

Influencia de la corriente de estimulación en las diferencias entre simulaciones electrofisiológicas de célula y tejido

V. Monasterio¹, E. Pueyo^{2,3}, J. F. Rodríguez-Matas⁴, J. Carro¹

¹ Universidad San Jorge, Villanueva de Gállego, España {vmonasterio, jcarro}@usj.es

² Aragón Institute for Engineering Research, University of Zaragoza, IIS Aragón, Spain, epueyo@unizar.es

³ CIBER in Bioengineering, Biomaterials & Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain, epueyo@unizar.es

⁴ LaBS, Department of Chemistry, Materials and Chemical Engineering “Giulio Natta”, Politecnico di Milano, Italy, josefelix.rodriiguezmatas@polimi.it

Resumen

En este trabajo se presenta un estudio de simulación donde se comparan diferentes alternativas para la estimulación de modelos electrofisiológicos cardíacos en simulaciones de célula aislada, y se evalúan las diferencias entre los marcadores obtenidos y los obtenidos en simulaciones de tejido. En la comparación se incluyen las opciones utilizadas en la literatura, estimulación monofásica y bifásica cuadradas, y se propone una nueva forma de onda ajustada que imita la corriente extracelular presente en tejido. Los resultados muestran que la simulación ajustada produce los marcadores más cercanos a los obtenidos en simulaciones de tejido.

1. Introducción

Los modelos matemáticos de la actividad del corazón son una herramienta muy valiosa para mejorar nuestro conocimiento sobre la fisiología cardíaca. En particular, los modelos que describen la actividad eléctrica de los miocitos cardíacos ayudan a entender el funcionamiento de estas células en condiciones normales o durante alteraciones provocadas por enfermedades o por la acción de medicamentos.

Los modelos electrofisiológicos tratan de representar y predecir los resultados de experimentos *in vitro* o *in vivo*. Los resultados de dichos experimentos muestran un alto grado de variabilidad fisiológica, mientras que la mayoría de modelos actuales solo representan un potencial de acción (*action potential*, AP) promedio. Es por esto que, en lugar de utilizar un solo modelo, actualmente se tiende a crear conjuntos de modelos con diferentes parámetros, de manera que la población de modelos resultante sea capaz de representar la variabilidad encontrada en los experimentos [1].

Para generar una población de modelos, primero se seleccionan los parámetros a modificar y sus rangos de variación. Posteriormente, se realiza la calibración de la población, es decir, se simulan los modelos candidatos y se comparan con medidas experimentales, descartándose aquellos modelos cuyos resultados no concuerden con los datos experimentales de referencia. Un aspecto crítico en la calibración es el realismo de las simulaciones, que deben imitar lo mejor posible las condiciones experimentales y los protocolos seguidos para obtener los

datos de referencia (frecuencia y tipo de estimulación, concentraciones iónicas extracelulares, etc.) [1].

En el proceso de calibración se utilizan marcadores electrofisiológicos tales como la duración del AP, el máximo potencial de membrana, la triangulación y otros. Debido a la sensibilidad de algunos canales al proceso de aislado de las células, estos marcadores de referencia se suelen obtener a partir de experimentos con fragmentos de tejido cardíaco. En esos casos se evita la destrucción de canales que pueda afectar a las mediciones, pero el valor de algunos marcadores puede estar fuertemente influenciado por la conducción entre células. Sin embargo, los efectos derivados de la conducción no se suelen tener en cuenta durante el proceso de calibración, lo que puede constituir una fuente de error a la hora de comparar los resultados simulados y experimentales. Como ya se ha apuntado en la literatura [2], algunos marcadores no tienen una buena correspondencia entre célula aislada y tejido, y deben ser usados con precaución a la hora de desarrollar modelos o de calibrar poblaciones.

Por tanto, para utilizar como referencia los marcadores con peor correspondencia entre célula y tejido, como la triangulación o la pendiente máxima de la fase 0 del AP [2], lo deseable sería realizar las simulaciones con la población de modelos en tejido, utilizando por ejemplo un modelo sencillo de cable que incluya los efectos de la conducción. Lamentablemente esta opción supondría un coste computacional excesivamente elevado para la mayoría de los estudios. Una alternativa más plausible consistiría en incluir dentro de lo posible los efectos de la conducción en las simulaciones de célula aislada. En la literatura existen trabajos que proponen [3] y aplican [4] una estimulación bifásica en simulaciones de célula aislada para tener en cuenta el efecto de conducción electrofisiológica presente en tejido. En estos trabajos, sin embargo, no se trata explícitamente el problema de la coherencia entre los marcadores calculados en célula y en fibra.

En el presente trabajo presentamos un estudio de simulación donde comparamos diferentes alternativas para la corriente de estimulación, incluyendo opciones habituales en la literatura (estimulación monofásica, bifásica asimétrica y bifásica simétrica) y proponiendo una nueva forma de onda que imite la corriente extracelular obtenida a partir de una simulación en fibra, y

evaluamos su influencia en la correspondencia de los marcadores resultantes entre célula y tejido.

2. Métodos

2.1. Simulaciones computacionales

Se realizaron simulaciones en célula aislada y en tejido utilizando el modelo ventricular humano de ten Tusscher-Panfilov (TP06) [5] y el software de simulación ELVIRA [6].

Para simular la actividad eléctrica en tejido se creó una fibra homogénea de 3 cm de longitud compuesta de células de epicardio. La propagación eléctrica a lo largo de la fibra se modeló utilizando una ecuación de reacción-difusión monodominio. Se fijó el valor del coeficiente de difusión para obtener una velocidad de conducción de 65 cm/s [7]. La resolución numérica se realizó con un paso temporal de 0.01 ms y un paso espacial de 0.1 mm. Para estimular la fibra se aplicaron pulsos monofásicos de corriente con una amplitud del doble del umbral de estimulación, definido como la mínima amplitud capaz de propagar cinco AP seguidos. Inicialmente, la fibra se estimuló durante 100 ciclos a una frecuencia de 1 Hz (*simulación de control*) y se midió el potencial de membrana en la posición central de la fibra.

Para simular la actividad eléctrica en célula aislada se utilizó el método de integración de *Forward-Euler* con un paso temporal de 0.01 ms. Se estudiaron cuatro alternativas para la forma de onda de la corriente de estimulación. Para las tres primeras alternativas se definió el umbral de estimulación como la mínima amplitud capaz de generar cinco APs seguidos. Las alternativas estudiadas fueron:

- Pulso monofásico de 1 ms de anchura y con una amplitud del doble del umbral de estimulación (*estimulación M*).
- Pulso bifásico asimétrico, definido como en [3]:

$$I_{estim}^{BA}(t) = \begin{cases} A & 0 \leq t \leq \Delta t \\ -A\Delta t / (T - \Delta t) & \Delta t < t < T \end{cases}$$

con una anchura $\Delta t = 1$ ms, una amplitud A del doble del umbral de estimulación, y una longitud de ciclo de estimulación T (*estimulación BA*).

- Pulso bifásico simétrico, definido como:

$$I_{estim}^{BS}(t) = \begin{cases} A & 0 \leq t \leq \Delta t \\ -A & \Delta t < t \leq 2\Delta t \end{cases}$$

con una anchura $\Delta t = 1$ ms y una amplitud A del doble del umbral de estimulación (*estimulación BS*).

- Onda bifásica ajustada simétrica (*estimulación A*), definida como:

$$I_{estim}^A(t) = \begin{cases} A \frac{\beta}{\alpha} \left(\frac{\gamma-t}{\alpha}\right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{\gamma-t}{\alpha}\right)^\beta} & \gamma - \Delta t < t \leq \gamma \\ -A \frac{\beta}{\alpha} \left(\frac{t-\gamma}{\alpha}\right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{t-\gamma}{\alpha}\right)^\beta} & \gamma < t \leq \gamma + \Delta t \end{cases}$$

donde $\alpha = 0.27$, $\beta = 1.31$ y $\gamma = 0.9$ son los parámetros de escala, forma y posición de una distribución

Weibull invertida y desplazada en el tiempo. Los valores de estos parámetros se obtuvieron mediante el ajuste por mínimos cuadrados de la parte positiva del pulso a la parte positiva de la corriente axial obtenida en fibra durante la simulación de control (Figura 1). La anchura total del pulso ($2\Delta t$) se fijó en 3 ms.

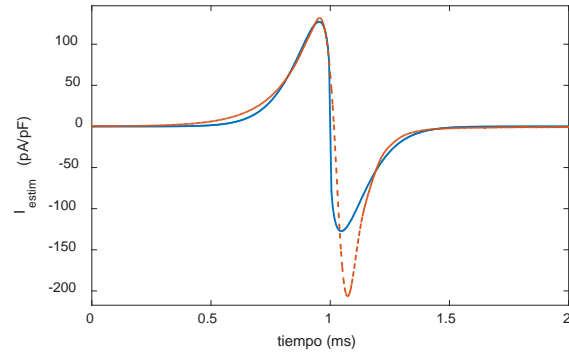


Figura 1. Superposición de la corriente axial obtenida en fibra durante la simulación de control (traza discontinua) y la forma de onda ajustada para la estimulación de célula aislada I_{estim}^A (traza continua).

2.2. Cálculo de marcadores

A partir de la simulación de control en fibra se calcularon los marcadores electrofisiológicos propuestos en [2] (Tabla 1). Posteriormente, se realizaron simulaciones de célula aislada con los cuatro tipos de estimulación. En todos los casos se aplicaron 100 ciclos de estimulación a 1 Hz y se calcularon los marcadores electrofisiológicos sobre la traza del último AP generado.

Para comparar los marcadores se calculó la diferencia relativa entre cada marcador j obtenido en célula aislada

$$(M_j^c) \text{ y en fibra } (M_j^f) \text{ como } E(\%) = \frac{M_j^c - M_j^f}{M_j^f} \cdot 100.$$

Marcadores	
APD ₉₀ (ms)	Duración del AP al 90% de repolarización
APD ₇₅ (ms)	Duración del AP al 75% de repolarización
APD ₅₀ (ms)	Duración del AP al 50% de repolarización
APD ₂₅ (ms)	Duración del AP al 25% de repolarización
Trian. (ms)	Triangulación = APD ₉₀ - APD ₅₀
V _{max} (mV)	Potencial de membrana máximo
V _{min} (mV)	Potencial de membrana de reposo
$\frac{dV}{dt}_{max}$ (V/s)	Pendiente máxima del AP
$\frac{dV}{dt}_{min}$ (V/s)	Pendiente mínima del AP

Tabla 1. Marcadores electrofisiológicos

2.3. Respuesta a la frecuencia de estimulación

Por último se realizaron simulaciones de célula aislada variando la frecuencia de estimulación entre 1 y 4 Hz en

pasos de 0.1 Hz. Para cada frecuencia y cada tipo de estimulación, la célula se estimuló durante 5 min y se calcularon el APD₉₀ y las concentraciones de Na y K intracelular, tal y como se propone en [3]. Además se realizaron simulaciones en fibra de 5 min de duración con frecuencias de estimulación entre 3 y 4 Hz, para comparar el comportamiento del modelo en célula y en fibra en el extremo de las condiciones simuladas.

3. Resultados

Los marcadores electrofisiológicos obtenidos para célula aislada y fibra se muestran en la Tabla 2. Las diferencias relativas entre célula y fibra se muestran en la Tabla 3.

Estimulación	M	BA	BS	A	Fibra
APD ₉₀ (ms)	300.6	295.7	300.1	300.2	300.2
APD ₇₅ (ms)	292.3	287.5	291.4	292.4	292.4
APD ₅₀ (ms)	273.0	268.5	270.2	276.7	276.9
APD ₂₅ (ms)	215.7	211.3	241.2	240.8	242.0
Trian. (ms)	27.6	27.2	29.9	23.5	23.3
V _{max} (mV)	37.3	37.6	42.4	25.2	24.6
V _{min} (mV)	-85.4	-85.6	-85.4	-85.4	-85.4
$\frac{dV}{dt}_{max}$ (V/s)	358.2	361.5	359.9	250.3	216.2
$\frac{dV}{dt}_{min}$ (V/s)	-8.8	-9.0	-65.0	-3.6	-3.3

Tabla 2. Marcadores electrofisiológicos simulados en célula aislada utilizando estimulación monofásica (M), bifásica asimétrica (BA), bifásica simétrica (BS), ajustada (A), y marcadores simulados en fibra

Estimulación	M	BA	BS	A
APD ₉₀ (ms)	0.1	-1.5	0.0	0.0
APD ₇₅ (ms)	0.0	-1.7	-0.3	0.0
APD ₅₀ (ms)	-1.4	-3.1	-2.4	-0.1
APD ₂₅ (ms)	-10.9	-12.7	-0.3	-0.5
Trian. (ms)	18.6	16.8	28.4	0.9
V _{max} (mV)	51.7	52.6	72.4	2.4
V _{min} (mV)	0.0	0.3	0.0	0.0
$\frac{dV}{dt}_{max}$ (V/s)	65.7	67.2	66.5	15.8
$\frac{dV}{dt}_{min}$ (V/s)	168.8	173.9	1883.7	10.6

Tabla 3. Diferencias relativas E(%) entre los marcadores calculados en célula aislada y los marcadores obtenidos en fibra

La estimulación ajustada (A) produjo las menores diferencias relativas en todos los marcadores excepto en

el APD₂₅. La mayor reducción de las diferencias célula-fibra respecto a la estimulación monofásica (M) se obtuvo para la estimulación ajustada (A) en los marcadores Triangulación, V_{max}, $\frac{dV}{dt}_{max}$ y $\frac{dV}{dt}_{min}$.

La Figura 2 muestra la variación de los marcadores en función de la frecuencia de estimulación para las simulaciones de célula aislada. Para cada tipo de simulación la traza se interrumpe en el punto en el que el intervalo entre estímulos se iguala con el periodo refractario de la célula; a partir de ese punto no todos los estímulos fueron capaces de generar nuevos APs. En las simulaciones de fibra, este punto se alcanzó con una estimulación a 3.5 Hz.

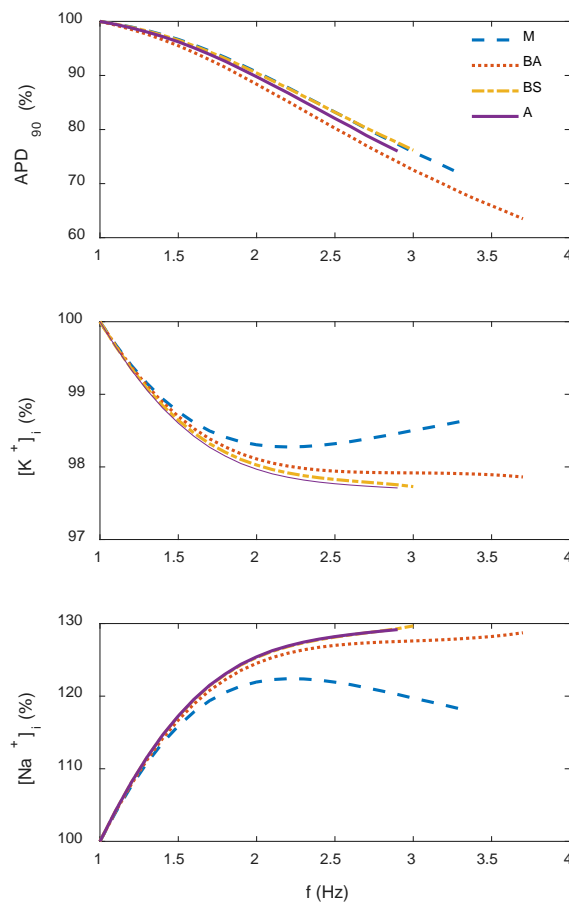


Figura 2. Variación de APD₉₀, [K⁺]_i y [Na⁺]_i en función de la frecuencia de estimulación para las diferentes formas de onda. Los valores se muestran normalizados con respecto al valor inicial (f = 1 Hz).

4. Discusión y conclusiones

En este trabajo hemos propuesto un nuevo modelo de estimulación para simulaciones de célula aislada, basado en el ajuste de la forma del pulso de estimulación a partir de la estimación de la corriente axial obtenida en simulaciones de fibra. La forma de onda ajustada es consistente con medidas experimentales [8] y reproduce el comportamiento de carga-descarga electrofisiológica presente en tejido cardíaco. Según los resultados obtenidos, los marcadores más afectados por el tipo de

estimulación fueron los relacionados con la depolarización (V_{\max} , $\frac{dV}{dt}_{\max}$ y $\frac{dV}{dt}_{\min}$). Entre los marcadores relacionados con la repolarización, el más afectado fue la triangulación. El uso de la corriente de estimulación ajustada en lugar del pulso monofásico habitual produjo los resultados de simulación en célula aislada más parecidos a los resultados de simulaciones en fibra para los marcadores analizados. Es por lo tanto una alternativa conveniente a la hora de utilizar datos experimentales obtenidos de tejido para calibrar poblaciones de modelos, sobre todo en aquellos casos en que se utilicen marcadores como la triangulación, V_{\max} , y $\frac{dV}{dt}_{\max}$.

Además de mejorar la correspondencia célula-tejido, el uso de la estimulación ajustada también puede simplificar el diseño del proceso de calibración. En [9] se estudió la corriente de estimulación como fuente de variabilidad extrínseca en la generación de APs, y se encontró que la amplitud del estímulo era un factor determinante en la variabilidad de la repolarización temprana. El uso de la estimulación ajustada a partir de simulaciones de fibra elimina la necesidad de determinar la amplitud de la corriente de estimulación de manera aislada. La amplitud de la estimulación ajustada no depende de la posición de la fibra donde se mida la corriente axial para el ajuste, siempre que se eviten los extremos de la fibra para minimizar los efectos de borde, y tampoco depende de la intensidad de la estimulación inicial del modelo de fibra. Sí que existe una dependencia de la anchura del pulso ajustado con el coeficiente de difusión utilizado en la simulación, y con la forma básica del AP generada por el modelo TP06. En este trabajo se ha optado por establecer un coeficiente de difusión que resultara en una velocidad de conducción fisiológica, pero este valor puede no resultar realista en simulaciones de tejido en condiciones patológicas. Asimismo, el valor de los parámetros α , β y γ debería ser recalculado para simulaciones basadas en modelos diferentes al TP06.

En cuanto al comportamiento frecuencial, los resultados son coherentes con la literatura [3]. En el modelo TP06 la corriente de estimulación se modela como una corriente de iones K^+ . Los resultados de la Figura 2 muestran que los efectos de la acumulación de carga positiva en el interior de la célula causada por la estimulación monofásica son mínimos para frecuencias de estimulación bajas. Por el contrario, para frecuencias de estimulación a partir de 2 Hz, la acumulación de $[K^+]_i$ producida por la estimulación monofásica empieza a ser evidente, y afecta a su vez a la concentración $[K^+]_o$, lo que puede producir cambios en la forma del AP. Para paliar este efecto, en [3] se propuso utilizar la estimulación BA. Nuestros resultados muestran que la estimulación ajustada propuesta en el presente estudio también presenta un comportamiento adecuado, evitando la sobreestimación de $[Na^+]_i$ en simulaciones de célula aislada al tratarse de una forma de onda con carga nula a lo largo del periodo de estimulación. Una limitación de nuestro estudio, sin embargo, consiste en que se ha utilizado una misma forma de onda para todas las frecuencias de estimulación, mientras que los resultados experimentales muestran que

la forma de onda de la corriente extracelular depende en cierta medida de la frecuencia de estimulación [3].

A pesar de las limitaciones, la estimulación ajustada propuesta en este estudio constituye una alternativa conveniente a la estimulación monofásica habitual para simulaciones de célula, ya que produce unos resultados más parecidos a los resultados de simulaciones de tejido sin tener que asumir el coste computacional que supondría calibrar una población de modelos en tejido en lugar de en célula.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos DPI2016-75458-R (MINECO) y MULTITOOLES2HEART-ISCIII, por el Fondo Social Europeo (EU) y el Gobierno de Aragón a través del grupo BSICoS (T39_17R), y por el European Research Council (ERC) a través del proyecto ERC-2014-StG 638284.

Referencias

- [1] A. Muszkiewicz, O. J. Britton, P. Gemmel et al., "Variability in cardiac electrophysiology: Using experimentally-calibrated populations of models to move beyond the single virtual physiological human paradigm," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 120, no. 1–3, pp. 115–127, 2016.
- [2] J. Carro, J. F. Rodríguez-Matas, V. Monasterio, and E. Pueyo, "Limitations in electrophysiological model development and validation caused by differences between simulations and experimental protocols," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 129, pp. 53–64, 2017.
- [3] L. Livshitz and Y. Rudy, "Uniqueness and stability of action potential models during rest, pacing, and conduction using problem-solving environment," *Biophys. J.*, vol. 97, no. 5, pp. 1265–1276, 2009.
- [4] O. J. Britton, A. Bueno-Orovio, L. Virag, A. Varro, and B. Rodriguez, "Effect of inter-subject variability in determining response to IKr block in human ventricular myocytes," *Comput. Cardiol. 2014*, pp. 869–872, 2014.
- [5] K. H. W. J. ten Tusscher and a V Panfilov, "Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 291, no. 3, pp. H1088–H1100, 2006.
- [6] E. a. Heidenreich, J. M. Ferrero, M. Doblaré, and J. F. Rodríguez, "Adaptive macro finite elements for the numerical solution of monodomain equations in cardiac electrophysiology," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 38, no. 7, pp. 2331–2345, 2010.
- [7] P. Taggart, P. M. Sutton, T. Opthof, R. Coronel, R. Trimlett, W. Pugsley, and P. Kallis, "Inhomogeneous transmural conduction during early ischaemia in patients with coronary artery disease.," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 32, no. 4, pp. 621–30, Apr. 2000.
- [8] N. Klauke, G. L. Smith, and J. Cooper, "Extracellular recordings of field potentials from single cardiomyocytes," *Biophys. J.*, vol. 91, no. 7, pp. 2543–2551, 2006.
- [9] A. Muszkiewicz, A. Bueno-Orovio, X. Liu, B. Casadei, and B. Rodriguez, "Constructing Human Atrial Electrophysiological Models Mimicking a Patient-Specific Cell Group," *Comput. Cardiol. (2010)*, vol. 41, pp. 761–764, 2014.