

# COMPARAÇÃO DE MODELOS PARA ESTIMATIVA DA POLARIZAÇÃO DA MEMBRANA DE CARDIOMIÓCITOS POR CAMPOS ELÉTRICOS

H. F. M. Milan, R. A. Bassani e J. W. M. Bassani

Departamento de Engenharia Biomédica/FEEC e Centro de Engenharia Biomédica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil  
e-mail: hugomilan@ceb.unicamp.br

**Resumo:** A interação entre campos elétricos externos ( $E$ ) e miócitos cardíacos, como ocorre durante a estimulação elétrica do coração, pode resultar no disparo de um potencial de ação, o qual inicia o processo de contração celular. Modelos físicos são importantes ferramentas para se estimar a variação máxima do potencial elétrico transmembrana induzida por  $E$ , especialmente aquela que leva o potencial de membrana ao limiar de excitação ( $\Delta V_L$ ). Como a aproximação da geometria do cardiomiócito para formas regulares pode resultar em erros maiores que 100% na estimativa de  $\Delta V_L$ , desenvolvemos um modelo numérico tridimensional (MN3D) a partir da imagem da célula. Este modelo foi usado como referência para avaliar as estimativas de  $\Delta V_L$  obtidas com modelos analíticos que consideraram a geometria celular como um esferóide prolato (MAEsPr) e um elipsóide (MAElip). Em todos os casos,  $\Delta V_L$  foi estimado a partir de dados experimentais do valor limiar de  $E$ . Observamos que, embora  $E$  limiar tenha variado com o ângulo de aplicação de  $E$ , o valor de  $\Delta V_L$  estimado com MN3D e MAEsPr não dependeu do ângulo, enquanto que com MAElip, observou-se uma relação negativa entre  $\Delta V_L$  e ângulo. Os resultados indicaram que para ângulos próximos de  $0^\circ$ , ambos os modelos analíticos podem ser usados (erros  $\leq 7\%$ ), enquanto que para ângulos maiores, MAElip mostrou desempenho insatisfatório.

**Palavras-chave:** cardiomiócitos, método dos elementos finitos, modelos eletromagnéticos, potencial elétrico transmembrana.

**Abstract:** *The interaction between external electrical fields ( $E$ ) and cardiac myocytes, as in the case of electrical cardiac stimulation, may result in action potential triggering, which leads to cell contraction. Physical models are important tools to estimate the  $E$ -induced maximal variation of transmembrane electrical potential, especially when it causes the membrane potential to reach the excitation threshold ( $\Delta V_L$ ). As the approximation of the cardiomyocyte shape to regular geometries may result in error greater than 100% in the  $\Delta V_L$  estimate, we developed a three-dimensional numerical model (MN3D) based on the microscopic cell image. This model was used as a reference to evaluate the estimation of  $\Delta V_L$  obtained with analytical models in that the cell geometry is simplified to a prolate spheroid (MAEsPr) and ellipsoid (MAElip). In all cases, threshold  $E$  values determined experimentally were used*

*to estimate  $\Delta V_L$ . We observed that, even though threshold  $E$  values were affected by the angle between  $E$  and the cell major axis,  $\Delta V_L$  values estimated with MN3D and MAEsPr did not significantly depend on this angle, whereas with MAElip a negative relationship between  $\Delta V_L$  and angle was observed. The results indicate that, for angles close to  $0^\circ$ , both analytical models could be used (error  $\leq 7\%$ ), whereas for greater angles, the MAElip shows poor performance.*

**Keywords:** *cardiomyocytes, finite element method, electromagnetic models, trans-membrane electrical potential.*

## Introdução

A interação de campos elétricos externos ( $E$ ) com células pode resultar em diversos fenômenos fisiológicos. Em células excitáveis,  $E$  pode induzir uma variação do potencial elétrico transmembrana capaz de levar este potencial ao valor limiar para o disparo de um potencial de ação, o qual, em células musculares, inicia o processo de contração. Além de este fenômeno ser a base da estimulação marca-passo artificial do coração, a aplicação de  $E$  ao coração também é usada para reverter arritmias, como a fibrilação cardíaca.

Para estimar a máxima variação de potencial elétrico transmembrana induzida por  $E$  limiar ( $\Delta V_L$ ), i.e., a menor intensidade de  $E$  que induz o disparo de um potencial de ação ou subsequente contração, são frequentemente utilizados modelos físicos nos quais são adotadas simplificações da geometria da célula para formas regulares e/ou o uso de apenas 2 dimensões [1-7]. No entanto, como demonstrado em trabalhos anteriores [8-10], essas simplificações podem estimar  $\Delta V_L$  com erros maiores que 100%. Portanto, para avaliar como a simplificação da geometria de miócitos cardíacos pode afetar a estimativa de  $\Delta V_L$ , desenvolvemos um modelo numérico tridimensional que considera a geometria irregular da superfície celular, e comparamos os valores de referência de  $\Delta V_L$  estimados com este modelo com aqueles estimados com modelos analíticos simplificados que assumem a forma celular como um esferóide prolato e um elipsóide.

## Materiais e métodos

**Isolamento das células** – Miócitos do ventrículo esquerdo de ratos adultos (4-6 meses) foram isolados

conforme previamente descrito [11]. Os procedimentos para uso e cuidado dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da UNICAMP (prot. 2942-K).

**Protocolo experimental** – Os cardiomiócitos foram perfundidos (2-3 ml/min) com solução de Tyrode modificada (composição em mM: 140 NaCl, 6 KCl, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>, 11 glicose; pH 7,4) a 23 °C. Um par de eletrodos de platina foi disposto longitudinalmente ao fluxo da câmara de perfusão para estimulação elétrica, e o  $E$  na câmara foi estimado como aquele em um capacitor de placas paralelas [12]. Pulsos bipolares de tensão (duração total de 10 ms, 0,5 Hz) foram aplicados com um estimulador elétrico desenvolvido no Centro de Engenharia Biomédica/UNICAMP. O valor de  $E$  limiar ( $E_L$ ) foi medido 5 vezes em cada célula. As medições foram feitas em 6 grupos de células para diferentes faixas de valores do ângulo entre  $E$  e o eixo maior da célula (0° a 15°, 15° a 30°, 30° a 45°, 45° a 60°, 60° a 75° e 75° a 90°). A imagem das células, gravada com uma câmera de vídeo acoplada a um sistema de microscopia invertida [13], foi utilizada para determinação do comprimento dos eixos maior ( $c$ ) e menor ( $a$ ) das células, e para modelar a superfície celular.

**Modelos** – O *software* Autodesk Inventor foi utilizado para medir  $c$  e  $a$ , e para modelar a superfície celular em 3 dimensões. i.e., a superfície bidimensional celular registrada em vídeo, assumindo-se uma espessura de 14  $\mu\text{m}$  [14]. O modelo numérico tridimensional (MN3D) das células foi criado no programa Gmsh [15] e foi resolvido no programa ElmerFEM, o qual utiliza o método dos elementos finitos para resolver o problema do espalhamento eletromagnético. Os modelos analíticos utilizados para as geometrias de esferóide prolato (MAEsPr) e de elipsóide (MAElip) foram aqueles deduzidos por Gimsa e Wachner [16]. Os valores de  $\Delta V_L$  foram estimados pelos 3 modelos a partir dos valores experimentais de  $E_L$  para as diferentes direções de aplicação de  $E$ . A estimativa obtida com o MN3D foi tomada como o valor de referência.

**Análise estatística** – Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão. A influência do ângulo sobre  $E_L$  foi avaliada por análise de variância monofatorial. Utilizou-se análise de variância bifatorial para investigar a influência do modelo e do ângulo sobre  $\Delta V_L$ , e sobre a diferença percentual dos valores estimados de  $\Delta V_L$  com os modelos analíticos em relação ao MN3D (erro percentual). Utilizou-se o pós-teste de Bonferroni para comparação de médias, no caso de significância estatística na análise de variância. Consideramos  $p < 0,05$  como indicativo de significância estatística.

## Resultados

Os valores medidos de  $c$  e  $a$  foram  $132,1 \pm 2,7 \mu\text{m}$  e  $34,0 \pm 1,3 \mu\text{m}$ , respectivamente (N= 48 células).

A Figura 1 mostra que  $E_L$  foi maior para maiores ângulos entre a direção de  $E$  e o eixo maior da célula ( $p < 0,001$ ).

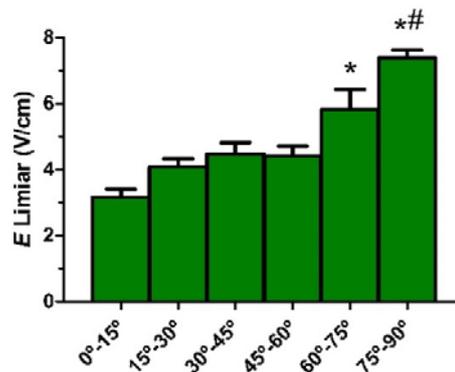


Figura 1: Valores de  $E$  limiar medidos em cardiomiócitos para diferentes ângulos de aplicação de  $E$ . N= 8 células para cada grupo. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  vs. 0°-30°; #  $p < 0,05$  vs. 30°-75°, teste de Bonferroni.

A Figura 2 mostra os valores de  $\Delta V_L$  estimados com os 3 modelos para os diferentes ângulos de aplicação de  $E$ . A análise de variância bifatorial indicou influência significativa do método ( $p < 0,001$ ), mas não do ângulo isoladamente ( $p = 0,29$ ). No entanto, foi observada interação entre ângulo e método ( $p < 0,001$ ), caracterizada por uma relação negativa entre o valor de  $\Delta V_L$  estimado com MAElip e o ângulo de  $E$ .

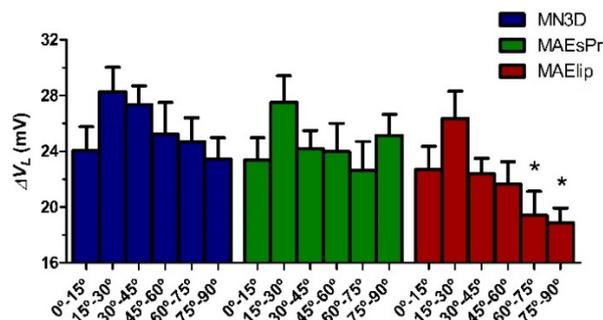


Figura 2: Valores de  $\Delta V_L$  estimados com os diferentes modelos para os diferentes ângulos de aplicação de  $E$ . MN3D: modelo numérico tridimensional; MAEsPr: modelo para geometria de esferóide prolato; MAElip: modelo para geometria elipsóide. N= 8 células para cada faixa de ângulos. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  vs. 15°-30°, teste de Bonferroni.

A Figura 3 mostra o erro percentual das estimativas de  $\Delta V_L$  obtidas com os modelos analíticos, com relação aos valores de referência (obtidos com o MN3D). A análise de variância bifatorial mostrou diferença significativa entre métodos ( $p < 0,001$ ), influência do ângulo ( $p < 0,001$ ), e interação entre estes fatores ( $p < 0,001$ ). Nossos resultados indicam que, para MAElip, o erro de estimativa de  $\Delta V_L$  aumentou com o ângulo,

chegando a ultrapassar 20%, enquanto que, para o MAEsPr, o erro atingiu um máximo de ~10%.

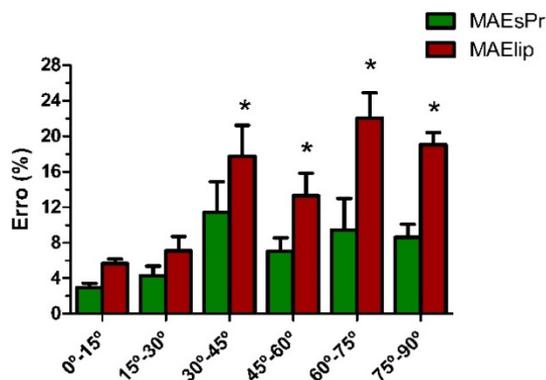


Figura 3: Erro percentual entre os valores de  $\Delta V_L$  estimados com os modelos analíticos e com o modelo numérico tridimensional. MAEsPr: modelo para geometria de esferóide prolato; MAElip: modelo para geometria elipsóide. N= 8 células para cada faixa de ângulos. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  vs. MAEsPr, teste de Bonferroni.

## Discussão

O objetivo do presente estudo foi contribuir para identificar o modelo analítico mais adequado para estimar a polarização da membrana celular por  $E$  externo no caso particular do miócito cardíaco, que, embora tenha forma aproximada de um paralelepípedo, na maior parte dos casos apresenta irregularidades geométricas, num padrão altamente variável de célula para célula. Para este fim, desenvolvemos o MN3D, que foi usado como método de referência para comparação das estimativas de  $\Delta V_L$  com os modelos analíticos. Deve-se ressaltar que, de acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro relato de um modelo físico desenvolvido para este fim que leva em consideração a irregularidade da geometria de miócitos cardíacos individuais.

No presente estudo, observamos que, como já descrito na literatura [1,12,17], houve forte influência do ângulo de aplicação de  $E$  sobre  $E_L$ , cujos valores, para estimulação na direção longitudinal com relação ao eixo maior da célula, foram cerca da metade daqueles obtidos durante estimulação transversal. No entanto, como já observado [1], os valores de  $\Delta V_L$  estimados com o MAEsPr não foram significativamente afetados pela direção de estimulação, como observado no caso do modelo de referência, MN3D. Por outro lado, os valores de  $\Delta V_L$  estimados com MAElip mostraram-se significativamente dependentes do ângulo, sendo menores para maiores ângulos de orientação de  $E$ , nos quais o erro atingiu ~20%. Como a importância da geometria de seção transversal celular sobre a estimativa de  $\Delta V_L$  é maior para maiores valores do ângulo, pode-se especular que a simplificação para uma seção transversal circular, assumida pelo MAEsPr, seja mais próxima da geometria real da célula do que a

seção transversal elíptica assumida pelo MAElip.

Embora seja mais preciso, o MN3D é um modelo mais complexo e seu uso consome considerável tempo de análise. Este modelo requer o registro da imagem celular, a construção do modelo tridimensional e numérico da superfície celular e a resolução do problema do espalhamento eletromagnético. MAEsPr e MAElip, por outro lado, consistem apenas num conjunto de equações: para cálculo de  $\Delta V_L$  são necessários apenas o comprimento dos eixos maior e menor da célula e a direção do  $E$ . Portanto, é importante que se conheça suas adequações e limitações, bem como qual geometria celular assumida fornece estimativas mais confiáveis.

## Conclusão

A partir dos presentes resultados, podemos concluir que: 1) para ângulos próximos de 0°, ambos os modelos analíticos (MAEsPr e MAElip) podem ser usados (erro  $\leq 7\%$ ); 2) para ângulos maiores, MAElip não apresenta desempenho satisfatório.

## Agradecimentos

À equipe da Área e de Pesquisa e Desenvolvimento do CEB/UNICAMP pelo suporte técnico, e à FAPESP (2013/05441-5) e ao CNPq (302996/2011-7) pelo apoio financeiro.

## Referências

- [1] Bassani RA, Lima KA, Gomes PAP, Oliveira PX, Bassani JWM. Combining stimulus direction and waveform for optimization of threshold stimulation of isolated ventricular myocytes. *Physiological Measurement*. 2006; 27:851-863.
- [2] Gomes PAP, Bassani RA, Bassani JWM. Electric field stimulation of cardiac myocytes during postnatal development. *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*. 2001; 48:630-636.
- [3] Tung L, Borderies JR. Analysis of electric field stimulation of single cardiac muscle cells. *Biophysical Journal*. 1992; 63:371-386.
- [4] Pham P, Cauffet G, Bardou A, Olivares J, Novakov E. Development of linear transient model for stimulation of isolated cardiac cells. *European Physical Journal – Applied Physics*. 2000; 12:217-222.
- [5] Ranjan R, Fishler MG, Thakor NV. Electrical “hot spot” as a mechanism of defibrillation. *Proceedings of Computers in Cardiology; London, United Kingdom*. 1993. p. 245-247.
- [6] Ranjan R, Fishler MG, Thakor NV. Influence of nonuniform cell shape on field stimulation thresholds. *Proceedings of the 15<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology; San Diego, USA*. 1993. p. 848-849.

- [7] Ranjan R, Thakor NV. Electrical stimulation of cardiac myocytes. *Annals of Biomedical Engineering*. 1995; 23:812-821.
- [8] Pucihar G, Kotnik T, Valic B, Miklavcic D. Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells. *Annals of Biomedical Engineering*. 2006; 34:642-652.
- [9] Miller CE, Henriquez CS. Three-dimensional finite element solution for biopotentials: erythrocyte in an applied field. *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*. 1988; 35:712-718.
- [10] Milan HFM, Oshiyama NF, Bassani RA, Bassani JWM. Estimativa da variação do potencial transmembrana em miócitos ventriculares estimulados com campo elétrico externo: comparação entre modelos eletromagnéticos. XXVIII Reunião Anual da FeSBE; Caxambu, Brasil. 2013. Resumo 02.016.
- [11] Penna LB, Bassani RA. Increased spontaneous activity and reduced inotropic response to catecholamines in ventricular myocytes from footshock-stressed rats. *Stress*. 2010; 13:73-82.
- [12] Oliveira PX, Bassani RA, Bassani JWM. Lethal effect of electric fields on isolated ventricular myocytes. *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*. 2008; 55:2635-2642.
- [13] Ricardo RA, Oliveira PX, Bassani RA, Bassani JWM. Compact cell image projector: application to study the relationship between stimulus interval and contraction amplitude in isolated rat cardiomyocytes. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*. 2006; 22:151-160.
- [14] Satoh H, Delbridge LMD, Blatter LA, Bers DM. Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and development effects. *Biophysical Journal*. 1996; 70:1494-1504.
- [15] Geuzaine C, Remacle J-F. A three-dimensional finite element mesh generator with built-in pre- and post-processing facilities. *International Journal for Numerical Methods in Engineering*. 2009; 79:1309-1331.
- [16] Gimsa J, Wachner D. Analytical description of the transmembrane voltage induced on arbitrarily oriented ellipsoidal and cylindrical cells. *Biophysical Journal*. 2001; 81:1888-1896.
- [17] Bardou AL, Chesnais JM, Birkui PJ, Govaere MC, Auger PM, Von Euw D, Degonde J. Directional variability of stimulation threshold measurements in isolated guinea pig cardiomyocytes: relationship with orthogonal sequential defibrillating pulses. *Pacing and Clinical Electrophysiology*. 1990; 13:1590-1595.