel_infinity =
ICaL.*alpha_rel./(1.0+(Krel_infinity./StateVars1000c(:,2)).^h_rel);

```

# MÓDULO CA\_MEASURES

```
function
[LCAT,CI, CaD, CaS, CaDotMax, CaTD90, CaTD30, Tri]=Ca_measures(Ti,StateVars,
plotYN);

    umbral_LCAT = 1.5*10^-4;

    dVdt_peak_threshold = 0.5e-6;    % Threshold of dVdt to be a real
dVdt_max
    t_dVdt_peak_threshold = 150; % Minimum distance between
consecutive dVdt peaks to be distinct action potentials
    t_exc_Vpeak = 300;             % milliseconds to the right of
dVdt_peak to find Vmax
    t_exc_VCaD = 150;             % milliseconds to the left of dVdt_peak to
find RMP

NT = length (Ti);
NV = length(StateVars);

if NT ~= NV
    h = msgbox('Los vectores de tiempo y de potencial no se
corresponden');
    return
end

% Calculate first derivative
for i=1:NT-1
    %dVdt(i)=(Ti(i+1)-Ti(i))/(StateVars(i+1)-StateVars(i));
    dVdt(i)=(StateVars(i+1)-StateVars(i))/(Ti(i+1)-Ti(i));

end

dVdt(NT)=dVdt(NT-1);

% Find derivative peaks
% Filter by threshold and generate dVdt_raw1 candidates (i.e.
before filtering by proximity
[dVdt_peak_raw0,pos_dVdt_peak_raw0] = findpeaks(dVdt);
dVdt_peak_raw1=[];
pos_dVdt_peak_raw1=[];
t_dVdt_peak_raw1=[];
for i=1:length(dVdt_peak_raw0)
    if dVdt_peak_raw0(i) > dVdt_peak_threshold
        dVdt_peak_raw1=[dVdt_peak_raw1 dVdt_peak_raw0(i)];
        pos_dVdt_peak_raw1=[pos_dVdt_peak_raw1
pos_dVdt_peak_raw0(i)];
        t_dVdt_peak_raw1=[t_dVdt_peak_raw1
```

```

Ti(pos_dVdt_peak_raw0(i));
    end
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Calculate Local Calcium Activation Time LCAT

j = 1;
for i=1:NT-2
    sino = and(dVdt(i)<0, dVdt(i+1)>=0);
    if isequal(sino,1)
        if dVdt(i+1)<umbral_LCAT
            LCAT(j)=Ti(i);
            j=j+1;
        end
    end
end
NPA = j-1;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% ALORITHM TO GET RID OF SECONDARY DERIVATIVE PEAKS %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% FIRST PASS OF THE ALGORITHM %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

N_AP_c = length(dVdt_peak_raw1); % Candidates to be an action
potential

flag_pos_dVdt=ones(N_AP_c,1); % a '1' in the position of a
candidate confirms that it is an AP
for n=1:N_AP_c - 1
    if t_dVdt_peak_raw1(n+1) - t_dVdt_peak_raw1(n) <
t_dVdt_peak_threshold
        if dVdt_peak_raw1(n+1) > dVdt_peak_raw1(n)
            flag_pos_dVdt(n) = 0;
        else
            flag_pos_dVdt(n+1) = 0;
        end
    end
end

% Now flag_pos_dVdt has '1' in the correct positions and '0' in
positions of false new APs

dVdt_peak_raw2=[];
pos_dVdt_peak_raw2=[];
t_dVdt_peak_raw2=[];
for n=1:N_AP_c
    if flag_pos_dVdt(n) == 1
        dVdt_peak_raw2 = [dVdt_peak_raw2 dVdt_peak_raw1(n)];
        t_dVdt_peak_raw2 = [t_dVdt_peak_raw2 t_dVdt_peak_raw1(n)];
        pos_dVdt_peak_raw2 = [pos_dVdt_peak_raw2
pos_dVdt_peak_raw1(n)];
    end
end

% Now vectors dVdt_peak_raw2, t_dVdt_peak_raw2, and
pos_dVdt_peak_raw2 contain more plausible APs

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% SECOND PASS OF THE ALGORITHM
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

N_AP_c = length(dVdt_peak_raw2); % Candidates to be an action
potential

flag_pos_dVdt=ones(N_AP_c,1); % a '1' in the position of a
candidate confirms that it is an AP
for n=1:N_AP_c - 1
    if t_dVdt_peak_raw2(n+1) - t_dVdt_peak_raw2(n) <
t_dVdt_peak_threshold
        if dVdt_peak_raw2(n+1) > dVdt_peak_raw2(n)
            flag_pos_dVdt(n) = 0;
        else
            flag_pos_dVdt(n+1) = 0;
        end
    end
end

% Now flag_pos_dVdt has '1' in the correct positions and '0' in
positions of false new APs

dVdt_peak_raw3=[];
pos_dVdt_peak_raw3=[];
t_dVdt_peak_raw3=[];
for n=1:N_AP_c
    if flag_pos_dVdt(n) == 1
        dVdt_peak_raw3 = [dVdt_peak_raw3 dVdt_peak_raw2(n)];
        t_dVdt_peak_raw3 = [t_dVdt_peak_raw3 t_dVdt_peak_raw2(n)];
        pos_dVdt_peak_raw3 = [pos_dVdt_peak_raw3
pos_dVdt_peak_raw2(n)];
    end
end

% Now vectors dVdt_peak_raw3, t_dVdt_peak_raw3, and
pos_dVdt_peak_raw3 contain more plausible APs

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% THIRD PASS OF THE ALGORITHM
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
N_AP_c = length(dVdt_peak_raw3); % Candidates to be an action
potential

flag_pos_dVdt=ones(N_AP_c,1); % a '1' in the position of a
candidate confirms that it is an AP
for n=1:N_AP_c - 1
    if t_dVdt_peak_raw3(n+1) - t_dVdt_peak_raw3(n) <
t_dVdt_peak_threshold
        if dVdt_peak_raw3(n+1) > dVdt_peak_raw3(n)
            flag_pos_dVdt(n) = 0;
        else
            flag_pos_dVdt(n+1) = 0;
        end
    end
end
end

```

```

    % Now flag_pos_dVdt has '1' in the correct positions and '0' in
    positions of false new APs

    dVdt_peak_raw4=[];
    pos_dVdt_peak_raw4=[];
    t_dVdt_peak_raw4=[];
    for n=1:N_AP_c
        if flag_pos_dVdt(n) == 1
            dVdt_peak_raw4 = [dVdt_peak_raw4 dVdt_peak_raw3(n)];
            t_dVdt_peak_raw4 = [t_dVdt_peak_raw4 t_dVdt_peak_raw3(n)];
            pos_dVdt_peak_raw4 = [pos_dVdt_peak_raw4
pos_dVdt_peak_raw3(n)];
        end
    end
    % Now flag_pos_dVdt has '1' in the correct positions and '0' in
    positions of false new APs

    N_AP_c = length(dVdt_peak_raw4);    % Candidates to be an action
    potential

    dVdt_peak=[];
    pos_dVdt_peak=[];
    t_dVdt_peak=[];
    V_dVdt_peak=[];
    for n=1:N_AP_c
        if flag_pos_dVdt(n) == 1
            dVdt_peak = [dVdt_peak dVdt_peak_raw4(n)];
            t_dVdt_peak = [t_dVdt_peak t_dVdt_peak_raw4(n)];
            pos_dVdt_peak = [pos_dVdt_peak pos_dVdt_peak_raw4(n)];
            V_dVdt_peak = [V_dVdt_peak
StateVars(pos_dVdt_peak_raw4(n))];
        end
    end

    % Calculate the number of action potentials
    N_AP = length(dVdt_peak);

    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
    % Calculate the resting membrane potentials
    V_RMP=[];
    t_RMP=[];
    % Searching for the left end of an interval for each AP
    for n=1:N_AP
        pos_ini = pos_dVdt_peak(n);    % Position of dVdt_max of nth AP
        t_ini = Ti(pos_ini);          % Instant of dVdt_max of nth AP
        t_fin = t_ini - t_exc_VCaD;    % Left end of the
exploratory interval
        % pos_fin=???? We are aiming to find pos_fin
        t_i = t_ini - 0.0;
        i = 0;
        reached_zero = 0;
        while (t_i > t_fin) && (reached_zero == 0)
            if pos_ini - i > 0
                t_i = Ti(pos_ini - i);
            else
                t_i = Ti(1);
                reached_zero = 1;
            end
            i=i+1;
        end
    end
end

```

```

    if reached_zero == 0
        pos_fin = pos_ini - i;    %The excursion window ends here
    else
        pos_fin = 1;
    end

    [V_RMP_AP,pos_V_RMP_AP_offset] =
min(StateVars(pos_fin:pos_ini));
    V_RMP(n) = V_RMP_AP;
    t_V_RMP(n) = Ti(pos_fin + pos_V_RMP_AP_offset - 1);
end
    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Calculate the voltage peaks
V_peak=[];
t_peak=[];
pos_peak=[];
% Searching for the right end of an interval for each AP
for n=1:N_AP
    pos_ini = pos_dVdt_peak(n);    % Position of dVdt_max of nth AP
    t_ini = Ti(pos_ini);          % Instant of dVdt_max of nth AP
    t_fin = t_ini + t_exc_Vpeak; % Right end of the exploratory
interval
    % pos_fin=???? We are aiming to find pos_fin
    t_i = t_ini + 0.0;
    i = 0;
    reached_finish = 0;
    while (t_i < t_fin) && (reached_finish == 0)
        if pos_ini + i < NT
            t_i = Ti(pos_ini + i);
        else
            t_i = Ti(NT);
            reached_finish = 1;
        end
        i=i+1;
    end
    if reached_finish == 0
        pos_fin = pos_ini + i;    %The excursion window ends here
    else
        pos_fin = NT;
    end

    [V_peak_AP,pos_V_peak_AP_offset] =
max(StateVars(pos_ini:pos_fin));
    V_peak(n) = V_peak_AP;
    t_V_peak(n) = Ti(pos_ini + pos_V_peak_AP_offset - 1);
    pos_peak(n) = pos_ini + pos_V_peak_AP_offset - 1;
end
% Calculate the number of action potentials
N_AP = length(dVdt_peak);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Calculate APD90 and APD30 and triangulation
for n=1:N_AP
    V90_exact = V_RMP(n) + (V_peak(n) - V_RMP(n)) * 0.1;
    reached_finish = 0;
    i=0;
    pos_V90(n) = pos_peak(n);
    while (StateVars(pos_peak(n) + i) > V90_exact) &&
(reached_finish == 0)
        pos_V90(n) = pos_peak(n) + i;
        if pos_ini + i < NT
            i=i+1;

```

```

        else
            reached_finish = 1;
        end
    end
end
t_V90(n) = Ti(pos_V90(n));
V90(n) = StateVars(pos_V90(n));
CaTD90(n) = t_V90(n) - t_dVdt_peak(n);

V30_exact = V_RMP(n) + (V_peak(n) - V_RMP(n)) * 0.7;
reached_finish = 0;
i=0;
pos_V30(n) = pos_peak(n);
while (StateVars(pos_peak(n) + i) > V30_exact) &&
(reached_finish == 0)
    pos_V30(n) = pos_peak(n) + i;
    if pos_ini + i < NT
        i=i+1;
    else
        reached_finish = 1;
    end
end
t_V30(n) = Ti(pos_V30(n));
V30(n) = StateVars(pos_V30(n));
CaTD30(n) = t_V30(n) - t_dVdt_peak(n);

Tri(n) = CaTD90(n) - CaTD30(n);
end

if N_AP > 1
    for n=2:N_AP
        CI_0(n) = t_dVdt_peak(n) - t_dVdt_peak(n-1);
    end
    CI_0(1) = CI_0(2);
else
    CI_0(1) = 0;
end

%Outputs
LCAT = t_dVdt_peak;
CI = CI_0;
CaS = V_peak;
CaDotMax = dVdt_peak;
CaD = V_RMP;

if plotYN ==1
    figure();
    subplot(221);
    plot(Ti,StateVars,t_V_peak,CaS,'xk',t_V_RMP,V_RMP,'o',t_V90,V90,'o',t_
V30,V30,'*',LCAT,V_dVdt_peak,'xg');
    subplot(222); plot(Ti,dVdt,LCAT,dVdt_peak,'o');
    subplot(223); plot(LCAT,CaTD90,'-o',LCAT,CaTD30,'-
x');axis([min(Ti) max(Ti) 0 1.1*max(CaTD90)]);
    if N_AP > 1
        subplot(224); plot(LCAT,CI,'-x');axis([min(Ti) max(Ti) 0
1.1*max(CI)]);
    end
end
end
end

```

---

# PRESUPUESTO

# PRESUPUESTO

En el presente apartado se pretende estimar la inversión económica necesaria para el desarrollo de este trabajo de fin de grado. Para ello se puede diferenciar entre los costes de personal y los costes de ejecución. A la hora de realizar dicho presupuesto se han obviado todos aquellos costes relacionados con la electricidad, los desplazamientos o la impresión del trabajo. Los precios están todos expresados en euros.

## 1. PRESUPUESTO

### 1.1.1. Coste de mano de obra

En este apartado se incluye el salario que deberían obtener todas las personas que han formado parte de este trabajo de acuerdo a los costes por hora medios definidos según los cálculos realizados en base a la siguiente premisa: el personal requerido para la realización de este proyecto ha consistido en un ingeniero biomédico, con calidad de estudiante, quien ha realizado la mayor parte del trabajo, y un doctor ingeniero que ha tutorizado, supervisado y guiado cada paso llevado a cabo. El coste por hora de ambos se ha calculado partiendo de un sueldo base de 1,300 €/mes para el ingeniero estudiante y 2,600 €/mes para el ingeniero tutor, además de dos pagas extra. Según el Ministerio de Empleo y Seguridad Social (2017), el coste de ambos para la empresa en concepto de seguridad social es de 23.6% de contingencias comunes, 5.5% de seguro de desempleo, 0.6% de formación profesional, 0.2% de FOGASA y 1.65% de IT/IMS (accidentes de trabajo y enfermedades profesionales). Considerando una jornada laboral de ocho horas diarias y descontando los fines de semana, quince días festivos y treinta días vacacionales, se obtienen 1,792 horas trabajadas al año. Es decir, el coste por hora para el ingeniero estudiante será de 14.23 €/hora y de 27.15€/hora para el ingeniero tutor.

Nº	Código	Denominación mano de obra	Precio	Horas	Total
1	MO.IBE	Ingeniero biomédico estudiante	14.23 €/h	225 h	3,201.75 €
2	MB.IBT	Ingeniero superior: tutoriza y supervisa el trabajo de MO.IBE	27.15 €/h	50 h	1,357.5 €
<b>Total</b>					<b>4,559.25 €</b>

Tabla 2: Costes de mano de obradel proyecto. Se observa la tarea de cada empleado; el precio por hora que cobra cada uno de ellos; las horas trabajadas; el total a cobrar.

### 1.1.2. Coste de ejecución

En este apartado se contemplan todos aquellos equipos informáticos que se hayan empleado para la realización de este trabajo, así como los programas que hayan sido necesarios para la ejecución del mismo. Para el cálculo exacto de estos costes, se ha tenido en cuenta la amortización de cada equipo correspondiente a la duración del proyecto, que comprende 10 meses de trabajo, dividida entre la vida útil estimada para cada producto. Todo esto se observa de manera detallada en la Tabla 4.

Nº	Código	Denominación equipo/software	Precio	Período amortización	Tiempo de uso	Total
1	EJ.OrPo	Ordenador Portátil MacBook Pro 15''	2,895 €	84 meses	10 meses	344.65 €
2	EJ.MLB	Licencia Matlab Studen R2015a	69 €	48 meses	10 meses	14.40 €
3	EJ.OFF	Pack Office 2016 para Mac	128 €	48 meses	10 meses	26.70 €
4	EJ.DiEx	Disco duro extraíble	89 €	60 meses	10 meses	14.90 €
<b>Total</b>						<b>400.65 €</b>

Tabla 3: Costes de ejecución. Incluye cada equipo o software utilizado en la realización del proyecto; el coste de cada uno; el período de amortización estimado en meses; el tiempo de uso en este trabajo; el precio total de cada uno para los diez meses.

### 1.1.3. Coste total del proyecto

Éste apartado constituye la suma de los dos costes anteriores y queda reflejado en la Tabla 5.

Descripción	Importe	
Mano de obra	4,559.25 €	
Ejecución	400.65 €	
<b>Total</b>		<b>4959.90 €</b>

Tabla 4: Coste total del trabajo de fin de grado. El coste total es la suma de los costes de mano de obra y de los de ejecución.