



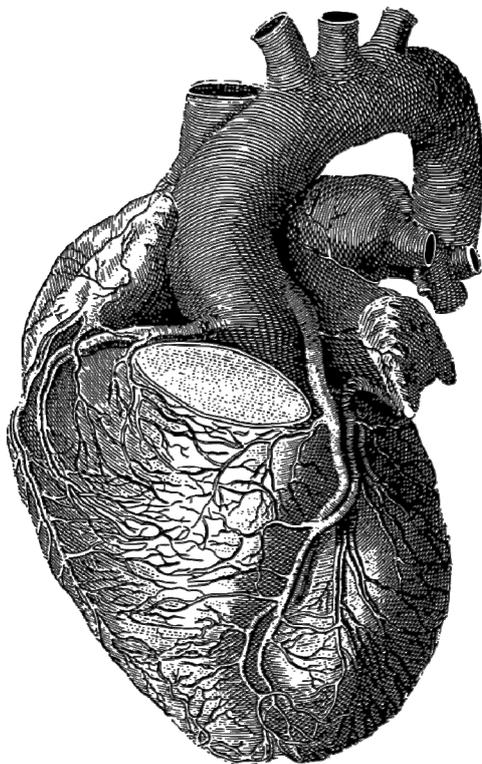
UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Programa de doctorat en Enginyeria Biomèdica

Doctorat en Enginyeria Biomèdica

Tesi Doctoral

Caracterització multiescala de dades
fisiològiques en la cardiologia translacional



Doctorand

Xavier Marimon i Serra

Director

Dr. Raúl Benítez Iglesias

Programa de doctorat en Enginyeria Biomèdica

Tesi doctoral

Caracterització multiescala de dades
fisiològiques en la cardiologia translacional

Xavier Marimon i Serra
Barcelona, novembre 2023

Director: Dr. Raúl Benítez Iglesias



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH**

Departament d'Enginyeria de Sistemes, Automàtica i Informàtica Industrial (ESAII).
Centre de Recerca d'Enginyeria Biomèdica (CREB).

“No hi havia dubte que llavors em vaig tornar molt pàlid; però jo enraonava amb més fluència i aixecant més la veu. El so augmentava sempre, què hi podia jo fer? Era un so baix, sord, freqüent, molt com el que un rellotge fa embolicat dins el cotó. Jo panteixava, però els inspectors no el sentien. Jo enraonava més de pressa, amb més vehemència; però el soroll creixia incessantment. Em vaig aixecar i discutia sobre foteses, en un diapasó molt alt i amb una gesticulació violenta; però el soroll creixia incessantment. Perquè no se'n volien anar? Vaig amidar el trespol d'ací i d'allà a grans gambades, com furiós per les observacions dels meus contradictors; però el soroll creixia incessantment. Oh Déu!, què hi podia jo fer? Jo escumejava, rabiava, renegava! Agitava la cadira en la qual havia estat seient, i la feia carrisquejar damunt del trespol, però el soroll ho dominava tot i creixia contínuament. Es feia més fort, més fort, més fort! I sempre els homes xerraven, feien broma i somreien. Era possible que no ho sentissin? Déu totpoderós! No, no! Ho sentien!, sospitaven!, sabien!, feien mofa del meu horror!, això vaig creure i això crec. Però qualsevol cosa valia més que aquella angúnia! Qualsevol cosa era més tolerable que aquella derisió! Jo ja no podia sofrir més aquells somriures hipòcrites! Vaig sentir que havia de cridar o morir! I ara—encara!—escolteu! més fort, més fort!, més fort! Miserables!, vaig vociferar, “no dissimuleu més! Confesso el fet! Arranqueu aquestes posts! Aquí, aquí! És el batec del seu cor repugnant!” ”

El cor delator (*The Tell-Tale Heart*, 1843).

Edgar Allan Poe (1809-1849).

Quan els recordo, em sento trist,
els que ens van deixar,
perquè el seu cor es va apagar.

El dolor que vaig sentir,
quan els vaig haver de dir adéu,
em va deixar un buit en el cor meu,
que res mai podrà omplir.

Però la seva memòria segueix viva,
i la seva absència m'ha guiat,
a seguir endavant amb alegria.

I ells, els que ja no hi són,
són el meu motor i la meva inspiració.

Perquè la seva pèrdua m'ha ensenyat,
que cada moment és valuós,
i mereix ser viscut i ben aprofitat.

Així, la seva memòria m'acompanya,
en cada pas que faig cap al futur.
I em recorda, amb un amor etern i esperança,
que no estic sol,
que el meu cor batega amb ells, amb força.

Xavier Marimon, juny de 2023.

I. Codis UNESCO

La següent tesi s'emmarca en els següents codis de la nomenclatura de la UNESCO per als camps de la ciència i la tecnologia (Skos):

1103 Lògica General

1104 Lògica Inductiva: 1104.03 Probabilidad.

1105 Metodología: 1105.01 Método Científico.

1201 Àlgebra: **1201.10** Àlgebra Lineal; **1201.11** Teoría de Matrices; 1201.13 Polinomios.

1202 Análisis y Análisis Funcional: **1202.09** Funciones de Una Variable Compleja; **1202.10** Funciones de Variables Reales; **1202.15** Ecuaciones Integrales; **1202.16** Transformadas Integrales; **1202.17** Medida, Integración, Area; **1202.18** Cálculo Operacional; **1202.19** Ecuaciones Diferenciales Ordinarias;

1203 Ciencia de Los Ordenadores: **1203.02** Lenguajes Algorítmicos; **1203.04** Inteligencia Artificial; **1203.08** Código y Sistemas de Codificación; **1203.12** Bancos de Datos; **1203.17** Informática; **1203.23** Lenguajes de Programación; **1203.24** Teoría de la Programación; **1203.26** Simulación;

1204 Geometría: **1204.12** Análisis Tensorial;

1206 Análisis Numérico: **1206.07** Interpolación, Aproximación y Ajuste de Curvas; **1206.08** Métodos Iterativos; **1206.09** Ecuaciones Lineales; **1206.10** Matrices; **1206.11** Diferenciación Numérica;

1207 Investigación Operativa: **1207.03** Cibernética;

1209 Estadística: **1209.01** Estadística Analítica; **1209.02** Cálculo en Estadística; **1209.03** Análisis de Datos; **1209.07** Teoría de la Distribución y Probabilidad; **1209.11** Teoría Estocástica y Análisis de Series Temporales; **1209.15** Series Temporales;

2203 Electrónica: **2203.01** Circuitos; **2203.02** Elementos de Circuitos; **2203.04** Microscopia Electrónica;

2205 Mecánica: **2205.02** Mecánica de Medios Continuos; **2205.07** Medidas de Propiedades Mecánicas;

2209 Óptica: **2209.06** Óptica Geométrica; **2209.10** láseres; **2209.11** Luz; **2209.12** Microscopios; **2209.16** Instrumentos Fotográficos; **2209.17** Fotografía; **2209.90** Tratamiento Digital Imágenes;

2214 Unidades y Constantes: **2214.01** Constantes Físicas;

2404 Biomatemáticas: **2404.01** Bioestadística;

2406 Biofísica: **2406.02** Bioelectricidad; **2406.04** Biomecánica; **2406.05** Bioóptica; **2406.06** Física Medica;

2407 Biología Celular: **2407.01** Cultivo Celular; **2407.03** Morfología Celular; **2407.90** Estructura de la Pared Celular;

2410 Biología Humana: **2410.10** Fisiología Humana;

2411 Fisiología Humana: **2411.03** Fisiología Cardiovascular;

3109 Ciencias Veterinarias: **3109.08** Farmacología; **3109.09** Fisiología;

3304 Tecnología de Los Ordenadores **3304.02** Convertidores Analógico-Digitales; **3304.14** Ordenadores Digitales;

3311 Tecnología de la Instrumentación: **3311.07** Instrumentos Electrónicos; **3311.08** Equipo de laboratorio; **3311.09** Lentes;

II. Abstract

ENG

This thesis aims to explore cardiac cell physiology across various scales, also known as translational cardiology. The research employs novel computational techniques from Biomedical engineering and utilizes medical signal and image databases to investigate the root causes of cardiac contractile system dysfunctions. The study proposes new biomarkers and measures that could aid in diagnosing, prognosticating, and treating cardiac diseases.

Besides chapter 1, devoted to the introduction and description of the structure of the thesis, it consists of three main chapters, each of which deals with different stages of cardiac physiology:

Chapter 2, focuses on the analysis of currents circulating in ion channels in human atrial cardiomyocytes (HAM), on an intracellular scale. The aim of this chapter is to develop a computational platform for transmembrane ionic currents. This platform allows us to process and extract the kinetic and morphological characteristics of each signal peak that have allowed us to automatically differentiate between healthy and pathological regimes. In conditions where the cardiac cell is stimulated with a time-varying voltage, beat-to-beat electrical alternation phenomena appear, which are indicative of arrhythmogenesis. Based on the characteristics extracted and validated with a synthetic model, a new biomarker has been designed, called the "alternation index", which allows a satisfactory quantification of the degree of alternation between electrical beats.

Chapter 3, focuses into the mechanical analysis of single mouse ventricular cardiomyocytes (MVM) at a cellular level, using optical and calcium imaging recordings. The chapter aims to develop a computational video platform using the Digital Image Correlation (DIC) algorithm. This platform calculates displacement fields, strain fields, and sarcolemma length variations during contraction in an isolated cardiomyocyte. By utilizing this technique, potential disruptions in the latently contracting cardiomyocyte during long-term recordings are eliminated, allowing simultaneous monitoring of cardiac contraction and intracellular calcium in a non-invasive and label-free way. The methodology is validated using synthetically created data, and the study applies real experimental data, correlating contractile properties with the calcium signal, Ca^{2+} .

Chapter 4 focuses on the analysis of OF1 mouse atrial mechanical contraction signals on a tissue scale. The aim of this chapter is to develop a computational platform that utilizes artificial intelligence (AI) to automatically detect any mechanical contraction irregularities that could cause heart contractile system diseases, such as atrial fibrillation (AF). The study compares traditional AI algorithms based on machine learning (ML) to more advanced ones based on deep learning (DL).

This chapter starts with the classification and then the detection of anomalies in mechanical shrinkage signals. First, contraction signals are automatically classified into those without anomalies and those with anomalies, creating a database of labelled contraction records and using supervised learning to determine which AI categorisation algorithms provide the highest accuracy. Secondly, artificial intelligence is used to train an anomaly detector, which determines the precise time at which the anomaly occurs. The various anomalous phenomena observed in the laboratory experiments are modelled in a synthetic database that is used to evaluate and train different anomaly detectors. Finally, the most accurate detector is validated with real experimental signals.

CAT

L'objectiu d'aquesta tesi és explorar la fisiologia de les cèl·lules cardíques a diverses escales, el que també es coneix com a cardiologia translacional. La investigació utilitza noves tècniques computacionals d'enginyeria biomèdica i utilitza bases de dades de senyals i imatges mèdiques per investigar les causes profundes de les disfuncions del sistema contràctil cardíac. L'estudi proposa nous biomarcadors i mesures que podrien ajudar a diagnosticar, pronosticar i tractar malalties cardíques.

A part del capítol 1, dedicat a la introducció i descripció de l'estructura de la tesi, aquesta consta de tres capítols principals, cadascun dels quals aborda diferents escales de la fisiologia cardíaca:

El capítol 2 es centra en l'anàlisi dels corrents que circulen en el canals iònics en cardiomiòcits humans auriculars (HAM), en una escala intracel·lular. L'objectiu d'aquest capítol es desenvolupar una plataforma computacional els corrents iònics transmembrana. Aquesta plataforma permet processar i extreure les característiques cinètiques i la morfològiques de cada pic del senyal que ens han permès diferenciar de manera automàtica entre règims sans i patològics. En condicions en les quals la cèl·lula cardíaca es estimulada amb un voltatge

variable en temps, apareixen fenòmens d'alternança elèctrica batec a batec (*beat-to-beat*) que són indicatius de arritmogènesis. Així partir de les característiques extretes i validades amb un model sintètic, s'ha dissenyat un nou biomarcador, que s'ha anomenat "índex d'alternança", que permet quantificar de manera satisfactòria el grau d'alternança entre batecs elèctrics.

El capítol 3 es centra en l'anàlisi mecànica de cardiomiòcits ventriculars de ratolí (MVM) a nivell cel·lular, utilitzant enregistraments d'imatges òptiques i de calci. L'objectiu del capítol és desenvolupar una plataforma de vídeo computacional utilitzant l'algorisme de Correlació Digital d'Imatges (DIC). Aquesta plataforma calcula els camps de desplaçament, els camps de deformació i les variacions de longitud del sarcolemma durant la contracció en un cardiomiòcit aïllat. La metodologia proposada, s'eliminen les possibles interrupcions en el cardiomiòcit en contracció latent durant els enregistraments a llarg termini, cosa que permet monitoritzar simultàniament la contracció cardíaca i el calci intracel·lular de forma no invasiva i sense etiquetes (*label-free*). La metodologia es valida utilitzant dades creades sintèticament, i finalment s'aplica a dades experimentals reals, correlacionant les propietats contràctils amb el senyal de calci, Ca^{2+} .

El capítol 4 es centra en l'anàlisi dels senyals de contracció mecànica auricular del ratolí OF1 en una escala teixit. L'objectiu d'aquest capítol és desenvolupar una plataforma computacional que utilitzi intel·ligència artificial (IA) per detectar automàticament qualsevol irregularitat a la contracció mecànica que pogués causar malalties del sistema contràctil cardíac, com la fibril·lació auricular (FA). L'estudi compara algorismes tradicionals d'IA basats en aprenentatge automàtic (ML) amb altres de més avançats basats en aprenentatge profund (DL).

En aquest capítol s'aborda primer la classificació i després la detecció d'anomalies en senyals mecàniques de contracció. En primer lloc, els senyals de contracció es classifiquen automàticament en senyals sense anomalies i senyals amb anomalies, creant una base de dades de registres de contracció etiquetats, i així, poder determinar quins algorismes d'intel·ligència artificial d'aprenentatge supervisat proporcionen més precisió. En segon lloc, la intel·ligència artificial es fa servir per entrenar un detector d'anomalies, que determina la posició temporal precisa en què es produeix l'anomalia. Els diversos fenòmens anòmals observats en els experiments de laboratori es modelen en una base de dades sintètica que s'utilitza per avaluar i entrenar diferents detectors d'anomalies. Finalment, el detector amb més precisió es valida amb senyals experimentals reals.

III. Agraïments

Aquest treball no hagués estat possible sense l'ajut d'un seguit de persones de remarcables qualitats humanes. Serveixin aquestes línies per expressar el meu agraïment a totes elles.

En primer lloc, al director d'aquesta tesi, el professor Raúl Benítez, pel seus consells, valuosa ajuda tècnica i incansable suport constant durant el desenvolupament d'aquesta tesi.

Al professor Leif Hove, per la seva orientació, i esperit crític que m'han ajudat a focalitzar els objectius de la tesi i l'obtenció de resultats. Bedankt voor je hulp.

Als companys de laboratori de la UPC: Carme, Àlex, Basak i Ferran, al companys de laboratori de Sant Pau: Verònica, Adela, Carmen, Hildegard, Anna i Sergi, i a la Sara del laboratori de la facultat de Veterinària de la UAB. Ha estat un plaer i un honor treballar amb tots vosaltres. Gràcies, de tot cor. Çok teşekkür ederim. Eskerrik asko bihotz-bihotzez.

Als companys de feina de la UIC del Departament Bioenginyeria, i en especial: Román, Luís, Miguel, Xavier, als companys de Laboratori: Raquels, Marina, Maria, Ferran, Irene i els companys de despatx Alejandro i Maria. Gràcies pels vostres suggeriments, consells i comentaris constructius. I sobretot per la vostra empatia.

A Román, per la flexibilitat laboral brindada i la voluntat d'ajudar-me mentre ha durat aquest procés.

A Alejandro por tu amistad brindada, y por todo lo que he aprendido trabajando a tu lado. El que tiene un amigo tiene un central.

A Miguel por sus sabios consejos senior y ayuda en la revisión de los capítulos preliminares y por echar vaina en los momentos de caída de ánimos.

Als companys de feina de la UIC de Departament Fisioteràpia: Andoni, Cari, Carlos, Bertram, Flora i Georgina. Gràcies per brindar-me la oportunitat de formar part d'aquest equip positivista i acollidor Zen, i sobretot pel vostre suport anímic insaciable. Flora, je vous remercie du fond du cœur pour votre soutien et vos encouragements.

A l'Andoni, zure kemena eta laguntza eskertu nahi dut tesi honen unerik zailenetan ez etsitzen laguntzeagaitik, eta, batez ere, zure motibazio-mezuak eskertu nahi ditut.

Als companys de feina de la UIC del Departament d'Odontologia: Josep, Oriol, Raúl, Bàrbara, Conrado i Jordi. Gràcies per compartir els vostres coneixements i la vostra professionalitat amb mi.

Al Ferran, per la seva ajuda proactiva en la finalització d'aquesta tesi i la seva contribució en la validació dels resultats.

A l'Albert de la UPC de Terrassa, company de viatge de la línia: l'innombrable, cap a la mateixa estació metafòrica. Gràcies per les teves trucades quan em feien més falta, i sobretot pels teus banys de realitat i d'experiència en els meus moments d'alta flipamenta. Un libro bueno y limpio, hermano, es la cosa más linda del mundo. Canviar libro per tesi.

Als companys del Màster, María i Mercè, gràcies pel vostre suport constant.

Als meus amics, de tota la vida, del col·legi i del barri i del CAT: Gerard, Pere, Maria, Carla, Judit i els amics més recents: Jaume, Álvaro, Marc (Tata) i Raquel, gràcies per la vostra indestructible amistat, grans moments compartits i per donar-me suport i caliu en tot moment. També us vull agrair els moments que m'heu animat i dibuixat un somriure quan no estava en la millor situació anímica.

A l'Aina, pel seu amor i adminicle constant en cada pas d'aquesta tesi. La meva companya de viatge de la vida, que m'ha ajudat a poder saltar les parets més altes i nedar a contracorrent en els rius amb les aigües més braves, quan no tenia barca ni voluntat ni capacitat per fer-ho.

A en Benet i la Montse, per la seva revisió ortogràfica exhaustiva dels capítols preliminars d'aquesta tesi.

A en Ramon, gràcies per l'ajuda en la revisió dels formalismes matemàtics.

A en Miquel, gràcies per la seva revisió tècnica d'aspectes de mecànica dels medis continus i comentaris constructius.

Moltes gràcies també, a totes aquelles persones que s'han aguantat les ganes, i en un acte de valentia espartana no menystenible, no m'han fet la fatídica pregunta de: com va la tesi?

Agraeixo també als meus pares, Frederic i Olga, i el meu germà, Frederic, pel suport incondicional a tots els objectius que m'he proposat a la meva vida, sempre m'han animat i donat escalf quan més ho he necessitat i sobretot per l'optimisme i confiança que sempre han dipositat en el resultat final d'aquesta tesi. Aquesta tesi és per a vosaltres, gaudiu-la. I molt en especial al meu pare, per totes les hores dedicades a revisar els capítols preliminars i veure que tot tingués sentit.

Per acabar, vull fer un agraïment especial a totes aquelles persones estimades, que ens ha deixat en el transcurs d'aquesta tesi: l'avi, la iaia Cisca, la iaia Leonor, en Joan i la Mimi. Us trobo a faltar i vull pensar que, des de on sigueu m'heu ajudat a tirar endavant aquesta tesi.

IV. Llista d'acrònims i abreviacions

AC	<i>Adenylyl Cyclase</i> Adenilil ciclasa
Ach	<i>Acetylcholine</i> Acetilcolina
ADC	<i>Analogue to Digital Converter</i> Convertidor Analògic Digital
AF	Atrial fibrillation Fibril·lació Auricular
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> Microscòpia de Força Atòmica
AI	<i>Artificial Intelligence</i>
IA	Intel·ligència Artificial
AIC	<i>Akaike Information Criterion</i> Criteri d'Informació Akaike
AMP	<i>Adenosine Monophosphate</i> Fosfat d'Adenosina
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> Fosfat d'Adenosina Cíclic
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> Trifosfat d'adenosina
Atr	<i>Atropine</i> Atropina
ASCII	<i>American Standard Code for Information Interchange</i> Codi Estàndard Americà per a Intercanvi d'Informació
AUC	<i>Area Under the Curve</i> Àrea Sota la Corba
BSA	Bovine Serum Albumin Lyophilised Albúmina de Sèrum Boví
CCH	<i>Carbachol</i> Carbacol
CC, xCorr	<i>Cross-correlation</i> Correlació Creuada
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i> Dispositiu de càrrega acoblada
CICR	<i>Calcium-Induced Calcium Release</i> Alliberament de Calci Induït per Calci
CM	<i>Cardiomyocyte Mechanics</i> Mecànica del Cardiomiòcit
CON	<i>Control</i> Control
DIC	<i>Digital Image Correlation</i> Correlació Digital d'Imatges

DWT	<i>Discrete Wavelet Transform</i> Transformada Wavelet Discreta
EA	<i>Electrical Alternants</i> Alternança Elèctrica
ECC	<i>Excitement – Contraction Coupling</i> Acoblament d'Excitació – Contracció
EC	<i>Excitement – Contraction</i> Excitació – Contracció
ECG,EKG	<i>Electrocardiogram</i> Electrocardiograma
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> Matriu Extracel·lular
FC	<i>Fully Connected (Layer)</i> Completament Connectat (Capa)
FFR	<i>Force-Frequency Relationship</i> Relació de Força-Freqüència
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i> Transformada Ràida de Fourier
Filtre HP	<i>High-Pass filter</i> Filtre Passa-Alt
Filtre LP	<i>Low-Pass filter</i> Filtre Passa-Baix
GD	<i>Gradient Descent</i> Descens de Gradient
GIRK	<i>G Protein-coupled Inwardly-Rectifying K (Potassium)</i> Canal de potassi d'entrada rectificador acoblat a la proteïna G
GPCR	<i>G Protein-coupled Receptors</i> Receptors Acoblats a la Proteïna G
GUI	<i>Graphical User Interface</i> Interfície d'Usuari Interactiva
GWN	<i>Gaussian White Noise</i> Soroll Blanc Gaussià
HAM	<i>Human Atrial Myocyte</i> Miòcits Auriculars Humans
hESCs	<i>Human Embryonic Stem Cells</i> Cèl·lules Mare Embrionàries Humanes
hiPSCs	<i>Human-induced Pluripotent Stem Cells</i> Cèl·lules Mare Pluripotents Induïdes Humanes
HyD	<i>Hybrid Detector</i> Detector Híbrid
IDE	<i>Sørensen–Daus Index</i> Índex de Sørensen–Daus
IOU	<i>Intersection Over Union</i> Intersecció Sobre la Unió
iDWT	<i>Inverse Discrete Wavelet Transform</i> Transformada Wavelet Discreta Inversa
KKN	<i>k-Nearest Neighbors</i>

	k-Veïns més pròxims
KL	<i>Kullback-Leibler</i> Kullback-Leibler
KLT	<i>Karhunen-Loève Transformation</i> Transformació de Karhunen-Loève
LA	<i>Left Atrium</i> Aurícula Esquerra
RA	<i>Right Atrium</i> Aurícula Dreta
LDA	<i>Linear discriminant analysis</i> Anàlisi Discriminant Lineal
LUT	<i>Look-up-table</i> Taula de consulta
LSTM	<i>Long Short-term Memory</i> Memòria a Llarg Termini Bidireccional
BiLSTM	<i>Bidirectional Long Short-term Memory</i> Memòria a Llarg Termini
MAD	<i>Median Absolute Deviation</i> Desviació Absoluta Mitjana
MAE	<i>Median Absolute Error</i> Error Absolut Mitjà
ML	<i>Machine Learning</i> Aprentatge Màquina
MLE	<i>Maximum Likelihood Estimation</i> Estimació de Màxima Versemblança
MODWT	<i>Transformada Wavelet Discreta de Superposició Màxima</i> Maximal Overlap Discrete Wavelet Transform
MRA	<i>Multiresolution Analysis</i> Anàlisi de Multiresolució
MSE	Error Quadràtic Mitjà Mean-Squared-Error
msespase	<i>Mean Squared Error Sparse</i> Error Quadràtic Mitjà Dispersa
MVM	<i>Mouse Ventricle Myocytes</i> Miòcits Ventriculars de Ratolí
NCC, xCorNorm	<i>Normalized Cross Correlation</i> Correlació Creuada Normalitzada
NCX	<i>Sodium Calcium Exchanger</i> Intercanviador de Sodi-potassi
NSSDC	<i>Normalized sum of squared differences correlation</i> Correlació de la suma normalitzada de diferències al quadrat
OS	<i>Operating System</i>
SO	Sistema operatiu
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> Anàlisi de Components Principals
PCs	<i>Principal Components</i> Components Principals

PDMS	<i>Polydimethylsiloxane</i> Polidimetilsiloxà
PKA	<i>Protein Kinase A</i> Proteïna Kinasa A
PMT	<i>Photomultiplier Tube</i> Tub Fotomultiplicador
PSD	<i>Power Spectrum Density</i> Densitat de l'Espectre de Potència
QDA	<i>Quadratic Discriminant Analysis</i> Anàlisi Discriminant Quadràtic
RELU	<i>Rectified Linear Unit</i> Unitat Lineal Rectificada
RL	<i>Regression Layer</i> Capa de Regressió
RNN	<i>Recurrent Neural Network</i> Xarxa Neuronal Recurrent
ROI	<i>Region-Of-Interest</i> Regió d'Interès
RyRs	<i>Ryanodine Receptors</i> Receptors de Rianodina
RyR2	<i>Ryanodine Receptor 2</i> Receptor de Rianodina de tipus 2
SE	<i>Squared Error</i> Error Quadràtic
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> Error Estàndard Mitjà
SEM*	<i>Society for Experimental Mechanics</i> Societat de mecànica experimental
SER	<i>Striated Sarcoplasmic Reticulum</i> Reticle Sarcoplasmàtic Estriat
SG	<i>Stochastic Gradient</i> Gradient Estocàstic
SGD	<i>Stochastic Gradient Descent</i> Descens del Gradient Estocàstic
SGDM	<i>Stochastic Gradient Descent with Momentum</i> Descens del Gradient Estocàstic amb Moment
SERCA (pump)	<i>Sarco Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase pump</i> Bomba d'ATPasa de calci del Reticle Sarco-endoplasmàtic
SNR	<i>Signal-to-noise ratio</i> Relació senyal/soroll
SR	<i>Sarcoplasmic Reticulum</i> Reticle Sarcoplasmàtic
SSDC	<i>Sum of squared differences correlation</i> Correlació de la suma de diferències al quadrat
SSE	<i>Sum of Squared Estimate of Errors</i> Suma de l'Estimació Quadràtica d'Errors
SVM	<i>Support Vector Machines</i>

	Màquines de Vectors de Suport
TFM	<i>Traction Force Microscopy</i>
	Microscòpia de força de tracció
TIA	Transimpedance Amplifier
	Amplificador de Transimpedància
TP	<i>True Positives</i>
	Verdader Positiu
TN	<i>True Negatives</i>
	Verdader Negatiu
FN	<i>False Negatives</i>
	Fals Negatiu
FP	<i>False Positives</i>
	Fals positiu
WMA	<i>World Medical Association</i>
	Associació Mèdica Mundial
ZNCC	<i>Zero-normalized Cross-correlation</i>
	Correlació Creuada Zero-normalitzada
ZNSSD	<i>Zero-normalized Sum of Squared Differences Correlation</i>
	Correlació de la Suma zero-Normalitzada de Diferències al Quadrat
FEM	<i>Finite Element Method</i>
MEF	Mètode dels Elements Finites

IV. Llista de variables

R_m	Resistència sèrie de la membrana
R_p	Resistència de la pipeta
R_a	Resistència d'accés
R_{seal}	Resistència de segellat
R_s	Resistència sèrie
R_f	Resistència de realimentació (<i>feedback</i>)
C_m	Capacitat de la membrana
C_p	Capacitat de la pipeta
C_f	Capacitat de realimentació o shunt
v_m	Voltatge de la membrana
v_C	Voltatge de control
v_{rest}	Potencial de repòs de la membrana
v_o	Voltatge de sortida de l'amplificador
i_o	Corrent d'estimulació
τ_m	Constant de temps de la membrana
τ_p	Constant de temps de la pipeta
N	Nombre d'experiments/variables
N_{DWT}	Nombre de nivells de la DWT
n	Ordre del filtre
k	Factor de suavitzat
k_{cant}	Constant de molla en una estructura de voladís
$k_{\mu pill}$	constant de molla en un micropilar
k_{trap}	Rigidesa de la trampa òptica
Δx	Increment de desplaçament
Δt	Increment de temps
L	longitud de la finestra
F_s	Freqüència de mostreig
var_{noise}	Variància del soroll
y	Senyal real o experimental
\tilde{y}	Senyal simulat o estimat
I_d	Corrent transitori màxim
I_{ss}	Corrent en l'estat estacionari
$s(t), x(t)$	Senyal de temps continu
$s(n), x(n)$	Senyal de temps discret
A	Coefficients d'aproximació de la DWT
D	Coefficients de detall de la DWT
$e(n)$	Soroll blanc gaussià $\sim N(0,1)$

σ , std	Desviació estàndard
var	Variància
p	p -valor
μ , mean	Valor mitja
λ_{DWT}	Llindar global de la DWT
$\lambda_{stretch}$	Relació d'estirament
λ_p	Longitud d'ona d'un fotó
$\delta_H(x, \lambda)$	Funció de llindar dur (<i>Hard</i>)
$\delta_S(x, \lambda)$	Funció de llindar suau (<i>Soft</i>)
V_{target}	Valor objectiu en el mètode LUT
i_{filt}	Corrent filtrat
$W(n, L)$	Finestra rectangular de longitud L
sign(x)	Funció signe
R^2	Valor de R -quadrat
$MAD(x)$	<i>Median Absolute Deviation</i>
	Desviació absoluta mitjana
Φ^{-1}	Inversa de la funció de distribució acumulada
x_{peak}	Màxim local del senyal x sense interpolar
\tilde{x}_{peak}	Màxim local del senyal x interpolat
Q	Àrea calculada per càlcul integral
QCa	Àrea sota la corba del corrent de calci tipus-L
QTail	Àrea sota la corba del corrent de cua
a, b	Intervals d'integració superior i inferior
bas(y)	Línia de base a l'altura y de l'eix d'ordenades
ε (error)	Error relatiu
$P(x, y)$	Pic del senyal a la posició x, y
$P_L(x, y)$	Canvi de pendent més pròxima a l'esquerra del pic
$P_R(x, y)$	Canvi de pendent més pròxima a la dreta del pic
W_L	Finestres temporal situades a l'esquerra del pic
W_R	Finestres temporal situades a la dreta del pic
$J(k)$	Índex residual en funció del punt de divisió k
m	Pendent del senyal
QCa	Àrea sota la corba del corrent de calci tipus-L
CIdx	Índex d'alternança
ttp	<i>Time to peak</i>
	Temps transcorregut fins al pic del senyal
Tau	<i>Fall time constant</i>
	Constant de temps de baixada de l'esdeveniment de contracció
SR	<i>Slew rate</i> o <i>Slope rate</i>
	Pendent de pujada de l'esdeveniment de contracció
Trise	<i>Rise period</i>
	Temps transcorregut fins al pic màxim de l'esdeveniment de contracció

FWDM	<i>Full Width at Distance-Maximum</i> Amplada del esdeveniment de contracció a diferents nivells del pic màxim de contracció: 10%, 25%, 50%, 90%
ISI	<i>Inter-spike Interval</i> Interval temporal mitjà transcorregut entre spikes
p	Moment lineal d'un fotó
Δp	Moment net o impuls d'un fotó
F_{grad}	Força de gradient
F_{scat}	Força de dispersió
F_{ext}	Força resultant a la microesfera
$F_{\mu\text{sph}}$	Força exercida per la microesfera
F_{trap}	Força d'atrapament de la trampa òptica
F_{drag}	Força d'arrossegament viscos de la microesfera
$m_{\mu\text{sph}}$	Massa de la microesfera.
$a_{\mu\text{sph}}$	Acceleració de la microesfera.
v_{flow}	Velocitat del flux en un sistema de microfluídica
η	Coefficient d'amortiment viscos
$R_{\mu\text{sph}}$	Radi de la microesfera
h	Constant de Planck
u	Desplaçament horitzontal sobre l'eix x
v	Desplaçament vertical sobre l'eix y
E	Mòdul de Young
$E(\vec{x}, t)$	Tensor de deformació de Green-Lagrange
E_{xx}	Deformació longitudinal amb el model de grans deformacions
E_{yy}	Deformació transversal amb el model de grans deformacions
E_{xy}	Deformació angular amb el model de grans deformacions
ε_{xx}	Deformació longitudinal amb el model de petites deformacions
ε_{yy}	Deformació transversal amb el model de petites deformacions
ε_{xy}	Deformació angular amb el model de petites deformacions
E_1	Deformació principal
E_2	Deformació secundària
E^{x-y}_{equiv}	Deformació equivalent
$u(x, y)$	Funció d'interpolació del desplaçament longitudinal u
$v(x, y)$	Funció d'interpolació del desplaçament vertical v
BPM	<i>Beats per minute</i> Batecs o esdeveniments de contracció per minut
STD	Desviació estàndard de l'ISI
Thr	Llindar
T_{stim}	Freqüència d'estimulació
F_s	Freqüència de mostreig
T_s	Període de mostreig
z -score	Estandarització z

x_t	Entrada actual de la xarxa recurrent (RNN)
h_t	Nou estat de la capa oculta en la xarxa recurrent (RNN)
h_{t-1}	Estat anterior de la capa oculta la xarxa recurrent (RNN)
$J(W)$	<i>Loss function</i> Funció de pèrdua
$\nabla J(W)$	Gradient de la funció de pèrdua
α	<i>Learning rate</i> Taxa d'aprenentatge
W_l	Vector de pesos en l'estat actual
W_{l+1}	Vector de pesos en el següent estat
W_{l-1}	Vector de pesos en l'estat anterior
$\text{sigm}(x_i)$	Funció d'activació sigmoide
$\text{tanh}(x_i)$	Funció d'activació de la tangent hiperbòlica
D_{KL}	Divergència de Kullback-Leibler
dM	Distància de Mahalanobis
d	Distància Euclidea
ζ	Evolvent del senyal
Q3	Tercer quartil superior
IQR	Rang interquartil
SDI	Índex de Sørensen–Dice
ROI _D	Regió anòmala detectada pel detector d'anomalies
ROI _{GT}	<i>Ground truth</i> Regió anòmala verdadera
CF	<i>Crest Factor</i> Factor de cresta
CLF	<i>Clearance Factor</i> Factor d'eliminació
IF	<i>Impulse Factor</i> Factor d'impuls
Kurt	<i>Kurtosis</i> Curtosi
σ	Desviació estàndard
μ_4	Quart moment central
THD	<i>Total Harmonic Distorsion</i> Distorsió harmònica total
w_K	Finestra de Kaiser
β	Factor de forma
SF	<i>Shape Factor</i> Factor de forma
μ	Mitjana
σ	Desviació estàndard
μ_3	Tercer moment central
κ_2	Segon acumulant

SNR	<i>Signal-to-Noise Ratio</i> Relació senyal-soroll
P_{signal}	Potència del senyal o de la freqüència fonamental
P_{noise}	Potència del senyal corresponent al soroll
A_{signal}	Amplitud del senyal o de la freqüència fonamental
A_{noise}	Amplitud del senyal corresponent al soroll
β	Factor de forma
std	<i>Standard Deviation</i> Desviació estàndard
SINAD	<i>Signal-to-Noise and Distortion Ratio</i> Relació senyal-soroll i distorsió
RMS	<i>Root Mean Square</i> Arrel Quadràtica Mitjana
$r_{xx}(\tau)$	Funció d'autocorrelació
$S_{xx}(f)$	Densitat espectral de potència
<i>Noverlap</i>	Solapament de la finestra en tant per cent (%)
ω_{peak}	<i>Peak frequency</i> Freqüència del pic
BP	<i>Band power</i> Banda de potència
ω_1	Freqüències angulars
ω_2	Banda de potència
$\delta(0)$	Separació inicial
$\delta(t)$	Separació a l'instant t
λ	Exponent de Lyapunov
λ_{max}	Valor dels exponents de Lyapunov
λ_{DWT}	Valor de llindar de la DWT
$\Phi_m(r)$	Semblança
<i>ApEn</i>	Entropia aproximada
D_2	Dimensió de correlació
ε	<i>Radius of similarity</i> Radi de semblança
Σ	Matriu de covariància
λ	<i>Eigenvalues</i> Valors propis
I	Matriu identitat
ν	<i>Eigenvectors</i> Vectors propis
X_p	Dades projectades
X_c	Dades centrades i estandaritzades
ν_{sort}	Vectors propis ordenats ascendentment
varExp	Variància explicada
cumVarExp	Percentatge acumulat de variància explicada
h_t	Nou estat de la capa oculta

h_{t-1}	Estat anterior de la capa oculta
x_t	Entrada actual
b	<i>Bias</i> Biaix
W	Matriu de pesos entre estats ocults
U	Matriu de pesos d'entrada a l'estat ocult
i_t	<i>Input gate</i> Portada d'entrada
c_t	<i>Cell state</i> Cel · la d'estat
\tilde{c}_t	<i>Cell state candidate</i> Candidat de cel · la d'estat
f_t	<i>Forget gate</i> Porta d'oblit
o_t	<i>Output gate</i> Porta de sortida
h_t	<i>Hidden State</i> Estat ocult
m_t	Moment de primer ordre en l'estat actual
v_t	Moment de segon ordre en l'estat actual
W_l	Vector de pesos en l'estat actual
W_{l+1}	Vector de pesos en el següent estat
W_{l-1}	Vector de pesos en l'estat anterior
∇J	Gradient de la funció de pèrdues
β_1	Taxa de decaïment exponencial del primer moment
β_2	Taxa de decaïment exponencial del segon moment
$J_{L_2}(W)$	funció de pèrdues amb regularització L_2
L_2	Factor per a la regularització L_2
α_0	Taxa d'aprenentatge
W_e	Vector de pesos del codificador
W_d	Vector de pesos del descodificador
b_e	Biaix (<i>bias</i>) del codificador
b_d	Biaix (<i>bias</i>) del descodificador
Ω_{L_2}	Terme de regularització
Ω_{KL}	Terme de regularització de la dispersió
λ_{dec}	<i>Weight decay parameter</i> Pes del paràmetre de decaïment
s_l	Nombre d'unitats a la capa l
W_{ji}	Pes entre la unitat j a la capa l i la unitat i a la capa $l+1$
a_i^l	Activitat de la neurona j a la capa l per l'entrada x
a_j^2	Activitat de la capa oculta (<i>hidden unit</i>)
$\hat{\rho}_j$	Activitat mitjana de la neurona oculta j
ρ	<i>Sparisty Parameter</i>

	Paràmetre de dispersió
Ω_{KL}	Terme de regularització de dispersió
β	Paràmetre de regularització de la dispersió
$\hat{\rho}$	Vector de l'activitat mitjana a la capa oculta, h
ρ	<i>Sparsity proportion</i>
	Paràmetre de proporció de la dispersió.

Llista de continguts

I. Codis UNESCO	5
II. Abstract	6
III. Agraïments	9
IV. Llista d'acrònims i abreviacions	12
V. Llista de variables	17
Capítol 1. Introducció	
1.1 Motivació	29
1.2 Objectius generals	30
1.3 Objectius i resum per capítol	30
1.4 Origen de les dades	33
Capítol 2. Escala intracel·lular	
2.1 Introducció	35
2.2 L'alternança elèctrica	37
2.3 Descripció de la tècnica de pinçament de membrana	39
2.4 Obtenció de les mostres de teixit cardíac auricular	41
2.4.1 Mètode d'aïllament dels cardiomiòcits	41
2.4.2 Digestió enzimàtica	42
2.4.3 Criteris de selecció pels cardiomiòcits	43
2.5 Registres d'electrofisiologia	44
2.5.1 Configuració del pinçament de membrana	44
2.6 Protocols d'estimulació	48
2.6.1 Protocol d'estimulació amb voltatge fix	48
2.6.1.1 Descripció de la resposta	49
2.6.2 Protocol d'estimulació amb voltatge variable	51
2.6.2.1 Descripció de la resposta	53
2.7 Modelització del registre de pinçament de membrana	56
2.7.1 Descripció del model elèctric	56
2.7.2 Validació del model elèctric	64
2.7.2.1 Validació del model elèctric versus el experimental	65
2.7.2.2 Validació de l'estimació de paràmetres elèctrics	65

2.8 Mètode computacional per l'anàlisi de les corrents iòniques	71
2.8.1 Processat dels corrents iònics	71
2.8.1.1 Processat per a un voltatge d'estimulació fix	71
2.8.1.2 Processat per a un voltatge d'estimulació variable	77
2.8.2 Extracció automàtica de característiques	80
2.8.2.1 Mesures per a un voltatge d'estimulació fix	80
2.8.2.2 Mesures per a un voltatge d'estimulació variable	86
2.8.3 Validació del mètode d'extracció de característiques	92
2.9 Resultats i discussió	93
2.9.1 Estimulació amb voltatge fix	93
2.9.2 Estimulació amb voltatge variable	95
2.9.2.1 Mesures d'amplitud	95
2.9.2.2 Mesures de transport de calci	97
2.9.2.3 Mesures de la constant de temps	97
2.9.2.4 Mesures de l'índex d'alternança	98
Referències	101
Capítol 3. Escala cel · lular	
3.1 Introducció	108
3.1.1 Importància de l'activitat contràctil	108
3.1.2 Acoblament d'excitació-contracció	110
3.2 Estat de l'art en mesures de contracció de cardiomiòcits	112
3.2.1 Microscòpia de força de tracció (TFM)	112
3.2.2 Microscòpia de força atòmica (AFM)	113
3.2.3 Microfabricació	116
3.2.4 Pinces òptiques	118
3.2.5 Mètodes basats en vídeo	123
3.3 Adquisició de les mostres	127
3.4 Models pel moviment i deformació del cardiomiòcit	129
3.5 Mètode computacional per l'anàlisi de contracció i calci	137
3.5.1 Carregar les dades i els paràmetres del microscopi	138
3.5.2 Càlcul dels desplaçaments per correlació digital d'imatge	138
3.5.3 Càlcul de deformacions amb el tensor de Green-Lagrange	145

3.6 Resultats i discussió	150
3.6.1 Validació del mètode de software	150
3.6.1.1 Translació rígida	151
3.6.1.2 Rotació rígida	153
3.6.1.3 Deformació imposada	155
3.6.2 Aplicació a dades experimentals	157
3.6.2.1 Desplaçaments u i v	158
3.6.2.2 Deformacions E_{xx} , E_{yy} i E_{xy}	160
3.6.2.3 Avaluació de la longitud del sarcolemma	165
3.6.2.4 Correlació de la deformació amb el senyal de calci	167
Referències	171
Capítol 4. Escala teixit	
4.1 Introducció	183
4.2 Obtenció de les mostres de teixit cardíac auricular	185
4.2.1 Mètode de preparació del ratolí	185
4.2.2 Mètode d'aïllament de les aurícules	185
4.2.3 Mètode d'electrofisiologia	186
4.2.4 Protocol d'estimulació	187
4.2.4.1 Protocol d'estimulació elèctrica	187
4.2.4.2 Protocol d'estimulació farmacològica	188
4.3 Mètode computacional per l'anàlisi de la contracció mecànica	189
4.3.1 Descripció del sistema computacional	189
4.3.1.1 Validació del mètode de detecció de característiques	193
4.3.1.2 Aplicació del mètode computacional de caracterització	198
4.3.1.2.1 <i>Efecte farmacològic</i>	198
4.3.1.2.1 <i>Efecte patològic</i>	204
4.4 Mètode computacional per a la classificació i detecció d'anomalies en dades de contracció mecànica.	209
4.4.1 Creació de la base de dades	209
4.4.2 Classificació d'anomalies	213
4.4.2.1 Classificador basat en aprenentatge màquina	213
4.4.2.1.1 <i>Extracció de característiques</i>	215
4.4.2.2 Classificador basat en aprenentatge profund	230
4.4.2.2.1 <i>Arquitectura del classificador</i>	235

4.4.3	Detector d'anomalies	247
4.5	Resultats i discussió	261
4.5.1	Validació	261
4.5.1.1	Validació del classificador	261
4.5.1.2	Validació del detector	269
4.5.2	Aplicació a dades real	272
4.5.2.1	Aplicació del classificador	272
4.5.2.2	Aplicació del detector	272
	Referències	277
	Conclusions	285
	Futures línies de recerca	291
	Llistat de publicacions	293

Capítol 1.
Introducció.

Capítol 1. Introducció

1.1 Motivació

La tesi que teniu a les mans, té com a objectiu l'estudi de la cèl·lula cardíaca a diferents escales o, altrament dit, cardiologia translacional. Aquest treball posa el focus en l'aportació de noves tècniques per analitzar les dades en cada escala per tal de comprendre millor les causes de les disfuncions del sistema contràctil cardíac.

Les malalties coronàries són provocades per disfuncions del sistema contràctil, que s'inicien a una escala de nivell cel·lular i progressen fins a la disfunció del cor a nivell d'òrgan complet. Segons les dades publicades per l'Organització Mundial de la Salut el 2019, la isquèmia cardíaca va ser la primera causa de mortalitat a nivell mundial. A Catalunya, d'acord amb les dades de l'Observatori de la Mort del Departament de Salut, l'any 2018 les malalties de l'aparell circulatori van esdevenir la primera causa de mort en el cas de les dones i la segona en els homes. En tots els casos, la detecció precoç de la malaltia, així com l'adopció d'hàbits saludables per part dels pacients, és fonamental per tal de poder tractar, amb majors taxes d'èxit, les malalties derivades d'aquestes disfuncions. Però les tècniques clàssiques, com l'electrocardiograma, no detecten certes patologies en estadis primerencs de la malaltia, fet que impedeix fer-ne una detecció precoç. Per això, cal estudiar i comprendre a escales més petites, els mecanismes interns que originen malalties a escala d'òrgan complet. En aquest sentit, l'estudi se centra en anomalies de contracció que s'esdevenen en la generació d'arrítmies (arritmogènesis). Precisament, l'arrítmia és una de les patologies cardíques més comunes en humans, en concret, la fibril·lació auricular (*atrial fibrillation*, AF) és el tipus d'arrítmia més habitual i afecta entre l'1 i el 2% de la població.

En la investigació de la cardiologia moderna a l'hora de decidir sobre hipòtesis d'estudi, medicaments, dispositius, tractaments quirúrgics específics o mesures preventives és necessari l'anàlisi i interpretació detallada d'imatges de l'estructura i funció del cor. Però, per altra banda, els laboratoris de biologia i fisiologia cel·lular generen grans quantitats de dades, que s'han de classificar i analitzar per extreure'n informació rellevant pel diagnòstic clínic. Les eines computacionals de l'enginyeria biomèdica poden ajudar a facilitar la interpretació més intuïtiva d'aquest gran volum de dades. Per comprendre millor les patologies cardiovasculars i els efectes que tenen en diversos grups

poblacionals, és essencial poder seleccionar el millor tractament personalitzat. La integració i l'anàlisi de les dades de fisiologia cardíaca, que es presenta en aquesta tesi, ajudarà a obrir camí cap a la medicina personalitzada i la medicina de precisió, amb un enfoc diagnòstic i terapèutic més efectiu i específic per a cada individu.

1.2 Objectius generals

L'objectiu principal d'aquesta tesi és aportar mètodes computacionals per comprendre i analitzar dades de diferents escales cardíques de manera ràpida, eficaç i amb poca o nul·la intervenció humana per part dels experimentadors o clínics. Alhora que es proposen noves mesures o biomarcadors que tinguin utilitat pel diagnòstic, el pronòstic i el tractament de les malalties del sistema contràctil cardíac.

La integració de l'enginyeria amb els coneixements fisiològics i clínics requereix un enfocament multidisciplinari que incorpori l'enginyeria biomèdica, la física, les matemàtiques, la investigació bàsica i la pràctica clínica. La literatura actual ha utilitzat diferents tècniques d'enginyeria: processat de senyals, processat d'imatges i intel·ligència artificial en aplicacions de cèl·lules excitables neuronals i musculars, però avui en dia hi ha poques referències sobre l'aplicació d'aquestes mètodes en senyals provinents de cèl·lules cardíques. La tesi aprofundeix en l'ús d'aquestes tècniques en l'àmbit de la cardiologia translacional utilitzant bases de dades experimentals de senyals i imatges mèdiques. Es tracta, doncs, d'una tesi interdisciplinària que precisa de l'aportació de les tècniques computacionals més clàssiques i també disruptives de la l'Enginyeria Biomèdica en l'àmbit de la cardiologia translacional.

1.3 Objectius i resum per capítol

Degut al tractament de diverses escales d'estudi, s'ha optat per l'opció que cada capítol contingui el seu propi estat de l'art i la introducció de la problemàtica a resoldre. La tesi consta doncs, de tres capítols principals on s'aborden diferents escales de estudi de la fisiologia cardíaca: Escala intracel·lular ([Capítol 2](#)), Escala cel·lular ([Capítol 3](#)), Escala teixit ([Capítol 4](#)). A continuació es resumeixen els objectius de cada capítol:

Objectius del capítol 2: Escala intracel · lular

Aquest capítol es centra en l'anàlisi dels corrents que circulen en els canals iònics en cardiomiòcits humans auriculars (HAM), en una escala intracel · lular. L'objectiu d'aquest capítol es desenvolupar una plataforma computacional per analitzar mitjançant algorismes avançats de processat de senyal, els corrents iònics que circulen a través de la membrana d'un cardiomiòcit aïllat en un experiment d'electrofisiologia cardíaca. El corrent iònic ha estat registrat en un experiment de pinçament de membrana (*patch-clamp*) en configuració de cèl · lula completa (*whole-cell*) sota un protocol d'estimulació (fix o variable). La plataforma computacional permet processar i caracteritzar de manera totalment automàtica la resposta cinètica i la morfologia de cada pic del senyal. Les característiques extrems per a cada pic són: amplitud del pic, constants de temps, àrea sota la corba del corrent iònic. Per tal de validar l'extracció de característiques s'ha dissenyat un model d'ordre zero (model elèctric) que descriu de manera realista la biofísica del cardiomiòcit així com la part del amplificador d'electrofisiologia.

En registres sotmesos a un protocol d'estimulació amb un voltatge variable, les cèl · lules patològiques presenten un comportament d'alternança elèctrica batec a batec (*beat-to-beat*) que és d'interès poder-lo identificar de manera precoç ja que és el desencadenat d'arrítmies cardíques. Per tant, s'estudia la viabilitat de les característiques extrems i si són estadísticament rellevants per poder discernir entre una cèl · lula amb comportament normal o alternant. Finalment, a partir d'aquestes característiques calculades, es presenta un nou biomarcador, anomenat "índex d'alternança", per quantificar el grau d'alternança entre batecs elèctrics consecutius.

Objectius del capítol 3: Escala cel · lular

Aquest capítol es centra en l'anàlisi mecànic dels cardiomiòcits ventriculars de ratolí (MVM), en una escala cel · lular a partir de registres d'imatges òptiques i de calci en el cardiomiòcit aïllat. Simultàniament amb les imatges òptiques també es registren imatges de calci (*calcium imaging*) en què s'utilitzen colorants fluorescents sensibles al calci (*fluorescent calcium dyes*). A partir de tècniques de processat d'imatges s'obté senyal de calci, Ca^{2+} .

L'objectiu d'aquest capítol es desenvolupar una plataforma computacional de vídeo basada en el en l'algorisme de Correlació Digital d'Imatges (*Digital Image Correlation*, DIC) per estimar diferents propietats contràctils en un cardiomiòcit aïllat en contracció, com ara: el camp de desplaçaments, el camp de tensions (*strains*) i la longitud del sarcolemma. Aquest mètode ofereix una alternativa per caracterització biomecànica del cardiomiòcits, ja que permet l'anàlisi simultània de la contracció cardíaca i el calci intracel·lular de manera no invasiva i sense etiquetes (*label-free*), i presenta grans avantatges en les observacions a llarg termini, ja que al tractar-se d'una mesura sense intervenció, neutralitza les possibles pertorbacions al cardiomiòcit en contracció latent. Per validar la solidesa de l'algorisme, es realitzen tres proves amb dades augmentades creades sintèticament. En primer lloc, s'aplica un desplaçament rígid simulat d'una imatge de referència, a continuació, una rotació i, finalment, una deformació lineal controlada de la imatge de referència que simula una deformació nativa realista. Per últim, aquesta metodologia computacional validada amb dades generades sintèticament, s'aplica a dades experimentals reals on es correlacionen les propietats contràctils amb el senyal de calci, Ca^{2+} .

Objectius del capítol 4: Escala teixit

Aquest capítol es centra en l'anàlisi de dades provinents de mostres de d'aurícula de ratolí OF1 en una escala teixit, a partir de senyals de contracció mecànica del teixit cardíac registrats en un bany automàtic d'òrgans. L'objectiu d'aquest capítol és desenvolupar una plataforma computacional per identificar de manera automàtica mitjançant la intel·ligència artificial (*Artificial Intelligence*, AI), anomalies en la contracció mecànica, que poden desencadenar en patologies del sistema contràctil cardíac, com ara, la ja descrita fibril·lació auricular (AF). S'exploren tant els algorismes d'intel·ligència artificial clàssics basats en l'aprenentatge màquina (*Machine Learning*, ML) com els més recents basats amb aprenentatge profund (*Deep Learning*, DL).

L'estudi de les anomalies de contracció del teixit cardíac es focalitza en dos subobjectius; Classificació d'anomalies: Primer es pretén classificar de manera automàtica entre senyals de contracció sense anomalies i amb anomalies de contracció. Per fer-ho, es crea una base dades del registres de contracció etiquetats per experts. S'analitzen diferents algorismes de classificació de Intel·ligència Artificial (IA) mitjançant l'aprenentatge supervisat i s'estudia quins donen millor precisió. Detecció d'anomalies: Segon, un cop entrenat un classificador per discernir entre senyals temporals de contracció amb resposta

sana i anòmala, es pretén anar més enllà i entrenar també amb intel·ligència artificial un detector d'anomalies que detecti la posició temporal exacta on es produeix l'anomalia. Per fer-ho, es crea una base de dades sintètica on es modelitzen els diferents fenòmens d'anomalies de contracció reportats pels experts en l'experimentació en el laboratori, fins a un total de 8 anomalies de diferents tipus. Aquesta base de dades s'utilitza per entrenar diferents detectors d'anomalies i poder comprovar el grau d'incert en la localització temporal de les anomalies en els senyals sintètics de contracció on es coneix la posició exacta de l'anomalia generada. Finalment, el detector que ha obtingut major taxa d'incert s'aplica en senyals experimentals reals per a validar el seu correcte funcionament de manera empírica.

1.4 Origen de les dades

Al llarg dels següents capítols, s'utilitzen dades molt diverses i de diferents escales cardíaques, com ara: registres de corrent iònics obtinguts per la tècnica de pinçament de membrana (*patch-clamp*) en la membrana cel·lular i els seus canals iònics; registres de fluorescència i imatge òptica obtinguda per microscòpia confocal en cèl·lules cardíaques i, finalment, registres de contracció mecànica obtingut per una galga extensiomètrica en teixit cardíac. Les dades utilitzades s'organitzen en dos grups: un grup patològic i en un grup sa, que serà el grup control.

En el capítol 2: Escala intracel·lular i en el capítol 3: Escala cel·lular, les dades experimentals provenen de l'equip del Dr. Leif Hove-Madsen de l'Institut Català de Ciències Cardiovasculars, CSIC, a l'Hospital de Sant Pau.

Les dades del capítol 4: Escala teixit, provenen de l'equip del Dr. Marcel Jiménez de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Capítol 2.

Escala intracel·lular

Capítol 2. Escala intracel · lular

2.1 Introducció

En aquest capítol es presenta una eina computacional completa per a l'estudi i caracterització dels alternans en el senyal calci en cardiomiòcits auriculars humans, a partir del registre i posterior processament dels corrents iònics transmembrana de calci (Ca^{2+}) en un experiment de pinçament de membrana (*patch clamp*) de cèl · lula completa (*whole cell*).

Es presenten diverses característiques per estudiar l'alternança els corrents iònics transmembrana: amplitud de pic, constants de temps, àrea sota la corba del corrent iònic. La precisió de l'extractor de característiques s'ha validat utilitzant senyals de calci simulats generats per un model elèctric que representa amb precisió el comportament del cardiomiòcit en un experiment de patch clamp. Entre aquestes característiques calculades, s'ha creat una nova mesura d'índex, anomenada *index d'alternança*, per quantificar el grau d'alternances elèctriques batec a batec (*beat-to-beat*). L'índex demostra ser una mesura robusta ($p \leq 0,01^{**}$) per a la detecció de cèl · lules amb un patró alternant i concorda amb les alternances en altres característiques calculades com la mesura de la inactivació del corrent de calci tipus *L*, *L-type calcium current*, o el corrent de cua, *tail current*, generat per l'extrusió de calci durant la repolarització.

En els múscul cardíac i també a nivell cel · lular, en els cardimiocits, es poden observar alternans quan hi ha una oscil · lació periòdica batec-a-batec (*beat to beat*) en l'activitat elèctrica (alternants elèctrics), en l'amplitud de la força de la contracció (alternants mecànics) i en l'activitat de calci (alternants de calci) a una freqüència cardíaca constant (Edwards and Blatter. 2014).

Els alternants elèctrics en el múscul cardíac són indicatius de cardiopaties i arrítmies (Navarro-Lopez et al. 1978, Edwards and Blatter. 2014), on la fibril · lació auricular (FA) és la més freqüent relacionada amb els fenòmens d'alternança (Hiromoto et al. 2005, Qu et al. 2000). Malgrat que l'origen de les arrítmies causades per l'alternança elèctrica estan ben estudiats a nivell d'òrgan complet a través del senyal d'electrocardiograma (ECG), encara queda per fer molta recerca sobre l'origen d'aquests fenòmens de conducció irregular a nivell d'escala intermèdies; des de l'escala molecular, passant per l'escala intracel · lular, cel · lular i teixit. Els experiments de pinçament de membrana

ens permeten estudiar el funcionament de la regulació batec-a-batec a una escala intracel·lular, a partir del registre dels corrents iònics que circulen a través de la membrana del cardiomiòcit.

La causa dels alternans és multifactorial, però els alternans sempre s'originen a partir de perturbacions d'acoblament entre la tensió de membrana (v_m) i el calci intracel·lular (Edwards and Blatter. 2014). Per tant, és d'especial interès l'estudi del corrent de calci a través de la membrana del cardiomiòcit, ja que un dels orígens principals dels alternans és l'alteració de la concentració intracel·lular de calci (Cinca et al. 1978). Per això, la majoria de mesures obtingudes en aquest capítol es centren en descriure la morfologia i cinètica del corrent de calci, i en estudiar l'alternança en el senyal de calci en registres experimentals utilitzant la tècnica de pinçament de membrana (*patch-clamp*). Malgrat que la majoria d'amplificadors de pinçament de membrana disposen d'un *software* comercial per a l'anàlisi dels corrents iònics, aquests, al tractar-se d'un sistema tancat i propietari, disposen de poc o cap grau d'adaptació a un tipus d'experimentació concreta. Els *software* comercial, a part del seu gran cost econòmic, es troba bastant limitat pel què fa al nombre de paràmetres calculats, i no permet afegir-hi noves mesures. Així, en aquest capítol, també es proposa una nova mesura, anomenada índex d'alternança, que té per finalitat quantificar el grau d'alternança d'un paràmetre i s'integra al sistema computacional d'anàlisi de corrents iònics.

2.2 L'alternança elèctrica

L'alternança elèctrica (*electrical alternants*, EA) en un senyal d'electrocardiograma (ECG), es deu a les variacions entre batec i batec (*beat to beat*) de l'amplitud, temps o sentit de qualsevol dels complexos del senyal ECG: ona P, interval PR, complex QRS, interval RR, segment ST i ona T. Quan aquest canvis es produeixen en registres de l'activitat mecànica del cor, parlem d'alternança mecànica (Kodama et al. 2001). Veure exemples d'alternança a la Fig. 2.1.

L'alternança elèctrica va ser descrita per primera vegada per Hearing l'any 1909 (Hearing. 1909). Però no va ser fins el 1948 que Kalter i Schwartz van fer la primera descripció d'alternants elèctrics amb el senyal d'ECG (Kalter and Schwartz. 1948).

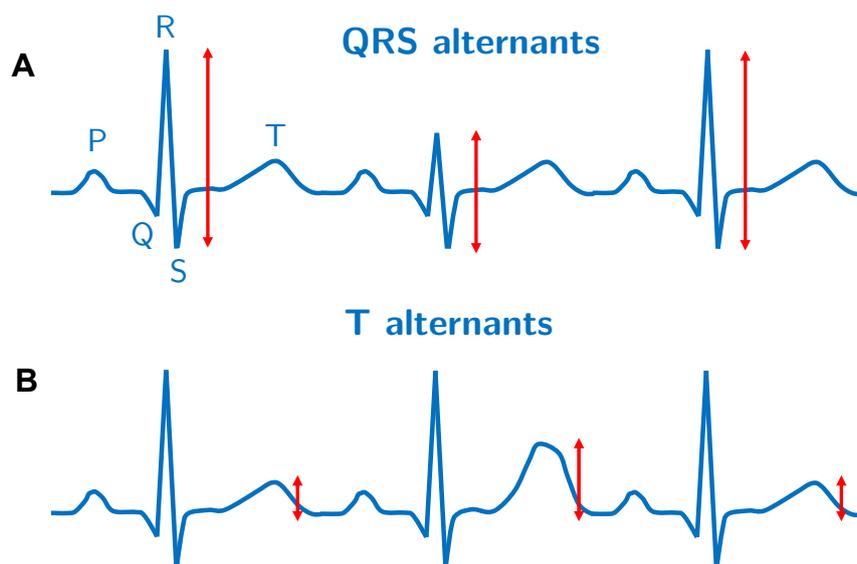


Fig. 2.1. Exemples d'alternança elèctrica a nivell del senyal d'ECG. **A.** Alternança del complex QRS i **B.** Alternança de l'ona T.

Tradicionalment, s'ha estudiat l'alternança en l'electrocardiograma (ECG). L'alternança del segment ST es deu a anomalies en la conducció de les fibres de Purkinje degut a la recapturació del calci del reticle sarcoplasmàtic (*Sarcoplasmic Reticulum*, SR), i és un fenomen associat a patologies com la isquèmia i la fibril·lació auricular (FA) (Hiromoto et al. 2005, Qu et al. 2000, Gong et al. 2007, Navarro-Lopez et al. 1978) i l'infart agut de miocardi. La fibril·lació auricular (FA) és l'arrítmia cardíaca més freqüent en la pràctica clínica i la que genera més visites als serveis d'urgències (Fuster et al. 2006). Es produeix quan les fibres musculars cardíacques individuals es contrauen de

manera caòtica i asíncrona, La fibril·lació auricular, és la arrítmia més freqüent i afecta 1-2% de la població general i la seva prevalença augmenta amb l'edat, tant en homes com en dones. ([Staerk et al. 2017](#), [Go et al. 2001](#)).

Un altra alternança d'especial interès, és l'alternança del segment T en l'electrocardiograma (ECG), que és un fenomen associat a patologies com la insuficiència cardíaca i les arrítmies ventriculars severes ([Shusterman et al. 2006](#), [Kodama et al. 2001](#), [Rosenbaum et al. 1994](#)). L'alternança en el potencial d'acció cardíac sol ser el mecanisme subjacent de l'alternança elèctrica ([Pastore et al. 1999](#)).

2.3 Descripció de la tècnica de pinçament de membrana

La tècnica del pinçament de membrana (*patch-clamp*) va ser desenvolupada per Nher i Sakmann el 1976 (Nher and Sakmann. 1976), i va permetre registrar els corrents d'un canal iònic per primera vegada. Pels seus estudis sobre la funció individual dels canals iònics utilitzant el muntatge de pinçament de membrana, Nher i Sakmann van rebre, el 1991, el Premi Nobel de Fisiologia o Medicina. A diferència d'altres proves d'electrofisiologia on s'utilitzen microelectrodes, en el pinçament de membrana s'utilitza una micropipeta de vidre amb una obertura arrodonida al seu extrem amb un diàmetre d'aproximadament $1\ \mu\text{m}$, que és una dimensió suficientment petita per poder contenir un únic canal iònic. La pipeta s'omple amb una solució que coincideix amb la solució del bany on es troba submergida la cèl·lula que es pretén mesurar. Un cable conductor de clorur de plata està en contacte amb aquesta solució i condueix el corrent elèctric a l'amplificador. Existeixen diferents configuracions de la tècnica de pinçament de membrana depenent de si es vol estudiar la funció d'un únic canal iònic, *inside-out*, *outside-out*, o de la cèl·lula completa, *whole cell* (veure Fig. 2.2).

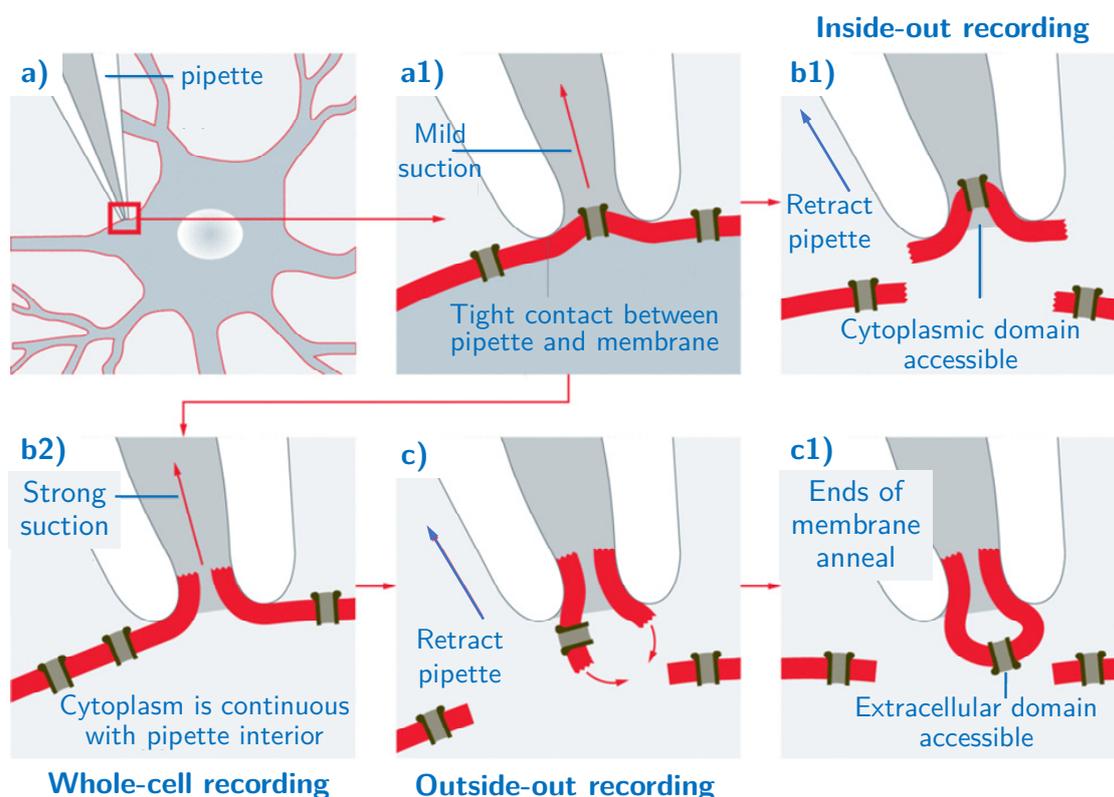


Fig. 2.2. Diferents configuracions de pinçament de membrana. Adaptació de (Leica microsystems).

Totes les configuracions de la tècnica de pinçament de membrana comencen igual: la micropipeta entra en contacte amb la membrana cel·lular (a) i s'aplica una petita succió per a crear un segellat entre la pipeta i la membrana (a1). A partir d'aquí sorgeixen les diferents configuracions. Si se segueix aplicant la succió i es retira la micropipeta cap enrere, es trenca la membrana cel·lular circumdant a la pipeta i queda el canal iònic seleccionat dins de la micropipeta i, per tant, el domini citoplasmàtic es troba accessible (b1). Aquesta configuració s'anomena *inside-out*. En canvi, si sense retirar la micropipeta es segueix aplicant una succió més forta, es trenca la membrana cel·lular de l'interior de la pipeta (b2). Aquesta configuració s'anomena *whole-cell*. Si després d'arribar a la configuració *whole-cell* es retira la micropipeta cap enrere, es trenca la membrana cel·lular circumdant a la pipeta (c), però es tornen a unir els extrems lliures de la membrana formant un bulb, *bleb out* (c1) i el domini extracel·lular queda accessible. Aquesta configuració s'anomena *outside-out*.

2.4 Obtenció de les mostres de teixit cardíac auricular

Per a l'experimentació, s'han utilitzat cardiomiòcits humans auriculars (*Human Atrial Myocyte*, HAM). La mostra de teixit humà s'extreu en les operacions cardíques de revascularització (*bypass*) amb circulació extracorpòria a l'Unitat de Cardiologia i Cirurgia Cardíaca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. En aquestes operacions es requereix aturar el cor i mantenir buides de sang les cavitats cardíques, sense deixar de perfondre la resta de l'organisme. Per fer-ho, s'utilitza una màquina de circulació extracorpòria, que assumeix les funcions del cor encarregant-se de l'acció de bombeig i oxigenament de la sang. Prèviament a la canulació del connexionat a la màquina, s'extreu la mostra de teixit de l'auriculilla auricular, emmagatzemada en una solució Tyrode oxigenada freda i transportats al laboratori. Totes les mostres es van prendre amb el consentiment informat dels donants. El protocol ha estat aprovat pel comitè ètic de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i compleix la Declaració de Helsinki de principis ètics de l'Associació Mèdica Mundial (*The World Medical Association*, WMA).

2.4.1 Mètode d'aïllament dels cardiomiòcits

Al laboratori s'extreu fragments de la mostra de teixit auricular de 1x1 mm, i tot seguit s'aïllen els cardiomiòcits mitjançant digestió enzimàtica. Per tal d'evitar la degradació del teixit auricular, es submergeix en una solució amb absència de calci, anomenada solució Tyrode sense CaCl₂, (Veure [Taula 2.1](#)), a la qual s'hi afegixen 30 mM de monoxima-2,3-butanediona, C₄H₇NO₂, immediatament després de l'extracció.

Solució	Composició de la solució	pH	Temperatura
Tyrode (sense CaCl ₂)	88 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,1 mM MgCl ₂ 0,3 mM NaH ₂ PO ₄ 4 mM NaHCO ₃ 10 mM HEPES 10 mM glucosa 88 mM sucrosa 5 mM Na ⁺ piruvat 20 mM taurina	7,4 amb NaOH	ambient

Taula 2.1. Composició de la solució Tyrode sense calci.

2.4.2 Digestió enzimàtica

Els talls de teixit es realitzen en la mateixa solució de tyrode sense calci ([Taula 2.1](#)). A continuació, es procedeix a la primera digestió enzimàtica durant un temps de 30 *min* a una temperatura de 35 °C. Per aquesta primera digestió s'utilitza la solució, indicada a la [Taula 2.2](#).

Solució	Composició de la solució	temps	Temperatura
Primera digestió	Tyrode (sense CaCl ₂)	30 <i>min</i>	35 °C
	1,8 <i>mg/ml</i> colagenasa 0,42 <i>mg/ml</i> proteasa 2 <i>mg/ml</i> BSA		
Digestions posteriors	Tyrode (sense CaCl ₂) 0,6 <i>mg/ml</i> colagenasa 2 <i>mg/ml</i> BSA	15 <i>min</i>	35 °C

Taula 2.2. Solucions per a les digestions enzimàtiques per a l'aïllament del cardiomiòcit.

Un cop passats els 30 *min*, el teixit es retira de la primera solució enzimàtica per tal d'interrompre la primera digestió i es renta amb una solució Tyrode de calci amb un 5% de BSA. Un cop netejat el teixit, es disgreguen les cèl·lules mitjançant un pipeta Pasteur de 3 *ml*. El teixits restants no disgregats se sotmeten a digestions enzimàtiques successives d'una duració de 15 *min*.

S'utilitza la solució Tyrode per a les digestions posteriors, tal com s'indica a la [Taula 2.2](#). Després que s'hagi disgregat tot el teixit, els cardiomiòcits obtinguts s'emmagatzemen en una solució de manteniment (veure [Taula 2.3](#)) i es va incrementant gradualment la concentració de calci en la solució fins a 1 *mM*. Les cèl·lules obtingudes només s'utilitzaran per experimentació durant una finestra temporal de 10 *h*.

Solució	Composició de la solució
Manteniment	Tyrode (sense CaCl ₂)
	1 <i>ml</i> MEM vitamines
	1 <i>ml</i> penicilina-streptomicina
	2 <i>ml</i> aminoàcids essencials MEM (50X)
	1 <i>ml</i> aminoàcids essencials MEM (100X)
	500 <i>mg</i> BSA

Taula 2.3. Composició de la solució de manteniment del cardiomiòcit.

2.4.3 Criteris de selecció pels cardiomiòcits

Per preparar l'experiment d'electrofisiologia, s'han seleccionat cardiomiòcits allargats en els quals s'observa estriació i que no presenten granulació. Per prevenir l'adhesió dels cardiomiòcits a la capsula de Petri, es fa un tractament previ a les plaques amb albúmina de sèrum boví (Bovine Serum Albumin Lyophilised, BSA) en solució extracel·lular. Per a realitzar l'experimentació, es substitueix la solució de la placa, per la solució extracel·lular sense BSA, i a continuació s'afegeixen unes gotes de la solució que conté els cardiomiòcits en suspensió. En la [Taula 2.4](#) es mostra la composició de les solucions del medi intracel·lular i extracel·lular.

2.5 Registres d'electrofisiologia

Aquesta secció descriu la configuració experimental del pinçament de membrana (*patch-clamp*) utilitzat per registrar els corrents de calci a través de la membrana del cardiomiòcit.

2.5.1 Configuració del pinçament de membrana

Els corrents d'ions de calci (Ca^{2+}) es registren mitjançant la tècnica de pinçament de membrana (*patch clamp*) en la configuració de cèl·lula aïllada (*whole cell*). Un cop els cardiomiòcits han sedimentat correctament, ja ens trobem en condicions per aproximar la micropipeta als cardiomiòcits elegit i aplicar una lleugera pressió negativa per a poder agafar-lo (veure Fig. 2.3).

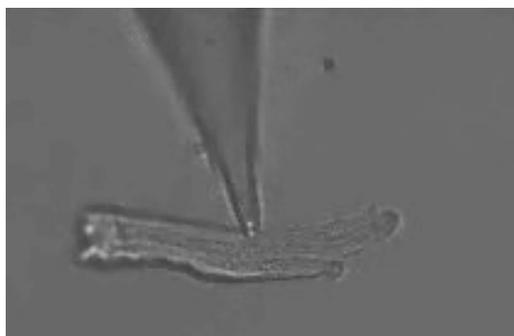


Fig. 2.3. Detall d'un cardiomiòcit sostingut amb una micropipeta de pinçament de membrana.

Quan la resistència inicial de la micropipeta, $1-2,5 \text{ m}\Omega$, passa a ser de $1 \text{ G}\Omega$, és un factor indicatiu que s'ha format un segellat correcte per contacte entre la superfície interna de la punta de la micropipeta i la membrana cel·lular. Un cop format el segellat es deixa d'aplicar la pressió negativa, ja que no és necessària. Tot seguit, el cardiomiòcit s'aixeca del fons de la capsula de Petri i es col·loca davant d'un sistema de capil·lars per perfusió. Llavors, el cardiomiòcit es perfusiona amb les solucions desitjades segons el tipus d'experiment. Les cèl·lules es descarten si la resistència sèrie de la membrana (R_m) és més gran que k vegades la resistència de la pipeta (R_p), $k \cdot R_m > R_p$ amb $k=6$.

Medi	Composició de la solució	pH	Temperatura
Intracel · lular	1 mM MgCl ₂	7,2 amb NaOH	35 °C (ambient)
	47 mM CsCl		
	3 mM Mg ₂ ATP		
	109 mM àcid aspàrtic		
	5 mM Na ₂ -fosfocreatina		
	0,42 mM Li ₂ GTP		
Extracel · lular	10 mM HEPES	7,4 amb NaOH	35 °C (ambient)
	250 µg/ml amfotericina B		
	2 mM CaCl ₂		
	127 mM NaCl		
	1,8 mM MgCl ₂		
	0,33 mM NaH ₂ PO ₄		
Extracel · lular	4 mM NaHCO ₃	7,4 amb NaOH	35 °C (ambient)
	10 mM HEPES		
	10 mM glucosa		
	5 mM àcid pirúvic		
	5 mM TEA		

Taula 2.4. Composició de les solucions del medi intracel · lular i extracel · lular utilitzades a la tècnica de pinçament de membrana.

Per l'enregistrament del potencial de la membrana cel · lular s'ha utilitzat la solució del bany i solució de la pipeta mostrada a la [Taula 2.5](#).

Solució	Composició de la solució	pH	Temperatura
Bany per l'enregistrament	2 mM CaCl ₂	7,4 amb NaOH	35 °C (ambient)
	136 mM NaCl		
	1,6 mM MgCl ₂		
	4 mM KCl		
	0,33 mM NaH ₂ PO ₄		
	4 mM NaHCO ₃		
	10 mM HEPES		
	5 mM glucosa		
Pipeta	5 mM àcid pirúvic	7,2 amb KOH	35 °C (ambient)
	1 mM MgCl ₂		
	47 mM KCl		
	3 mM Mg ₂ ATP		
	109 mM àcid aspàrtic		
	5 mM Na ₂ -fosfocreatina		
	0,42 mM Li ₂ GTP		
	10 mM HEPES		
Pipeta	250 µg/ml amfotericina B		

Taula 2.5. Composició de les solucions pel registre dels potencials de membrana.

Pel registre es va utilitzar l'amplificador Heka model EPC 10 USB (Heka Elektronik GmbH, Ludwigshafen Rhein, Alemanya), que disposa d'un convertidor analògic digital (ADC) amb una freqüència de mostreig màxima, F_{smax} de 200 kHz quan s'utilitzen dos canals.

En els experiments de pinçament de membrana (*patch clamp*) amb cardiomiòcits reals, és sol utilitzar la compensació automàtica de la resistència sèrie (*series-resistance compensation*) i de la capacitat paràsita (*parasitic-capacitance compensation*) introduïda per la pipeta. Quan l'amplificador utilitza la compensació activa, les diferències entre potencial de membrana, v_m , i el voltatge de control, v_c , es redueixen. La compensació de la resistència en sèrie corregeix els errors de la tensió de membrana en condicions d'alta resistència d'accés, R_a , entre la pipeta i l'interior de la cèl·lula. El procediment automàtic de la compensació de la resistència en sèrie intenta mantenir la resposta d'excés al mínim, ja que aquest excés condueix a un augment del soroll i introdueix components d'alta freqüència al senyal. Però en aquests experiments, no s'ha utilitzat la compensació automàtica de la resistència sèrie.

La Fig. 2.4 mostra un cardiomiòcit amb pinçament de voltatge en un experiment de patch-clamp de cèl·lula completa en el cas del mode de pinçament de voltatge utilitzant una sola micropipeta. Així, la mateixa pipeta es fa servir tant per registrar el potencial de membrana com per simular el cardiomiòcit. La configuració més típica en els experiments patch-clamp és la pinça de voltatge, on el voltatge de membrana del cardiomiòcit, v_m , s'amplifica utilitzant un amplificador operacional. El voltatge de control, v_c , és el voltatge desitjat a la membrana en una configuració ideal, és a dir, $v_m = v_c$ (Magistretti et al. 1996).

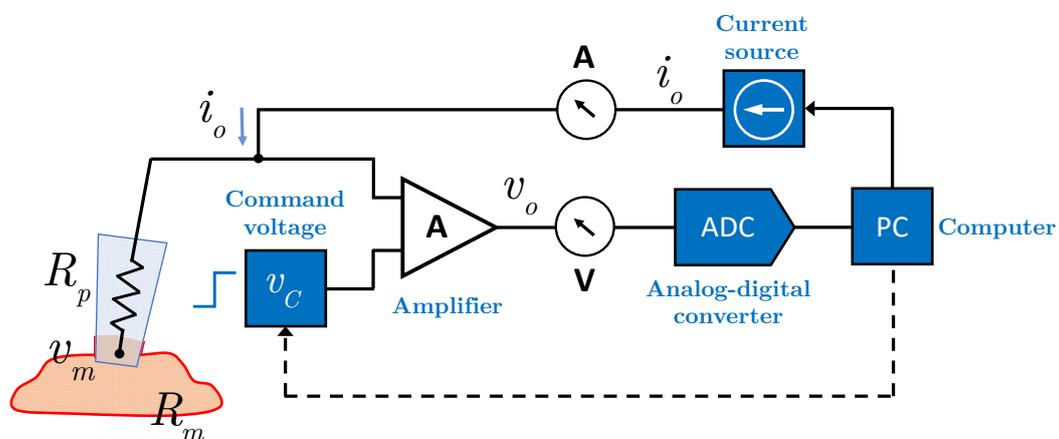


Fig. 2.4. Enregistrament d'un experiment de pinçament de membrana de cèl·lula completa (*whole-cell*) realitzat en un cardiomiòcit amb un única pipeta per a l'estimulació i el registre.

El voltatge de membrana del cardiomiòcit, v_m , s'amplifica a través d'un amplificador operacional i s'obté el voltatge a la sortida de l'amplificador, v_o , que tot seguit es pot registrar amb un ordinador gràcies un a convertidor analògic digital (ADC). A continuació, el corrent de sortida de l'amplificador es mesura utilitzant un amplificador de transimpedància (TIA) i s'injecta el corrent i_o ràpidament de nou a la membrana cel·lular del cardiomiòcit a través de la pipeta, que ara actua com una pipeta d'estimulació per mantenir la tensió de control preestablerta, v_c (Sigworth. 1995). O alternativament, si la resistència de retroalimentació de l'amplificador, R_f , és coneguda, el corrent a la sortida de l'amplificador, i_o , pot ser calculada amb el microcontrolador del dispositiu aplicant la llei d'Ohm. D'aquesta manera, es tanca el bucle de realimentació. Aquesta realimentació de corrent (Sharp et al. 1993, Economo et al 2010) es coneix com a pinça dinàmica (*dynamic clamp*). El voltatge de control, v_c , és la consigna de voltatge que es vol mantenir a la membrana. Així en una configuració ideal, es compleix que $v_m=v_c$. Per tant, el corrent injectat a la cèl·lula és proporcional a la sortida de l'amplificador. Així es tanca el llaç de retroalimentació, *feedback*. Normalment, les magnituds del corrent de membrana són de l'ordre de pA a μA , depenent de la mida de la cèl·lula, i per tant el voltatge a través de la membrana sol ser de l'ordre de mV (Lei et al. 2020).

2.6 Protocols d'estimulació

Aquesta secció descriu el protocol utilitzat per registrar els corrents de calci a través de la membrana del cardiomiòcit. Un total de 24 senyals de pinçament de membrana experimentals enregistrats ($N = 24$).

En els estudis de pinçament de membrana o *patch clamp* interessa estudiar l'activitat espontània mitjançant l'aplicació d'un voltatge fix o l'activitat estimulada mitjançant l'aplicació d'un pols de voltatge variable. (Veure Fig. 2.5).

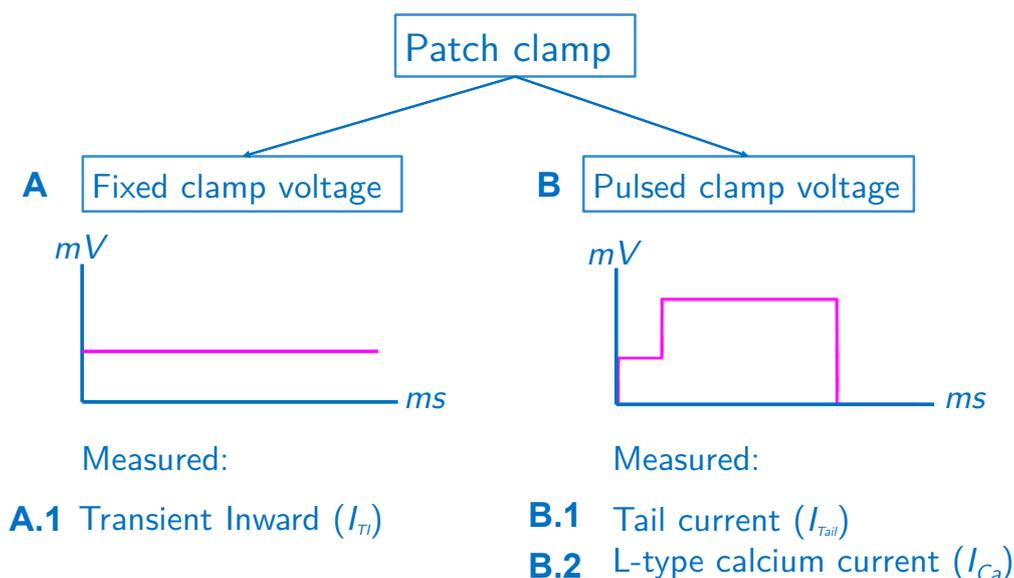


Fig. 2.5. Voltatges d'estimulació utilitzats en la tècnica de pinçament de membrana.

2.6.1 Protocol d'estimulació amb voltatge fix

En aquest protocol, el voltatge d'estimulació es manté fix a un potencial de -80 mV, valor pròxim al potencial de la membrana en repòs.

En els experiments de pinçament de membrana amb voltatge d'estimulació fix hi ha un únic corrent d'especial interès:

(A.1) Els corrents transitoris d'entrada de calci (*Transient Inward current*, I_{Ti}).

A continuació, es descriu de forma detallada el protocol d'estimulació del cardiomiòcit amb un voltatge fix utilitzat en l'experiment de pinçament de membrana en configuració de cèl·lula completa (*whole-cell*). S'aplica de forma mantinguda un voltatge fixe de -80 mV amb una duració total de 30 s.

Es registren els corrents transitoris d'entrada de calci espontànies induïdes per l'alliberament de calci cap a l'interior de la cèl·lula per l'intercanviador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (Veure Fig. 2.6).

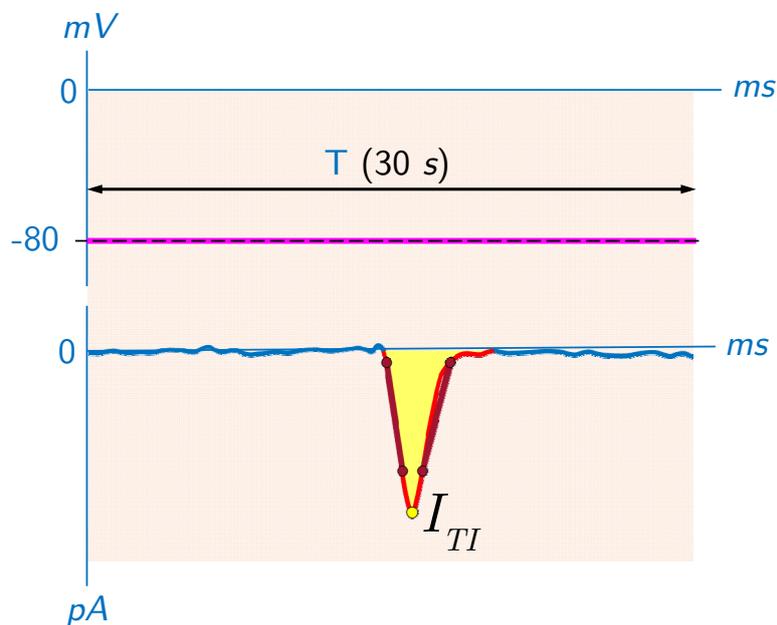


Fig. 2.6. Protocol d'estimulació amb voltatge fix per l'experimentació de pinçament de membrana en configuració de cèl·lula completa.

2.6.1.1 Descripció de la resposta

Per l'experimentació amb un pols d'estimulació contant observem dos tipus respostes espontànies: (a) una única resposta i (b) varies respostes. (Veure Fig. 2.7).

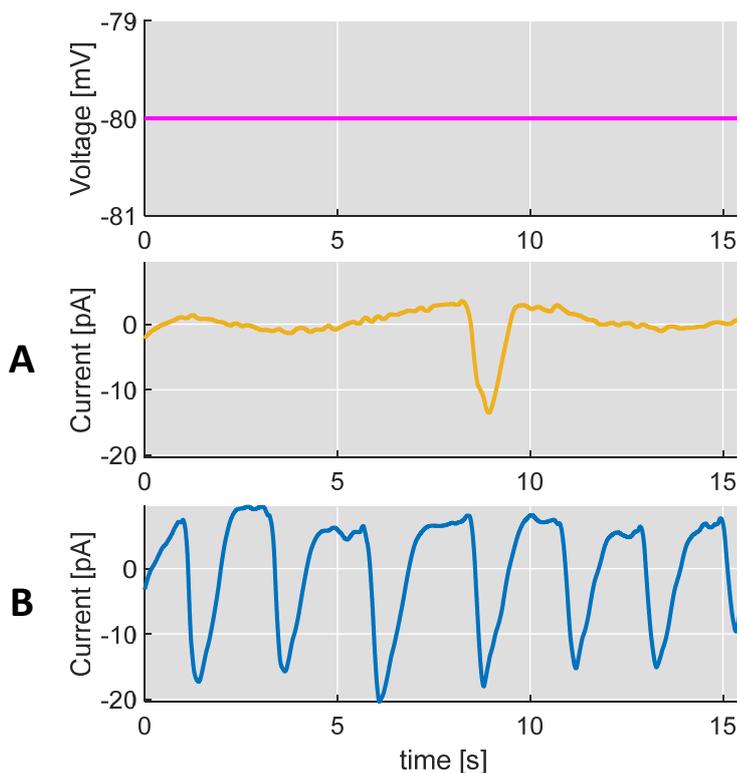


Fig. 2.7. Resposta representativa del corrent iònic a través de la membrana cel·lular amb respostes espontànies única (color taronja) i múltiple (color blau).

En la Fig. 2.8 i la Fig. 2.9 es representen les característiques detectades en les respostes registrades del corrent iònic a través de la membrana d'uns cardiomiòcits representatius amb resposta espontània única i resposta repetitiva. L'estimació dels punts que s'utilitzen per descriure el pendent es descriu amb detall a l'apartat: [2.8.2 Extracció de automàtica característiques, c\)](#).

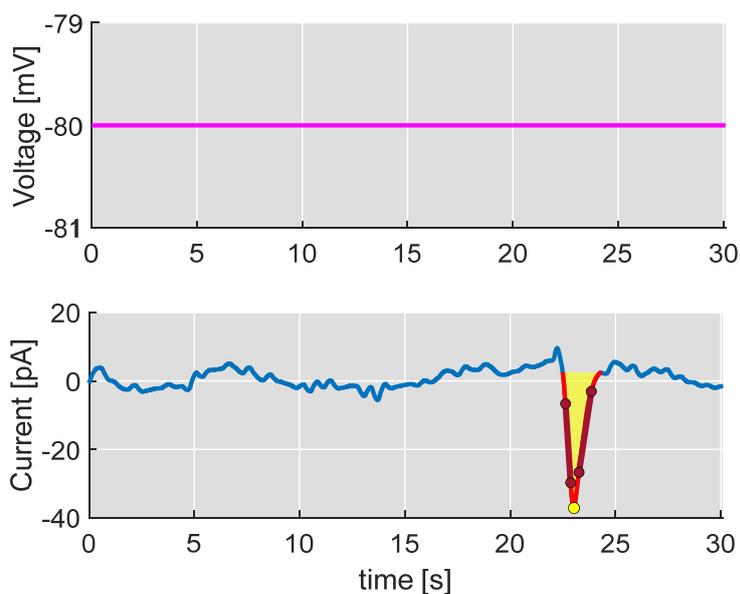


Fig. 2.8. Detecció de característiques en una resposta del corrent iònic a través de la membrana cel·lular amb una única resposta espontània.

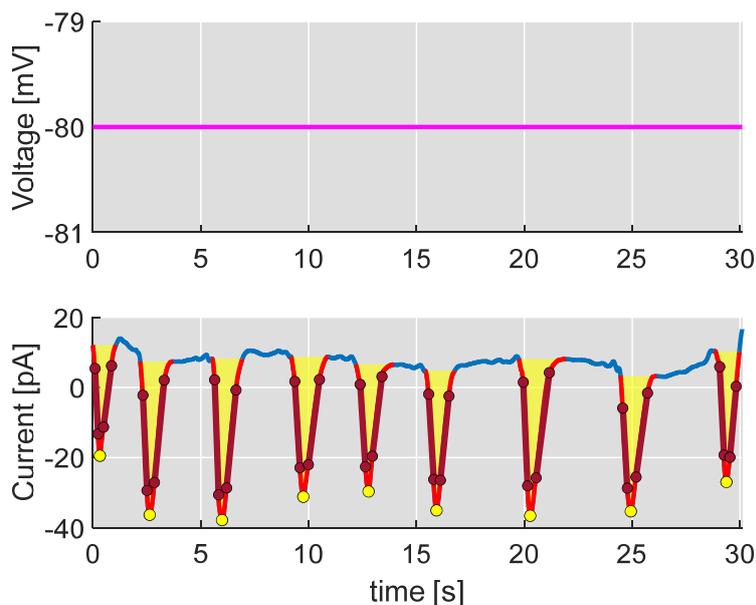


Fig. 2.9. Detecció de característiques en una resposta representativa del corrent iònic a través de la membrana d'un cardiomiòcit amb varies respostes espontànies.

2.6.2 Protocol d'estimulació amb voltatge variable

En aquest protocol, el voltatge d'estimulació és un pols d'estimulació. En els experiments de patch clamp amb voltatge variable presenten interès dos tipus de corrents de membrana:

- (B.1) Els corrents de calci de tipus L (I_{Ca})
- (B.2) El corrent de cua (I_{Tail})

En aquest protocol, interessa que no hi hagi influència dels corrents de potassi, I_K , perquè no interfereixin en el mesurament del corrent de calci, I_{Ca} . Observis que les solucions intracel·lulars i extracel·lulars no contenen potassi (K^+) (veure [Taula 2.4](#)). El corrent de sodi, I_{Na} , també ha estat eliminat aplicant un pre-puls d'amplitud -45 mV i duració de 50 ms, que té la funció d'inactivar aquest corrent. En els canals iònics en què el seu estat d'obertura o tancament ve determinat pel propi potencial de membrana, com ara els canals de Na^+ , K^+ i Ca^{2+} en el protocol d'estimulació de pinçament de membrana, se solen aplicar pulsos en forma de graó (*stepwise pulses*) per investigar la dependència del canal amb el potencial de la membrana ([Okada. 2012](#)).

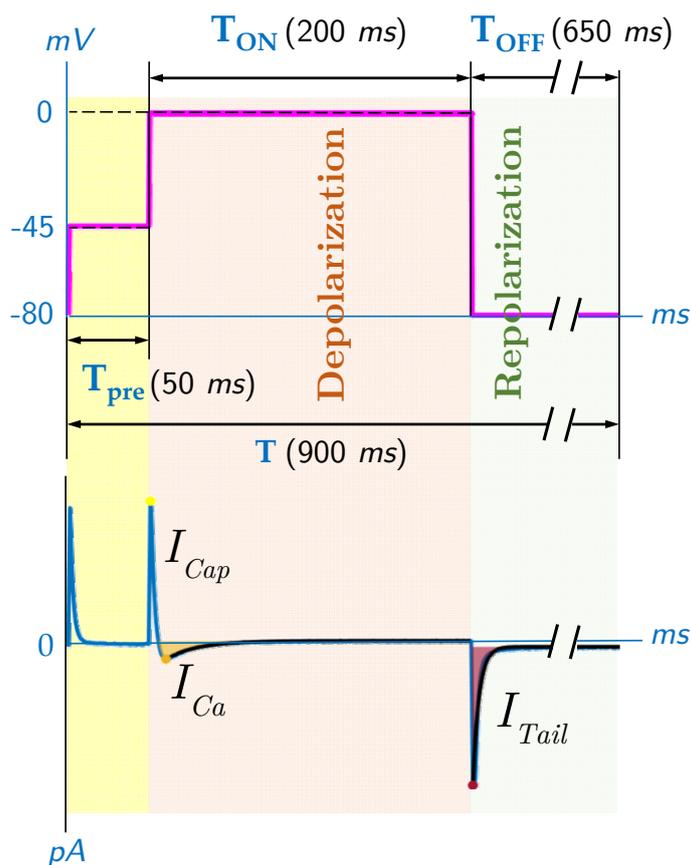


Fig. 2.10. Protocol d'estimulació i corrents resultants. S'utilitza un preimpuls de 50 ms de -80 a -45 mV per desactivar el corrent de sodi, I_{Na} . Posteriorment, la despolarització de 200 ms de -45 a 0 mV provoca primer un corrent capitiu ràpid cap a l'exterior de la cèl·lula, I_{cap} , seguit d'un corrent de calci cap a l'interior, I_{Ca} . Després de la repolarització, primer s'obté un corrent capitiu ràpid cap a dins la cèl·lula cardíaca, seguit d'un corrent transitori de cua, I_{Tail} .

A continuació, es descriu de forma detallada el protocol d'estimulació del cardiomiòcit amb un pols de voltatge variable utilitzat en l'experiment de pinçament de membrana en configuració de cèl·lula completa o *whole-cell*. Primer de tot s'aplica un pre-pols mitjançant una despolarització parcial des de -80 mV a una amplitud de -45 mV amb una duració total de 50 ms, amb l'objectiu principal d'eliminar l'efecte del corrent de sodi, I_{Na} . Tot seguit, el cardiomiòcit es despolaritza des d'un potencial de repòs de -80 mV a 0 mV (veure Fig. 2.10) amb l'objectiu d'activar els canals de calci. Així, la despolarització activa l'obertura dels canals de calci, donant lloc a un corrent de calci, I_{Ca} , d'entrada. La desaparició del corrent durant la despolarització, reflecteix la inactivació dels canals de calci. Finalment, s'aplica un pols de repolarització de 0 mV a el potencial de repòs de -80 mV amb una duració de 650 ms que permet examinar el corrent de cua, I_{Tail} , provocat per repolaritzant

de la cèl·lula a -80 mV (veure Fig. 2.11). Aquest protocol d'estimulació es repeteix 30 vegades, $N_{sweep} = 30$.

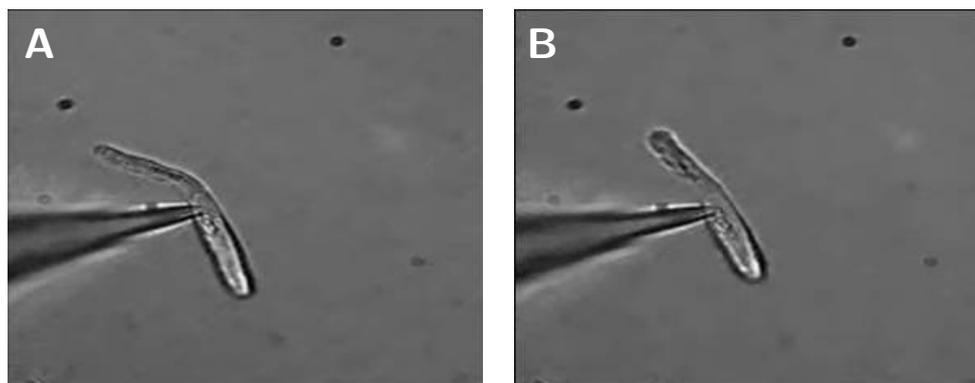


Fig. 2.11. **A.** Cardiomiòcit auricular humà relaxat en el seu potencial de repòs de -80 mV . **B.** Cardiomiòcit contret en ésser sotmès a una despolarització de 0 mV .

2.6.2.1 Descripció de la resposta

Per l'experimentació amb un pols d'estimulació variable s'han utilitzat cardiomiòcits amb resposta batec-batec (*beat to beat*): **(a)** tipus uniforme (*uniform*) i **(b)** resposta tipus alternant (*alternant*). Veure Fig. 2.12, per les respostes uniforme degut a un pols d'estimulació.

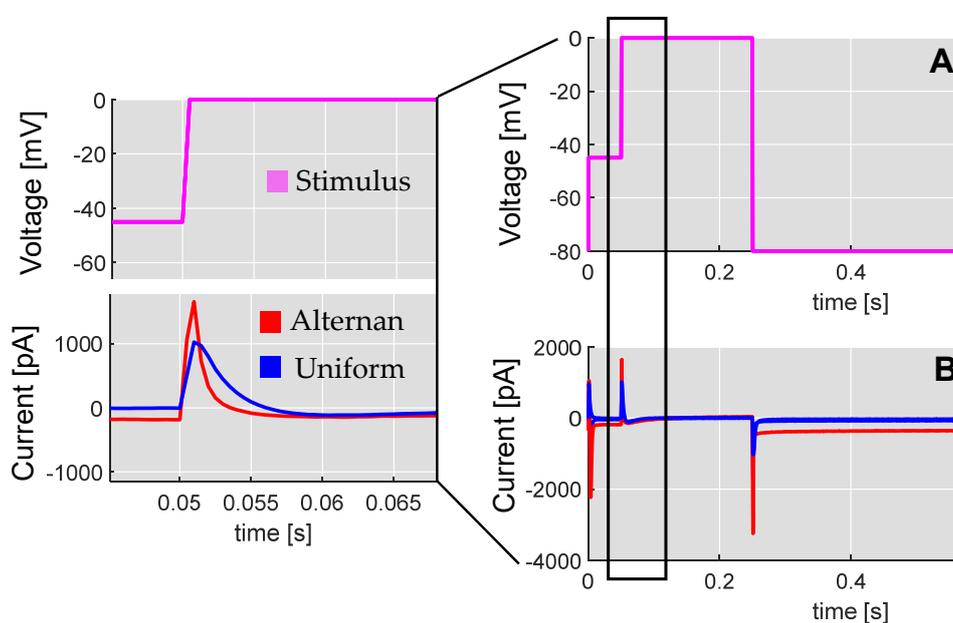


Fig. 2.12. **A.** Pols d'estimulació **B.** Resposta representativa del corrent iònic a través de la membrana d'un cardiomiòcit amb resposta tipus uniforme (color blau) i resposta tipus alternant (color vermell).

En la Fig. 2.12 es representen la resposta registrada de corrent per uns cardiomiòcits representatius amb resposta uniforme i resposta alternant.

En les següent figures (Fig. 2.13, Fig. 2.14 i Fig. 2.15) es representa la detecció de paràmetres en dos senyals representatives d'un cardiomiòcit amb resposta tipus uniforme i un altre amb resposta alternant.

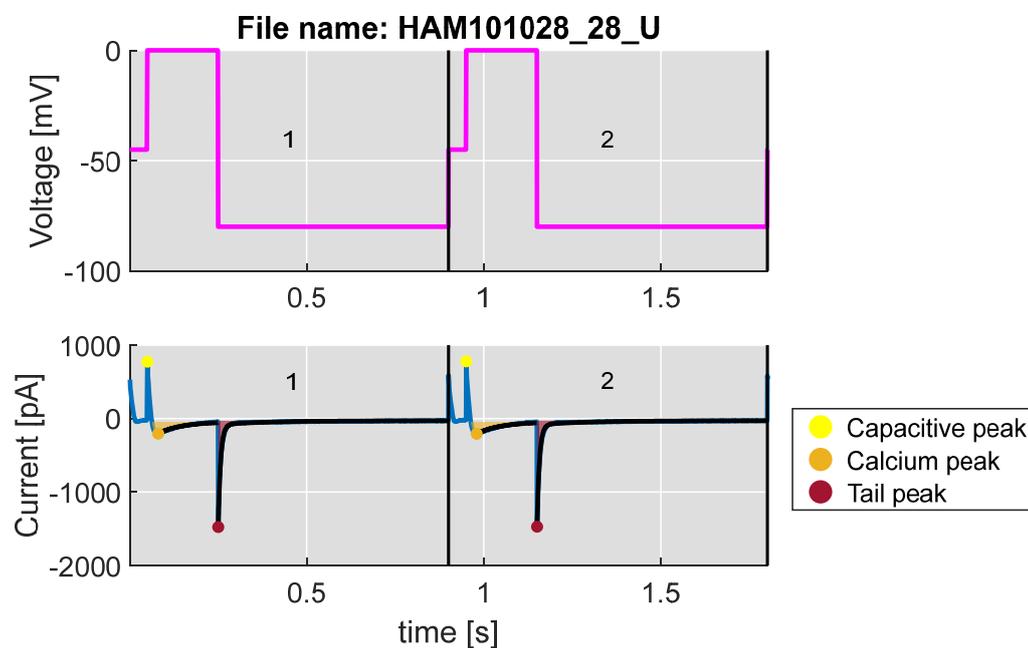


Fig. 2.13. Detecció de característiques en un cardiomiòcit representatiu amb resposta tipus uniforme (color blau).

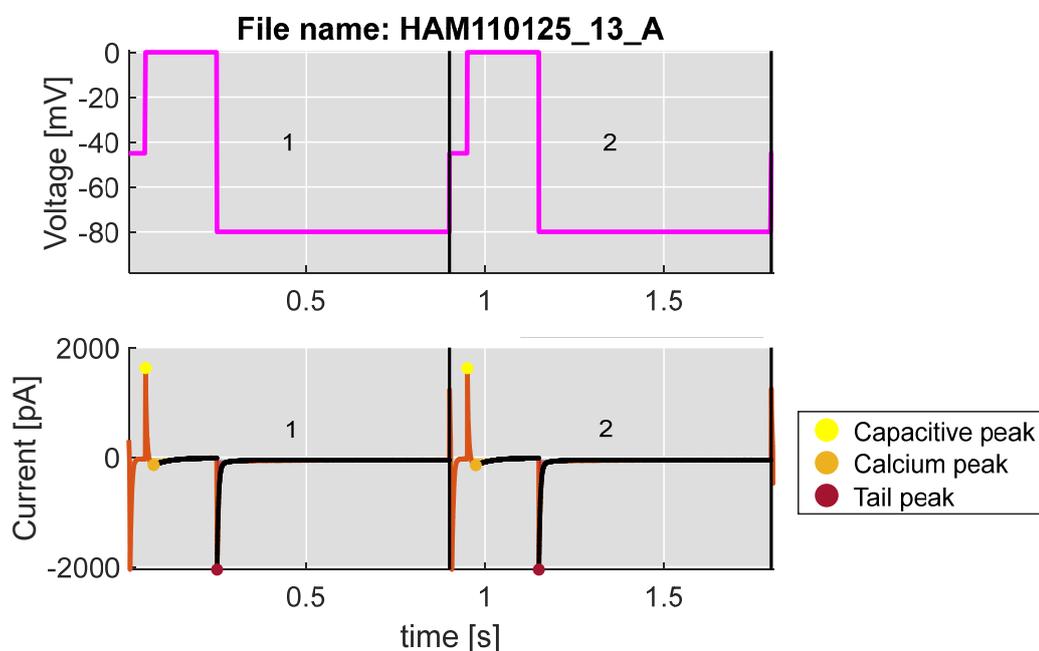


Fig. 2.14. Detecció de característiques en un cardiomiòcit representatiu amb resposta tipus alternant (color vermell).

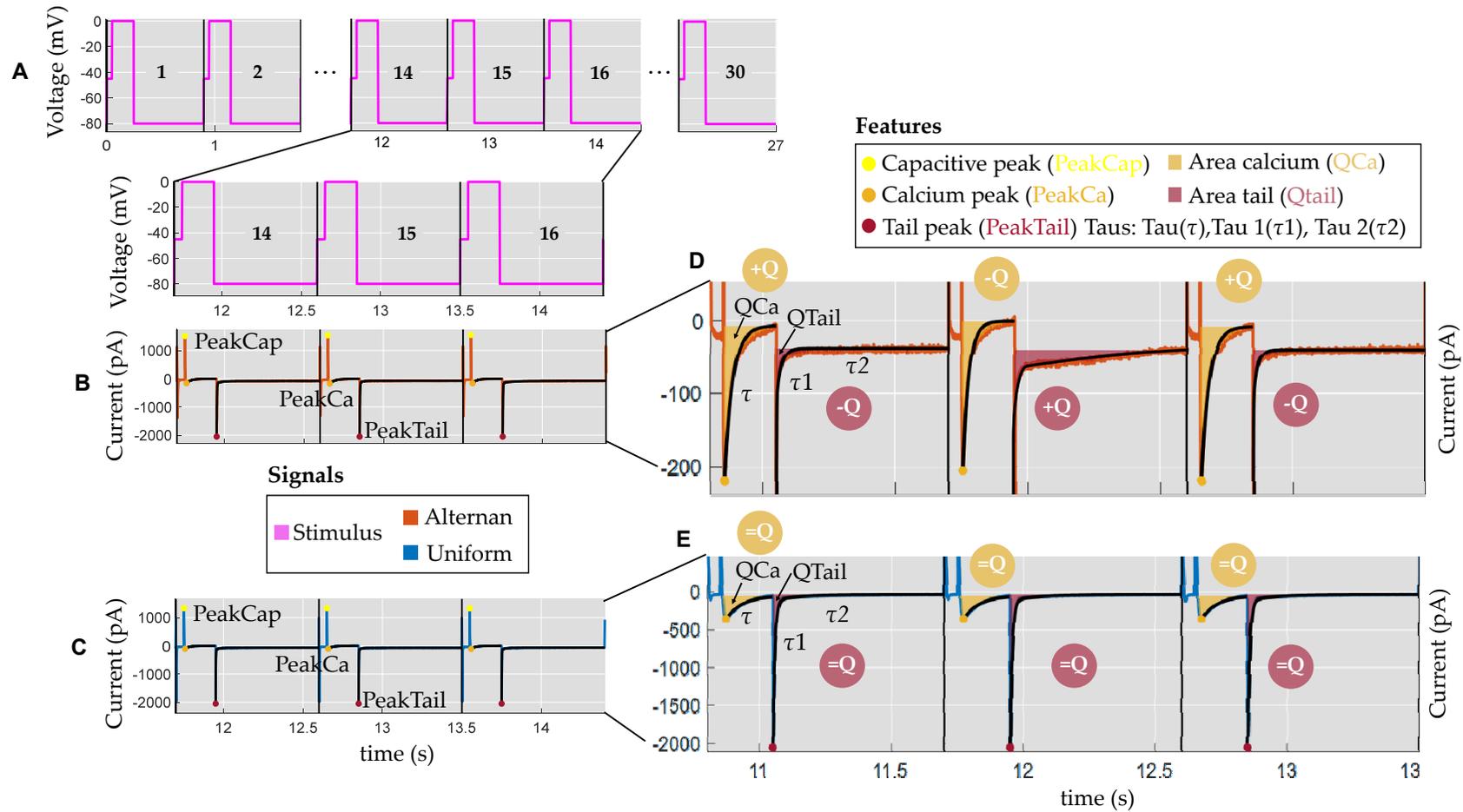


Fig. 2.15. Detecció de paràmetres de pic al corrent de patch-clamp. **A.** Resposta uniforme. **B.** Resposta alternant. **C.** Zoom de la resposta alternant.

2.7 Modelització del registre de pinçament de membrana

Per validar les característiques extretes per definir el comportament batec a batec (*beat-to-beat*) dels cardiomiòcits, com ara determinar si presenten una resposta uniforme o alterna, es requereix un model numèric detallat. Aquest model hauria de ser capaç de descriure la biofísica del cardiomiòcit i el sistema electrònic utilitzat per adquirir el senyal actual de la membrana cel·lular d'una manera realista. Mitjançant un model detallat, els investigadors poden simular el comportament del sistema i validar les característiques extretes del comportament cel·lular. Això vol dir que les característiques són precises, coherents i reproduïbles, fins i tot quan l'experiment es realitza diverses vegades o en condicions d'estímul variables, com en el nostre cas. El model pot proporcionar informació molt valuosa sobre els mecanismes subjacents que regeixen el comportament dels cardiomiòcits en experiments de pinçament de membrana. A més el fet de poder modelitzar correctament el comportament d'un experiment de pinçament de membrana, permet disposar d'una estació de treball d'electrofisiologia virtual i assajar nous protocols d'estimulació, així com caracteritzar paràmetres elèctrics de la cèl·lula. També és útil per veure l'efecte individual de cada element del model.

2.7.1 Descripció del model elèctric

Per validar la precisió dels paràmetres obtinguts en el nostre marc computacional, s'ha creat un model d'ordre zero (model elèctric) per generar senyals sintètics realistes que descriuen el protocol de pinçament amb estimulació polsada descrit a l'apartat 2.6.2: Protocol d'estimulació amb voltatge variable. El model presentat per descriure l'experiment de pinçament de membrana en configuració de cèl·lules completa es compon de dues parts principals.

La primera part modela la biofísica del cardiomiòcit, que implica els processos elèctrics i els artefactes que es produeixen dins de la membrana cel·lular. La segona part del model està dedicada a modelar el sistema electrònic utilitzat per adquirir el senyal actual de la membrana cel·lular. Aquesta part del model té en compte els amplificadors i els filtres que s'utilitzen en el maquinari del dispositiu de pinça de pegat. La Fig. 2.16 mostra el model elèctric complet que descriu l'experiment de pinça de pegat de cèl·lula sencera.

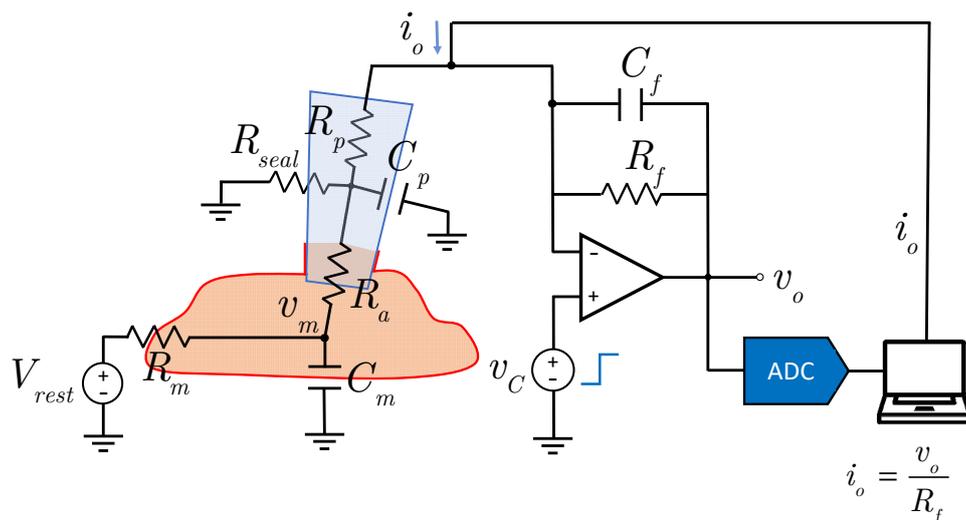


Fig. 2.16. Model elèctric d'un experiment de pinçament de membrana de cèl·lula completa (*whole-cell*) amb un únic elèctrode per a l'estimulació i el registre.

El model elèctric de l'experiment de pinçament de membrana es troba conformat per tres blocs bàsics: el cardiomiòcit, la pipeta i l'amplificador.

Components elèctrics del cardiomiòcit

Les variables elèctriques que caracteritzen el cardiomiòcit són:

El potencial de membrana (v_m)

És la diferència de potencial en la membrana del cardiomiòcit.

El potencial de repòs (V_{rest})

Els cardiomiòcits i fibres cardíaques de Purkinje (Lopatin and Nichols. 2001), solen mantenir un potencial de membrana pròxim al potencial d'equilibri del potassi, K^+ , generalment al voltant de -90 mV . En el model d'estudi, el potencial de repòs es simula amb una font de tensió.

La capacitat de la membrana (C_m)

És la capacitat elèctrica de la membrana cel·lular i descriu quanta càrrega es requereix per canviar la tensió de la membrana. (Neher and Marty. 1982). Les cèl·lules més grans amb més superfície de membrana tenen una capacitat més gran i requereixen més càrrega per a canviar-ne el seu voltatge. Diversos autors han mesurat una capacitat de membrana per a cardiomiòcits individuals compresa entre $100\text{-}400\text{ pF}$ en varies espècies (Satoh et al. 1996). La capacitat de membrana mesurada en els cardiomiòcits del nostre experiment és d'aproximadament de 55 pF . Addicionalment, a partir de la resistència de membrana, R_m , i la capacitat de la membrana, C_m , es defineix la constant de temps de la membrana.

La Resistència de la membrana (R_m)

La resistència de la membrana cel·lular (Major et al. 1993a, Major et al. 1993b), es determina per les propietats dels canals iònics que es troben a la membrana cel·lular. Es defineix la conductància de membrana, G_m , com la inversa de la resistència de la membrana. La conductància augmenta proporcionalment segons el nombre de canals iònics oberts a la membrana.

La constant de temps de la membrana (τ_m)

Aquest paràmetre descriu la velocitat amb què la cèl·lula canvia el voltatge de membrana en resposta als corrents que circulen a través de la seva membrana. Matemàticament, la constant de temps de membrana, es defineix com el producte de la resistència de membrana, R_m , per la capacitat de la membrana, C_m . Així podem expressar la constant de temps de la membrana de la següent manera (Rall. 1969, Rall. 1977, Okada. 2012):

$$\tau_m = R_m \cdot C_m \quad (2.1)$$

Si dues cèl·lules tenen la mateixa resistència, la més gran, amb major capacitat, tindrà una constant de temps de membrana més lenta.

Components elèctrics de la pipeta

Els elements elèctrics que caracteritzen la pipeta són:

La resistència d'accés (R_a)

És la resistència causada per la petita punta oberta d'entrada de la micropipeta. Si s'obstrueix la punta de la pipeta, la resistència augmenta. Aquesta resistència és de l'ordre dels $M\Omega$ (Neher and Marty. 1995). Sovint també se sol afegir en sèrie a R_a una font de voltatge que modelitza el voltatge de desplaçament (*offset*) introduït per l'unió elèctrode-cèl·lula (Neher. 1992, Neher. 1995). Aquesta resistència d'accés es troba compresa entre $10 M\Omega$ i $100 M\Omega$ (Major et al. 1994, Major and Evans. 1994, Li et al. 2004).

La resistència de segellat (R_{seal})

És la resistència formada pel segellat entre la superfície de la cèl·lula i la pipeta de vidre. Idealment, es busquen resistències de segellat elevades en el rang dels gigaOhms ($G\Omega$).

La capacitat de la pipeta (C_p)

És la capacitat de la paret del vidre de la micropipeta que actua com un condensador polaritzat (Major. 1993).

La resistència de la pipeta (R_p).

És la resistència entre l'amplificador i la punta de la micropipeta. Aquesta resistència es deu a la resistència de la solució salina de l'interior de micropipeta (Hamill et al. 1981). Sol tenir valors tan baixos que és comú depreciar-la. Addicionalment, de forma similar a la membrana, també es defineix la constant de temps de la pipeta (τ_p) que relaciona la resistència d'accés, R_a , i la capacitat de la pipeta, C_p .

La constant de temps de la pipeta (τ_p)

Describeix la velocitat amb què la cèl·lula canvia el voltatge de membrana en resposta als corrents lliurats a través de la pipeta. Matemàticament, la constant de temps de la pipeta, es defineix com el producte de la resistència d'accés, R_a , per la capacitat de la pipeta, C_p . Així podem expressar la constant de temps de la pipeta com;

$$\tau_p = R_a \cdot C_p \quad (2.2)$$

Aquesta constant de temps de la pipeta sol ser molt menor que la constant de temps de la membrana.

Resistència sèrie (R_s)

També es defineix la resistència sèrie, R_s , com la suma de totes les resistències de la pipeta, per tant, la suma de les resistències no biològiques: R_a , R_p i R_{seal} . La resistència d'accés, R_a , és la que contribueix més a la resistència sèrie. Una resistència sèrie elevada és dolenta per dos motius: actua com a filtre passa-baix (*low-pass filter*) i també actua com a divisor de tensió en sèrie amb resistència a la membrana, R_m , resultant en un error de tensió en estat estacionari.

En un intent de fer el model el més realista possible, s'ha prestat especial atenció al modelatge dels artefactes fisiològics i els introduïts per la pipeta de mesura. Hi ha cinc artefactes experimentals (*experimental artefacts*) no desitjats en un experiment de pinçament de voltatge (*voltatge-clamp*): **(1)** La capacitat de la pipeta, C_p , degut a la paret de la micropipeta que introdueix una capacitat paràsita (Major. 1993, Lei. et al. 2020). **(2)** La capacitat de la membrana cel·lular, C_m , que actua com a condensador en paral·lel als corrents iònics. **(3)** La resistència sèrie, R_s , que indueix un desajust entre la tensió de la membrana, v_m , i la tensió de comandament v_c , provocant un canvi en les relacions

mesurades entre corrent i tensió (Marty and Neher. 1995 , Sherman et al. 1999, Lei. et al. 2020). (4) La resistència d'accés, R_a , que introdueix un desplaçament de tensió (*voltage offset*) entre pipeta i la cèl·lula (Neher. 1995, Lei. et al. 2020). (5) La resistència de segellat, R_{seal} , que pot provocar un corrent de fuga (*leak current*) a través del segellat pipeta-cèl·lula (*pipette-cell seal*) que contamina l'enregistrament del corrent iònic (Lei. et al. 2020).

Components elèctrics de l'amplificador

Les variables elèctriques que caracteritzen l'amplificador són:

Voltatge de control (v_c)

És el voltatge de control del sistema de pinçament de membrana. És la tensió on volem fer arribar el voltatge de membrana, V_m .

Voltatge de sortida de l'amplificador (v_o)

Es el voltatge a la sortida de l'amplificador operacional.

Resistència de realimentació (R_f)

Es la resistència que tanca el llaç de retroalimentació negativa de l'amplificador operacional. Com més gran sigui la resistència, més es reduirà el soroll a la sortida de l'amplificador, però també el voltatge de sortida serà menor. Per experiments d'un sol canal iònic (*outside-out*, *outside-in*) s'utilitzen resistències grans ($>1 \text{ G}\Omega$), mentre que els registres de cèl·lula completa (*whole-cell*) s'utilitzen resistències inferiors ($<1 \text{ G}\Omega$).

Capacitat de realimentació o shunt (C_f)

Es la capacitat que tanca el llaç de retroalimentació negativa de l'amplificador operacional. El condensador de realimentació, C_f , forma, conjuntament amb resistència de realimentació, R_f , un filtre passa-baix per evitar oscil·lacions de la tensió a la sortida de l'amplificador.

Corrent d'estimulació i_o

El corrent d'estimulació o *clamp current*, és corrent que entra a la pipeta. S'obté primer mesurant amb un convertidor analògic-digital la tensió de sortida de l'amplificador, v_o , i després es calcula per aplicació de llei d'Ohm;

$$i_o = \frac{v_o}{R_f} \quad (2.3)$$

On

i_o és el corrent de clamp.

v_o és el voltage de sortida a l'amplificador operacional.

R_f és la resistència de relimentació (*feedback*).

Mitjançant el software de simulació de circuits LTspice ([Analog Devices Inc, Massachusetts, Estats Units](#)) es comença realitzant una simulació ideal (veure Fig. 2.17).

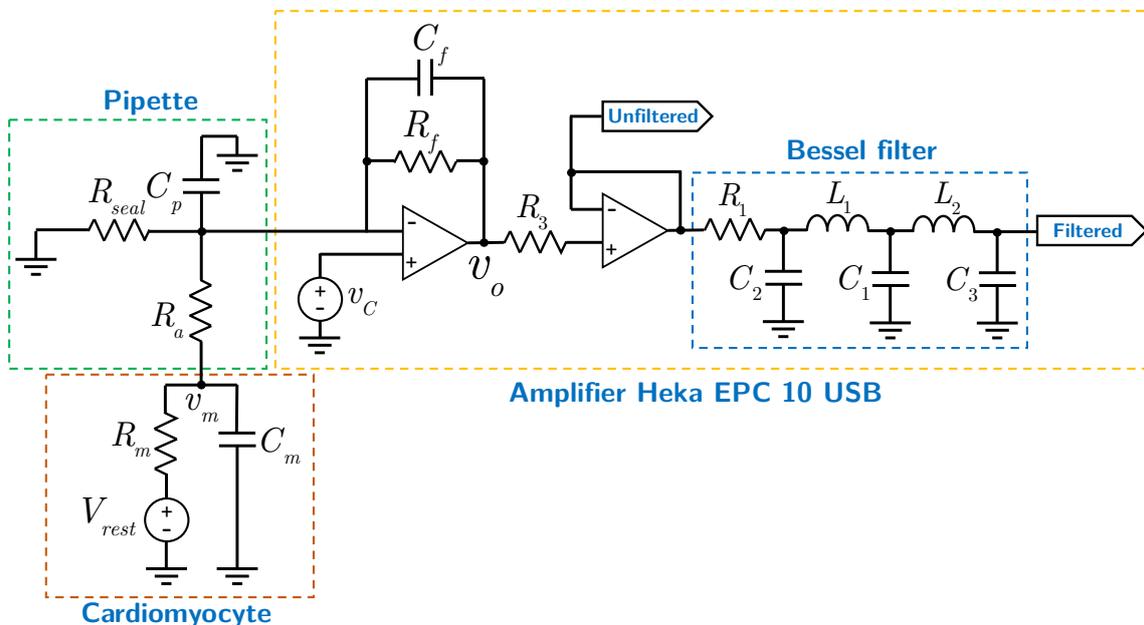


Fig. 2.17. Circuit per la simulació numèrica del sistema de pinçament de membrana.

L'amplificador Heka model EPC 10 USB ([Heka Elektronik GmbH, Ludwigshafen Rhein, Germany](#)) (veure Fig. 2.18), també disposa de dos filtres de corrent amb paràmetres seleccionables (filtre 1 i filtre 2). El filtre 1 és un filtre passa-banda de Bessel d'ordre 5, $n=5$, i el filtre 2 és un filtre passa-baix d'ordre 4, $n=4$, amb tipologia seleccionables de Bessel o Butterworth. El filtre 1 es pot utilitzar en sèrie amb el filtre 2 o com a filtres separats. A més, el sistema Heka disposa d'un convertidor analògic digital amb una freqüència màxima de mostreig, $F_{s \max}$, de 200 kHz quan s'utilitzen dos canals i 50 kHz quan s'utilitzen 8 canals.



Fig. 2.18. Dispositiu de pinçament de membrana Heka EPC 10 USB ([Heka Elektronik GmbH, Alemanya](#)).

Per a simular de forma més realista el sistema Heka EPC 10 USB, s'ha afegit a la sortida de l'amplificador operacional un altre amplificador amb guany unitari seguit d'un filtre passa-baix de Bessel d'ordre 5, $n=5$, i freqüència de tall de 2 kHz (veure Fig. 2.19).

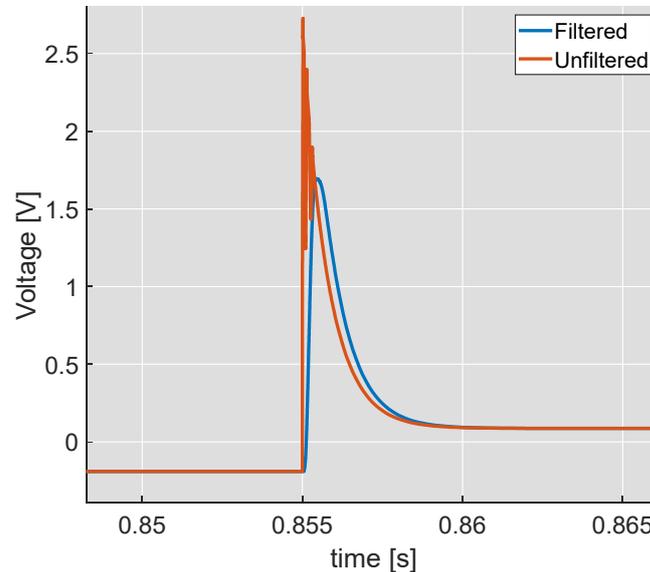


Fig. 2.19. Efecte del voltatge a la sortida de l'amplificador operacional després de passar pel filtre passa-baix de Bessel d'ordre 5, $n=5$, i freqüència de tall de 2 kHz.

La funció d'aquest filtre és reduir les oscil·lacions de la sortida de l'amplificador. A la Fig. 2.6 es pot observar l'efecte del filtre, s'observa la resposta temporal del circuit per a diferents variables. Es mostra el corrent d'excitació del cardiomiòcit (color blau), la tensió de comandament (color magenta) i la tensió a la membrana del cardiomiòcit (color taronja). La simulació ens permet predir com afecten a l'experiment de pinçament de membrana els diferents paràmetres del cardiomiòcit, així com al conjunt del *hardware*: pipeta i amplificador. Per a la configuració de cèl·lula completa (*whole-cell*) s'ha utilitzat el sistema d'amplificació i control del fabricant Heka model EPC 10 USB (Heka Elektronik GmbH, Ludwigshafen Rhein, Germany). L'amplificador Heka disposa de tres resistències de retroalimentació, R_f , que són seleccionables; *Low gain range* (5 M Ω), *Medium gain range* (500 M Ω) i *High gain range* (50 G Ω). En el nostre cas hem seleccionat la el rang mig (*Medium gain range*) que s'utilitza principalment per a enregistraments de cèl·lules senceres (*whole-cell recordings*).

A continuació, es resumeix en format taula (Taula. 2.6) els valors utilitzats en la simulació. Els paràmetres del model elèctric s'han ajustat per coincidir amb els paràmetres mesurats experimentalment o obtinguts a través de la literatura. El circuit elèctric s'ha implementat i simulat mitjançant el programari LTspice

(Analog Devices Inc, Massachusetts, Estats Units). Aquesta simulació és útil per validar el nostre sistema, però també ens permet predir com afecten els diferents paràmetres elèctrics del cardiomiòcit en l'experiment de patch-clamp, així com la configuració dels paràmetres físics del maquinari: pipeta i amplificador.

Part	Component	Valor nominal	Referències
Cardiomiòcit	Capacitat membrana (C_m)	55 pF	Mesured
	Resistència membrana (R_m)	500 $M\Omega$	(Zaniboni et al. 2005)
	Voltatge de repòs (v_m)	-90 mV	
Amplificador	Resistència d'accés (R_a)	15 $M\Omega$	(Golowasch et al. 2009) (Major. 1994) (Li et al. 2004)
	Resistència segellat (R_s)	1 $G\Omega$	(Weerakoon et al. 2009)
	Capacitat realimentació (C_f)	0 F	
	Voltatge de control (v_c)	0 a -80 mV	
	Resistència pipeta (R_p)	0 Ω	
Pipeta	Resistència realimentació (R_f)	500 $M\Omega$	(Gillis. 1995)
	Capacitat pipeta (C_p)	0 F	
	Resistència 3 ($R3$)	1 $M\Omega$	
Filtre	Resistència 1 ($R1$)	50 Ω	
	Inductància 1 ($L1$)	2 mH	
	Inductància 2 ($L2$)	4,3 mH	
	Capacitat 1 ($C1$)	1,3 μF	
	Capacitat 2 ($C2$)	270 nF	
	Capacitat 3 ($C3$)	3,6 μF	

Taula 2.6. Valors del components de la simulació del sistema de pinçament de membrana.

Cal tenir en compte que la capacitat de la pipeta, C_p , i la resistència de la pipeta, R_p , formen un filtre passa-baix que retarda la mesura del voltatge de membrana, V_m . De la mateixa manera, R_a i C_m formen un filtre de passa-baix que retarda la capacitat del sistema per poder fer canviar ràpidament el voltatge de la membrana. Finalment, R_a i R_m formen un divisor de tensió, que fa que l'amplificador cregui que el voltatge de la membrana és una mica més proper al voltatge de control (v_c) del que realment és. En els equips comercials aquests problemes es redueixen mitjançant la compensació de la capacitat paràsitica i la compensació de la resistència sèrie. En els pròxims experiments no es compensa la resistència sèrie, R_s , ni la capacitat paràsitica.

2.7.2 Validació del model elèctric

La validació del model s'ha centrat en simular sota condicions d'estimulació, la despolarització del senyal del calci, on el potencial de la membrana cel·lular es torna més positiu, i és un pas important en el procés de contracció muscular. Per tal de fer el model més realista, s'ha afegit additivament soroll blanc gaussià (GWN) als senyals simulats. La variància del soroll en els senyals experimentals s'ha deduït mitjançant l'estimador de soroll de desviació absoluta mitjana (MAD) robust (Laligant et al. 2013). En els senyals experimentals s'ha obtingut un valor de variància del soroll mitjà de $var_{noise}=188$.

La següent figura detallada mostra com el voltatge i el corrent del cardiomiòcit canvien amb el temps en resposta al pols de despolarització simulat mitjançant el model elèctric de l'experiment de pinça de pegat (veure Fig. 2.20).

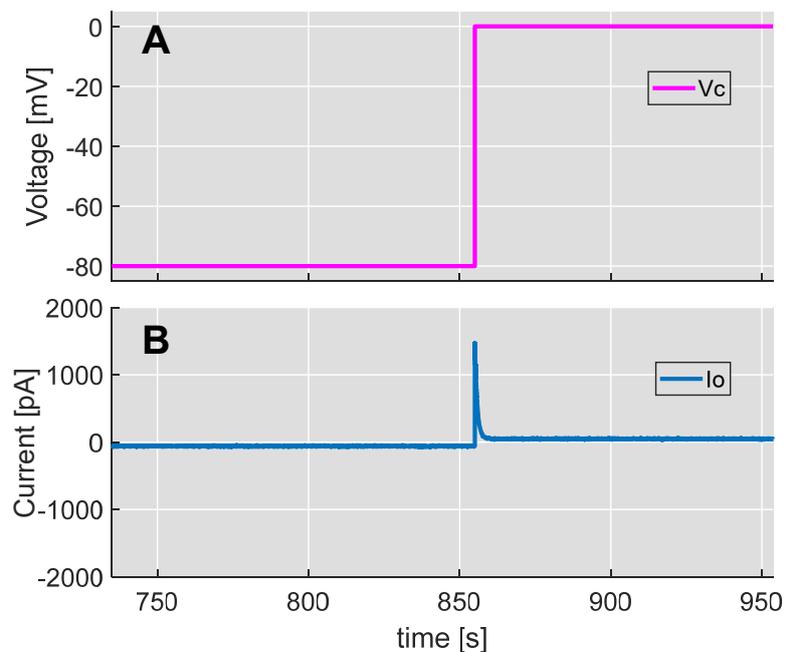


Fig. 2.20. A. Senyals temporals del voltatge de control. B. El corrent de la membrana obtingudes per simulació numèrica del circuit elèctric del model de pinçament de membrana de cèl·lula completa.

La validació del model elèctric s'ha evaluat a diferents nivells:

1. Validar la resposta de model elèctric versus els senyals experimentals.
2. Validar la viabilitat d'estimació dels paràmetres elèctrics.

2.7.2.1 Validació del model electric versus el experimental.

La precisió del model s'ha comparat calculant l'Error Absolut Mitjà (MAE) entre el senyal actual simulat numèricament i el senyal experimental, de la següent manera:

$$MAE = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N |\tilde{y} - y| \quad (2.4)$$

On

N és el nombre de mostres, \tilde{y} titlla i y són el senyal simulat i experimental, respectivament.

A més, s'ha calculat la correlació creuada normalitzada ($xCorr$) com a índex d'addició per avaluar la qualitat del model de la manera següent:

$$xCorr = \frac{\sum_{i=1}^N (\tilde{y}_i - \mu(\tilde{y})) \cdot (y_i - \mu(y))}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (\tilde{y}_i - \mu(\tilde{y}))^2 \cdot \sum_{i=1}^N (y_i - \mu(y))^2}} \quad (2.5)$$

Per a cada senyal experimental no patològic (senyal uniforme, $N=13$), s'ha obtingut una senyal simulada i sha comparat amb un senyal experimental utilitzant l'índex MAE. Els índexs MAE i Xcorr mostren una gran similitud entre el model sintètic i les dades experimentals, cosa que significa que el model de silici (*in-silico*) és capaç d'imitar la resposta del senyal no patològic (Vegeu Taula 2.7).

MAE	xCorr
1.8372	0.8925

Taula 2.7. Validació de la precisió de les dades generades amb el model sintètic comparat amb les dades experimentals.

2.7.2.2 Validació de l'estimació de paràmetres elèctrics

En aquest apartat es presenta la capacitat d'estimar els paràmetres elèctrics del circuit a partir de la seva resposta (*Face-validity*). La resposta del corrent de membrana del model elèctric, $i_o(t)$, s'ha utilitzat per ajustar les estimacions dels paràmetres del model del cardiomiòcit. En la majoria de tècniques d'estimació de paràmetres de pinçament de membrana, s'utilitza el corrent de sortida de

l'amplificador de pinçament de membrana per a realitzar l'estimació dels paràmetres. En la següent Fig. 2.21 es presenta un esquema d'estimació de paràmetres elèctrics mitjançant el model de pinçament de membrana (veure Fig. 2.17).

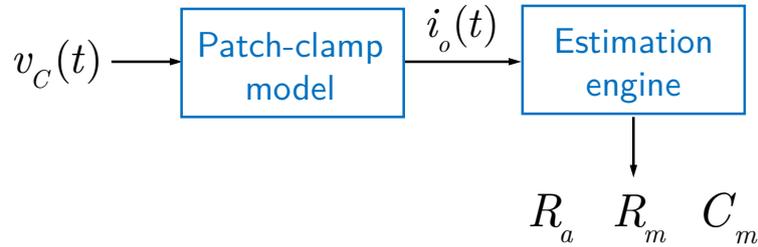


Fig. 2.21. Estimació de paràmetres elèctrics a partir de registres experimentals de pinçament de membrana.

El circuit ha estat simulat amb el *software* LTIsipice ([Analog devices, Norwood, Massachusetts, Estats Units](#)). El simulador genera els resultats a una freqüència no regular, per tant, s'han interpolat els resultats de la simulació per obtenir punts a intervals regulars.

A continuació s'exposaran les equacions que ens permetran estimar els paràmetres elèctrics del model a partir de les dades experimentals.

Quan s'estimula l'experiment amb un voltatge de control, es produeix un transitori de corrent de membrana que arriba fins un estat estacionari ([Gillis. 1995, Okada. 2012](#)). Aquest transitori es pot aproximar a una equació exponencial de la forma;

$$i_o(t) = I_d \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} + I_{ss} \quad (2.6)$$

On

I_o és el corrent de resposta (*patch-current*).

I_d és el corrent transitori màxim.

I_{ss} és l'estat estacionari.

τ és la constant de temps del transitori.

El corrent transitori màxim, I_d , és defineix com;

$$I_d = I_{peak} - I_{prev} \quad (2.7)$$

On

I_{peak} és el corrent de pic.

I_{prev} és el corrent inicial.

Immediatament després d'aplicar el voltatge de control, la impedància del condensador de la membrana, C_m , s'aproxima a zero. Per tant, el corrent transitori màxim es pot calcular per aplicació de la llei d'Ohm;

$$I_d = \frac{\Delta V}{R_a} \quad (2.8)$$

On

ΔV és el graó del voltatge de control

R_a és la resistència d'accés

A l'arribar a l'estat estacionari, el condensador de la membrana, C_m , es troba completament carregat i no consumeix corrent. Per tant, la impedància global és ara, la combinació en sèrie de R_a i R_m . Per tant, per aplicació de la llei d'Ohm, el corrent en l'estat estacionari es pot calcular com ([Okada. 2012](#));

$$I_{SS} = \frac{\Delta V}{R_a + R_m} \quad (2.9)$$

la capacitat de la membrana, C_m , es pot estimar calculant a partir de la constant de temps.

$$C_m = \frac{\tau}{R} \quad (2.10)$$

Aquest mètode de mesurament de la capacitat de membrana, C_m , està implementat als programes dels equips comercials de pinçament de membrana de les empreses Axon ([Sunnyvale, Estats Units](#)) i HEKA ([Heka Elektronik GmbH, Alemanya](#)).

La resistència en paral·lel, R , es pot obtenir calculant la resistència equivalent de R_a en paral·lel amb R_m ([Okada. 2012](#));

$$R = \frac{R_a \cdot R_m}{R_a + R_m} \quad (2.11)$$

La constant de temps, τ , s'obté ajustant un model exponencial al transitori de corrent.

Alternativament, la capacitat de la membrana, C_m , també es pot estimar calculant la càrrega del transitori de corrent, Q , que és l'àrea sota la corba i

dividint-ho per l'increment de voltatge (Armstrong and Gilly, 1992, Zaniboni et al. 2005, Golowasch et al. 2009).

$$C_m = \frac{Q}{\Delta V} \quad (2.12)$$

On

Q és carrega de transitori
 ΔV és el graó del voltage de control

Aquest mètode s'utilitza històricament, ja que és més senzill i ràpid que el mètode descrit anteriorment perquè no requereix un ajustament de corba per a poder determinar el valor de la constant de temps, τ .

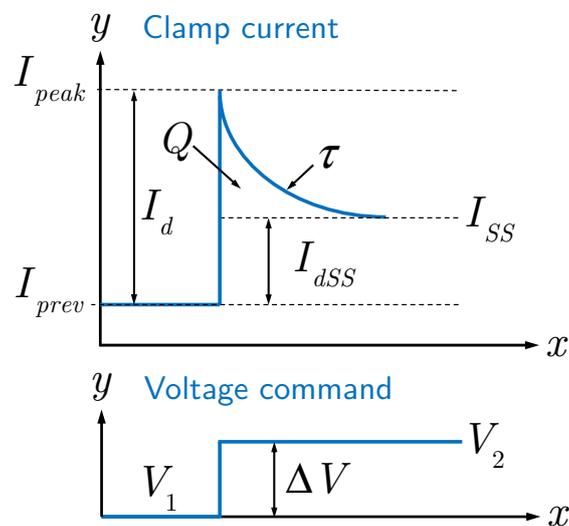


Fig. 2.22. Paràmetres cinètics del transitori de corrent.

A continuació s'implementa un model més simple per a poder estimar els paràmetres del model elèctric de la cèl·lula a partir de dades simulades sense compensar. Donat que a partir de dades experimentals no es coneixen les propietats elèctriques exactes de la membrana de cardiomiòcit i, per tant, no es pot validar el model i el sistema d'estimació de paràmetres, fa falta dissenyar un model computacional, model elèctric, que descriu el comportament de la membrana cel·lular i la micropipeta. Es parteix del model elèctric complet de pinçament de membrana en configuració de cèl·lula completa sense la part del amplificador (veure Fig. 2.17), i s'apliquen les següents simplificacions: elecció de la resistència d'accés, R_a , la capacitat de la membrana, C_m , i la resistència de membrana, R_m .

Es desprecia la resistència del segellat, R_s , la capacitat de la pipeta C_p , i el filtratge del dispositiu de pinçament de membrana amb el condensador de realimentació, C_f . (veure Fig. 2.23).

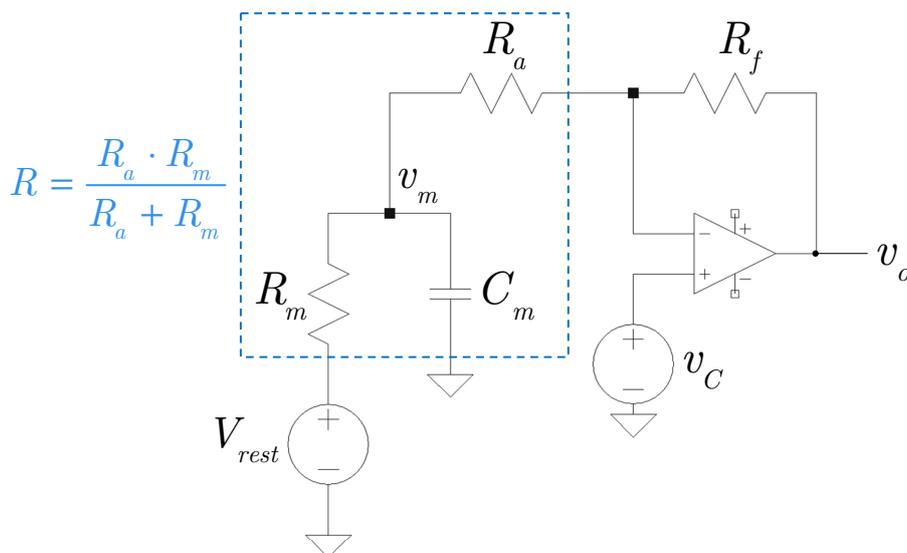


Fig. 2.23. Circuit simplificat per a la simulació numèrica del sistema de pinçament de membrana amb configuració de cèl·lula completa (*whole-cell*).

A la [Taula 2.8](#) es representa el valor nominal dels components del model circuital i el seu valor estimat.

Part	Component	Valor model	Valor estimat	Error relatiu ϵ (%)
Cardiomiòcit	C_m	55 pF	58,4 pF	6%
			56,7 pF (AUC)	3%
Amplificador	R_m	500 M Ω	485,7 M Ω	2,8%
	R_a	15 M Ω	14,5 M Ω	3%

Taula 2.8. Valors estimats a partir del model de circuit simplificat del sistema de pinçament de membrana i les equacions de govern del model.

Els paràmetres es poden obtenir ajustant les dades experimentals o simulades a unes equacions deduïdes del circuit elèctric que modelitza la cèl·lula i l'experiment de pinçament de membrana ([Jackson. 1992](#), [Jackson. 1993](#), [Llano et al. 1991](#), [Major et al. 1993](#), [Rall et al. 1992](#)).

Per a la modelització elèctrica de la membrana amb un circuit RC , s'ha fet les següents suposicions d'acord amb ([Rall. 1977](#), [Rall. 1954](#)):

1. La membrana cel·lular és passiva, les seves propietats elèctriques es descriuen només mitjançant la resistència de membrana, R_m , i la capacitat de membrana, C_m i es consideren uniformes al llarg de tota la morfologia de la membrana del cardiomiòcit.
2. No hi ha acumulació de ions als dos costats de la membrana.

3. El medi extracel·lular és isopotencial.

Els paràmetres que descriuen el comportament del transitori del corrent de la membrana cel·lular són; la resistència d'accés, R_a , la resistència membrana, R_m , i la capacitat membrana, C_m . Així, per a poder estimar aquests paràmetres s'ha utilitzat el model de circuit simplificat del sistema de pinçament de membrana amb configuració de cèl·lula completa (Fig. 2.23). El voltatge de control (v_c) s'ha fixat a un pols de -65 a 75 mV .

Es pot observar com el model d'estimació de la capacitat de membrana a partir de l'àrea sota la corba (AUC) és més precís que a partir de l'ajust de la constant de temps, τ .

2.8 Mètode computacional per l'anàlisi de les corrents iòniques

La plataforma per l'anàlisi de la resposta iònica per ordinador, ofereix una solució completa d'inici a fi: des de carregar les dades amb el format propi del l'amplificador de pinçament de membrana, passant per processar les dades i extreure les mesures i, fins a calcular l'estadística de les mesures i emmagatzemar totes les dades generades. A continuació es descriuen els mètodes d'ordinador (*software*) que s'han programat per l'anàlisi de registres de pinçament de membrana (*patch clamp*) amb configuració de cèl·lula completa (*whole-cell*) per el cas d'un un voltatge d'estimulació fix i un voltatge d'estimulació variable.

2.8.1 Processat dels corrents iònics

En aquest apartat es presenta el processat del corrents ionivis previ a l'extracció de les seves caracteríques, pel cas de voltatge d'estimulació fix i un voltatge d'estimulació variable.

2.8.1.1 Processat per a un voltatge d'estimulació fix

En la [Fig. 2.24](#) es representen les diferents etapes de procesat d'un registre de un experiment de pinçament de membrana amb voltatge d'estimulació fix. A continuació es descriuen de forma detalla cada una de les etapes del processat d'un experiment de pinçament de membrana amb voltatge d'estimulació fix.

Càrrega de les dades

El sistema de pinçament de membrana adquireix les dades dels experiments i les guarda en un fitxer amb extensió *.asc*. Els Fitxers *.asc* són fitxers codificats amb ASCII de 7 bits (ASCII, *American Standard Code for Information Interchange*). El primer pas consisteix a definir la carpeta o directori on es guarden els fitxers *.asc* que s'han de processar. Un cop s'inicia el programa, aquest comença a buscar tots els fitxers amb extensió *.asc* dins la carpeta indicada i els va carregant de forma seqüencial al programa principal, tot descodificant la informació continguda a cada fitxer *.asc* per tal d'obtenir el voltatge d'estimulació i el corrent de membrana. El voltatge d'estimulació i el corrent d'estimulació es registren en volts (*V*) i microampers (*mA*), respectivament. Durant la càrrega dels fitxers es converteix també el voltatge d'estimulació a milivolts (*mV*) i el corrent d'estimulació a picoampers (*pA*), donat que és l'escala típica de representació dels registres d'electrofisiologia en la literatura.

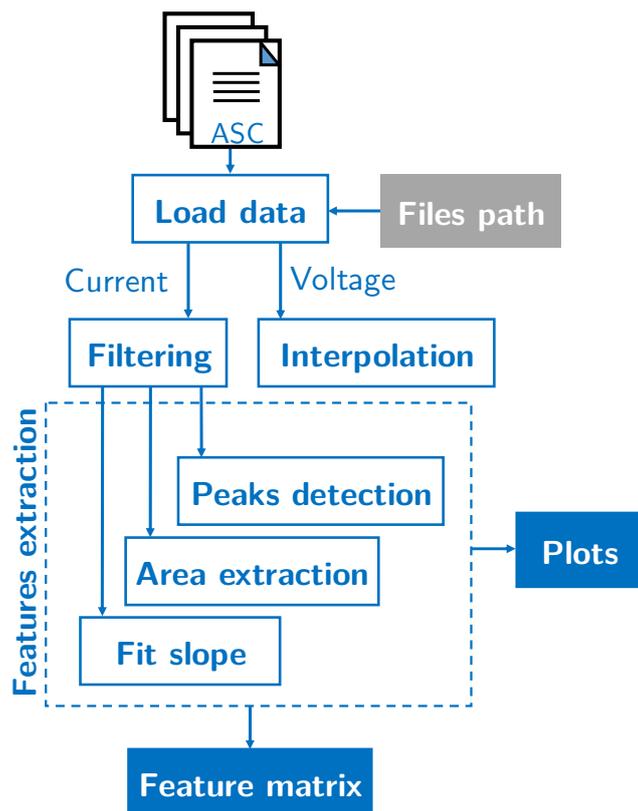


Fig. 2.24. Diagrama de blocs del sistema computacional de caracterització de senyals experimentals de pinçament de membrana per a un voltatge d'estimulació fix.

Filtratge

S'ha implementat un filtratge basat en la transformada Wavelet discreta (*Discrete Wavelet Transform, DWT*). Així, donat un senyal discret $s(n)$ de longitud N_{DWT} , en el càlcul de la DWT s'obtenen dos conjunts de coeficients: els coeficients d'aproximació (A) quan es filtra el senyal amb un filtre passa-baix (LP) i els coeficients de detall (D) quan es filtra el senyal amb un filtre passa-alt (HP), (Donoho. 1993, Donoho. 1994). Ambdós filtres venen seguits d'una estapa de submostreig (*downsampling*) per a conservar la longitud del senyal original, $s(n)$. Aquest esquema es va repetint de forma successiva fins a N nivells (Veure Fig. 2.25).

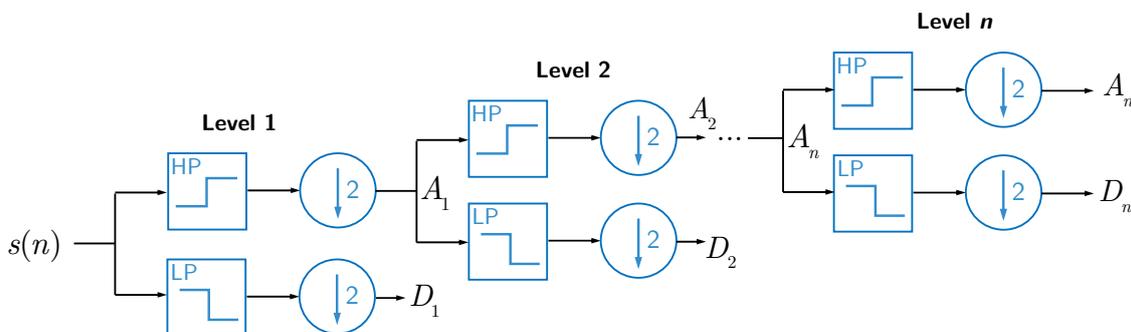


Fig. 2.25. Descomposició de la transformada wavelet discreta (*DWT*) en N nivells.

La reconstrucció del senyal es realitza a partir de la transformada Wavelet discreta inversa (*Inverse Discrete Wavelet Transform, iDWT*), que consisteix en realitzar l'esquema de descomposició però de forma inversa. Si per tal de realitzar una reconstrucció perfecta hauríem d'utilitzar tots els coeficients (Mallat. 1989, Meyer. 1995), la idea de filtratge d'ondetes per eliminar el soroll d'un senyal (*wavelet denoising*) recau en que a una certa escala, els coeficients de detall contenen majoritàriament soroll i es poden eliminar o reduir a zero mitjançant un llindar abans de realitzar la reconstrucció del senyal. En el nostre cas suposem que el nostre senyal té la forma següent:

$$s(n) = f(n) + \sigma \cdot e(n) \quad n = 1, 2, \dots, N \quad (2.13)$$

On

$s(n)$ és el senyal discret amb soroll.

$f(n)$ és el senyal discret sense soroll.

$e(n)$ és soroll blanc gaussià $\sim N(0,1)$.

σ és el nivell de soroll.

L'objectiu de qualsevol algoritme d'eliminació de soroll és suprimir la part de soroll del senyal $s(n)$ i recuperar $f(n)$. En els enfocaments clàssics d'eliminació de soroll s'utilitza la transformada ràpida de Fourier (FFT) per detectar les freqüències associades al soroll i s'eliminen mitjançant filtratge freqüencial per aplicació del Teorema de Convulsió, es a dir, es multiplica la transformada de Fourier del senyal amb la transformada de Fourier del filtre. Aquesta estratègia d'eliminació de soroll utilitzant la FFT és conceptualment clara i computacionalment eficient, ja que només depèn del càlcul de la FFT del senyal. Tanmateix, aquest sistema pot fallar quan el senyal original té informació important associada a la mateixa freqüència que el soroll, llavors filtrar aquesta freqüència induirà una pèrdua notable d'informació del senyal. Així en aquests casos on les freqüències del senyal d'interès i el soroll es solapen, l'enfocament d'eliminació del soroll amb ondetes (*wavelet denoising*) és més adequat perquè el senyal s'estudiarà mitjançant una representació temps-freqüència dual, que permet separar fàcilment les freqüències degudes al soroll i les freqüències del senyal (Cai. 2002).

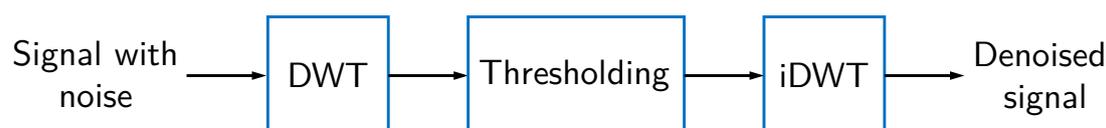


Fig. 2.26. Diagrama de blocs del passapassatge del soroll amb ondetes.

El procediment d'eliminació del soroll amb la ondetes (*wavelet denoising*) el podem resumir amb els següents passos: 1. Descomposició, 2. Aplicació del llindar (*Thresholding*) i reconstrucció. La Fig.2.26 resumeix de forma gràfica els passos necessaris per a realitzar el filtratge del soroll amb ondetes.

A continuació explicarem de forma detallada els passos del filtrat amb ondetes (*wavelet denoising*) i l'elecció dels paràmetres emprats pel filtratge del nostre senyal:

a) Descomposició.

Es calcula la descomposició wavelet aplicant la transformada Wavelet discreta (DWT). Per fer-ho, s'ha de seleccionar la família de wavelet que els vol utilitzar i el nivell de descomposició, N_{DWT} . En el nostre cas s'ha utilitzat la família de wavelets *symlet* amb l'onadeta (*wavelet*) *sym8*. Els *symlets* són ondetes (*wavelets*) gairebé simètriques proposades per Daubechies (Daubechies. 1992). El nivell de descomposició seleccionat ha estat de $N=6$ nivells.

b) Aplicació del llindar (*Thresholding*)

Per a cada nivell d'1 a N_{DWT} , es selecciona un llindar i una funció de llindar que s'aplica als coeficients de detall.

Els mètodes de selecció del llindar, es poden classificar en dos grups: llindars globals i llindars dependents del nivell. El llindar global implica la selecció d'un valor de llindar, λ_{DWT} , per a tots els coeficients wavelet. Mentre que Els llindars dependents del nivell s'aplica un valor de llindar diferent, λ_i , per a cada nivell de resolució. Tots els mètodes de selecció del llindar requereixen d'una estimació del nivell de soroll, σ . Per estimar el soroll de manera robusta hem utilitzat la desviació absoluta mitjana (*Median Absolute Deviation, MAD*). El MAD permet estimar la variança d'una forma més robusta a valors extrems que la variança mostral (Rousseeuw and Croux. 1993). En el nostre cas s'ha utilitzat el llindar universal proposat per Donoho (Donoho. 1995), es tracta d'un llindar global i es defineix com;

$$\lambda_{\text{DWT}} = \sqrt{2 \cdot \ln(N)} \cdot \sigma(x) \quad (2.14)$$

Un cop definit el llindar, ens queda definir la funció del llindar. Existeixen dos funcions de llindar: la funció de llindar dur (*Hard*) i la funció de llindar suau (*Soft*).

La funció de llindar dur (*Hard*) es posen a zero els elements els quals els seu valor absolut és inferior al llindar i es descriu amb la següent funció:

$$\delta_H(x, \lambda_{\text{DWT}}) = \begin{cases} x & |x| > \lambda_{\text{DWT}} \\ 0 & |x| \leq \lambda_{\text{DWT}} \end{cases} \quad (2.15)$$

On

x són els coeficients discrets de la DWT.

λ és el llindar.

El nostre cas s'ha utilitzat el llindar universal i la funció de llindar suau (*Soft*). Com es pot veure a la Fig. 2.27, el llindar dur crea discontinuïtats a $x = \pm t$, mentre que el procediment suau no.

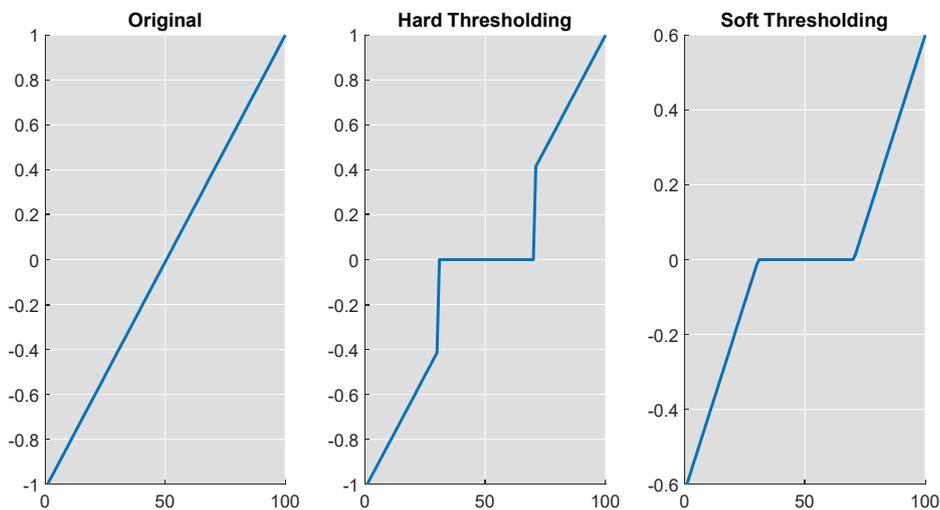


Fig. 2.27. Exemple d'aplicació del llindar dur (*Hard*) i llindar suau (*Soft*) amb un senyal lineal de $N=100$ punts.

La funció de llindar suau (*Soft*) és una extensió del llindar dur, on primer es posen a zero els elements els quals els seu valor absolut és inferior al llindar, i després es redueixen els coeficients diferents de zero cap a zero (*shrinking*). Es descriu amb la següent funció:

$$\delta_S(x, \lambda_{\text{DWT}}) = \begin{cases} \text{sign}(x) \cdot (x - \lambda_{\text{DWT}}) & x > \lambda_{\text{DWT}} \\ 0 & |x| \leq \lambda_{\text{DWT}} \end{cases} \quad (2.16)$$

On

x són els coeficients discrets de la DWT.

λ és el llindar.

c) Reconstrucció.

Per aplicació de la de la transformada Wavelet discreta inversa (iDWT), es calcula la reconstrucció basant-se en els coeficients d'aproximació (A) originals del nivell N i els coeficients de detall (D) modificats dels nivells d'1 a N . S'ha utilitzat la família de wavelets *sym8* amb un llindar tou (*soft*). En la Fig. 2.28 es mostra una senyal de corrent sorollosa de l'experiment de patch clamp i l'efecte del fitratge amb la tècnica de fitratge amb ondetes (*wavelet denoising*). Els coeficients en vermell s'utilitzen per reconstruir el senyal de soroll.

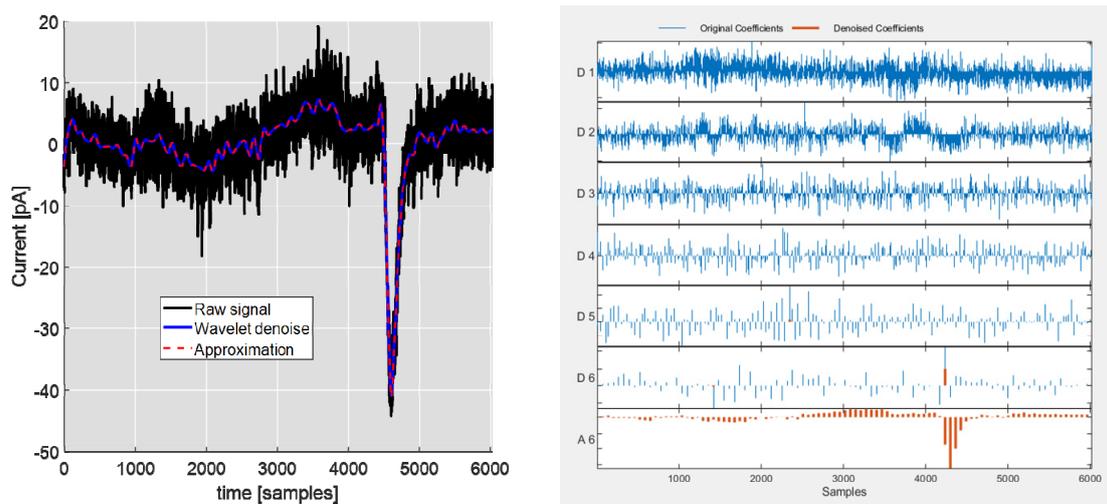


Fig. 2.28. Filtratge amb ondetes amb llindar universal, funció de llindar suau (*Soft*) i descomposició de $N=6$ nivells amb l'onadeta. **A.** Senyal original i senyal filtrada. **B.** Coeficients waelet de detall (D) i d'aproximació (A).

Interpolació

El senyal d'estimulació registrat difereix del senyal d'estimulació real degut a petites oscil·lacions de canvi de potencial produïdes pel soroll elèctric. Per això, s'extrapolen els valors registrats del voltatge d'estimulació real amb els valors teòrics del voltatge d'estimulació constant i fixe ($-80mV$), per tal d'obtenir un senyal el més semblant possible al senyal ideal. L'extrapolació es realitza pel mètode dels veïns més pròxims (*Nearest neighbor extrapolation*) (Akima. 1970, Akima. 1974), on el valor extrapolat en un punt és el valor més pròxim als valors d'una taula objectiu, V_{target} , de $-80mV$. Es tracta doncs d'un mètode de cerca per taules (LUT, *look-up table*).

Detecció de peaks

El detector de pics detecta l'amplitud del senyal del pics d'entrada de calci espontanis (I_{TI}). El detector de pics troba els màxims locals del señal buscant els

punts que siguin més grans que els dos punts adjacents, mentre s'apliquen un filtre d'amplitud per descartar els pics més petit que un determinat llindar.

Extracció de l'àrea

El valor de l'àrea sota la corba del corrent transitori espontani, I_{Tr} , s'utilitza com a mesura de la quantitat total de Ca^{2+} alliberat per la cèl·lula a través de del intercambiador sodi-calci Na^+/Ca^{2+} (NCX). El valor de l'àrea s'obté per integració numèrica.

Ajust del pendent

La dinàmica de l'intercanviador de sodi-calci Na^+/Ca^{2+} (NCX), la podem caracteritzar mesurant el pendent resultant de calcular un ajust lineal en la fase d'ascens i descens del corrent transitori d'entrada de calci, I_{Tr} . La velocitat d'activació és el pendent negatiu, mentre que la velocitat d'inactivació és el pendent positiu.

2.8.1.2 Processat per a un voltatge d'estimulació variable

El programa es divideix amb els elements del diagrama de blocs de la Fig. 2.29. El programa principal s'encarrega de cridar cada part del programa. El programa consta inicialment d'una part dedicada a la càrrega de dades (voltatge i corrent) i acondicionament del senyal mitjançant filtrat del senyal de corrent i interpolació del senyal de voltage. Després el programa inclou una etapa dedicada a l'extracció de característiques del senyal de corrent. I finalment, es calcula una matriu on s'agrupen totes les característiques (feature matrix), i també l'estadística descriptiva de les característiques entre els senyals regulars i alternants. Addicionalment també es representen de forma gràfica els resultats.

A continuació es descriu cada un dels elements del programa:

Càrrega de les dades

El sistema de pinçament de membrana adquireix les dades dels experiments i les guarda en un fitxer amb extensió .asc. Els fitxers .asc són fitxers codificats amb ASCII de 7 bits (ASCII, *American Standard Code for Information Interchange*). El primer pas consisteix a definir la carpeta o directori on es guarden els fitxers .asc que s'han de processar. Un cop s'inicia el programa, aquest comença a buscar tots els fitxers amb extensió .asc dins la carpeta indicada i els va carregant de forma seqüencial al programa principal, tot descodificant la informació continguda a cada fitxer .asc per tal d'obtenir el voltatge d'estimulació i el corrent de membrana. El voltatge d'estimulació i el corrent d'estimulació es registren en volts (V) i microampers (mA), respectivament.

Durant la càrrega dels fitxers es converteix també el voltatge d'estimulació a milivolts (mV) i el corrent d'estimulació a picoampers (pA), donat que és l'escala típica de representació dels registres d'electrofisiologia en la literatura.

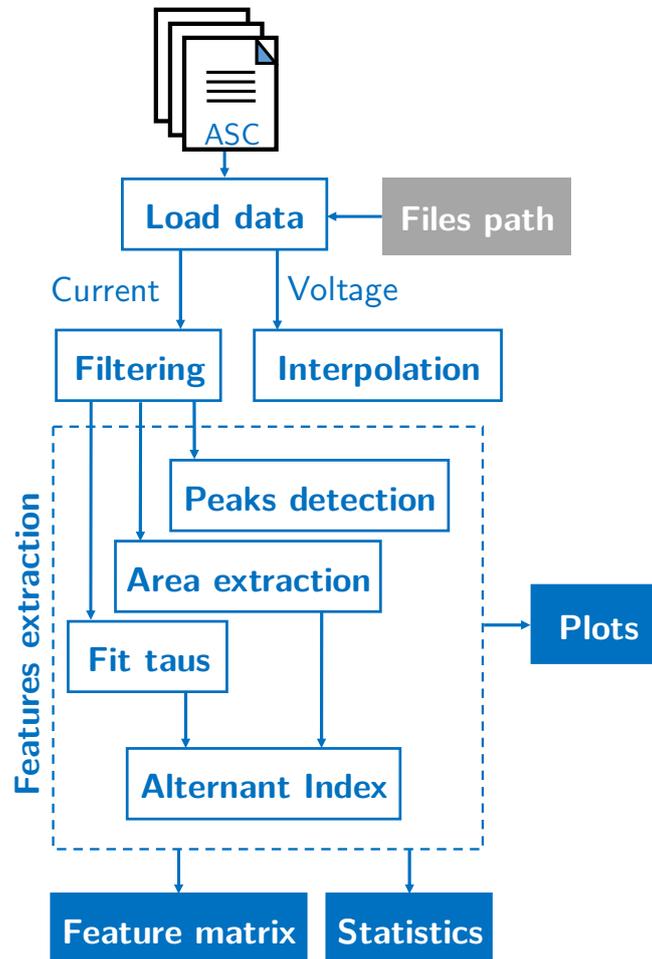


Fig. 2.29. Diagrama de blocs del sistema computacional de caracterització de senyals experimentals de pinçament de membrana per a un voltatge d'estimulació variable.

Filtratge

Un cop obtingut el corrent d'estimulació, aquest es filtra amb un filtre de mitjana mòbil (*moving average*) per tal d'obtenir un senyal suavitzat. El senyal filtrat, $i_{filt}(n)$, s'obté convolucionant el senyal original, $i(n)$, amb una finestra rectangular;

$$i_{filt}(n) = i(n) * W(n, L) \quad (2.17)$$

On

$W(n, L)$ és una finestra rectangular de longitud L .

La longitud de la finestra, L , s'ha calculat amb un mètode heurístic, en funció d'un factor de suavitzat (*smoothing factor*), k . Es calcula una longitud de la

finestra, L , que faci atenuar el $100 \cdot k$ percent de l'energia del corrent d'entrada original, $i(n)$. Quan els valors del factor de suavitzat tendeixen a zero, s'obté una finestra petita i , per tant, l'efecte suavitzador es petit. En canvi quan tendeix a 1, la longitud de la finestra és més gran, degut a l'augment de l'efecte de suavització. En el present cas s'ha utilitzat un valor de $k=0,02$ que equival a una longitud de finestra $L=2$ mostres.

Interpolació

El senyal d'estimulació registrat difereix del senyal d'estimulació real degut a petites oscil·lacions de canvi de potencial produïdes pel soroll elèctric. Per això, s'extrapolen els valors registrats del voltatge d'estimulació real amb els valors teòrics del voltatge d'estimulació (0 mV , -45 mV i -80 mV), per tal d'obtenir un senyal el més semblant possible al senyal ideal. L'extrapolació es realitza pel mètode dels veïns més pròxims (*Nearest neighbor extrapolation*) (Akima 1974, Akima 1970), on el valor extrapolat en un punt és el valor més pròxim als valors d'una taula objectiu, V_{target} , de: 0 mV , -45 mV i -80 mV . Es tracta doncs d'un mètode de cerca per taules (*look-up table*).

Detector de pics

El detector de pics detecta l'amplitud del senyal del calci tipus-L, I_{Ca} , i l'amplitud del corrent cua, I_{Tail} . Es descarten els pics deguts al pre-pols per eliminar el corrent de sodi, I_{Na} . Els pics del corrent, I_{Cap} , deguts al comportament capacitiu de la membrana cel·lular del cardiomiòcit, malgrat no ser d'interès, es calculen perquè serveixin de referència a l'hora de calcular les àrees. El detector de pics troba els màxims locals i es porta a terme buscant els punts que siguin més grans que els dos punts adjacents, mentre s'apliquen una sèrie de filtres d'amplitud per descartar els pics massa petits. Per la detecció dels pics negatius, és a dir, els mínims locals s'utilitza la mateixa tècnica per a buscar els màxims locals però invertint el senyal; $i(n)=i(n) \cdot (-1)$.

Extracció d'àrees

El valor de l'àrea del corrent cua, I_{Tail} , s'utilitza com a mesura de la quantitat total de Ca^{2+} alliberat per la cèl·lula a través de del intercambiador Na^+/Ca^{2+} . El valor de l'àrea s'obté per integració numèrica, utilitzant el mètode del trapezoidal. Aquest mètode aproxima la integral dividint l'àrea amb petits trapezoides que faciliten el càlcul de l'àrea. La posició temporal dels pics detectats serveix de guia per a poder calcular l'àrea. Per exemple l'àrea del corrent de calci, I_{Ca} , es detecta es una regió d'interès (*Region-Of-Interest*, ROI) que va des de la posició del pic capacitiu fins la posició del $k+1$ enèsim pols d'estimulació. El valor d'amplitud dels últims m punts de la regió d'interès serveix per trobar l'estat estacionari dels corrents. Pel cas del corrent de calci s'ha utilitzat un

valor de $m=20$, i pel corrent de cua $m=10$. El valor d'amplitud de l'estat estacionari defineix la línia de base (*baseline*) i és molt important per a calcular correctament el valor de l'àrea.

Ajust de tau

Els valors de tau s'obtenen ajustant les equacions (2.31) i (2.36). Per avaluar la qualitat de l'ajust (*Goodness Of Fit*, GOF) s'obté el valor de R-quadrat, R^2 .

Estadística

El programa disposa d'un mòdul dedicat a calcular l'estadística comparativa de tots els paràmetres entre les condicions d'uniforme i alternant. Veure [apartat 2.7](#), com exemple dels tests estadístics implementats.

Gràfics

El mòdul gràfic s'encarrega de generar tots els gràfics del programa i d'emmagatzemar-los en imatges d'alta qualitat en format .png. Aquesta sortida gràfica del programa inclou la representació dels corrents de calci i el voltatge d'estimulació, i també els resultats estadístics.

Exportació de dades

Adicionalment, tots els senyals carregats i les característiques calculades s'emmagatzemen en un fitxer amb extensió .csv (*comma separated values*). Els fitxers tipus .csv es poden obrir perfectament amb programari específic per la lectura de llibres de text: Excel, LibreOffice Calc, Google Sheets, OpenOffice Calc.

2.8.2 Extracció automàtica de característiques

A continuació es descriuen les característiques que s'han dissenyat per tal de mesurar els corrents a través de la membrana del cardiomiòcit per elaborat per l'estudi d'electrofisiologia de pinçament de membrana (*patch clamp*) amb configuració de cèl·lula completa (*whole-cell*) per el cas de: un voltatge d'estimulació fix de valor -80 mV i un voltatge d'estimulació variable tipus graó (*step voltage*).

2.8.2.1 Mesures per a un voltatge d'estimulació fix

Les mesures que s'han elaborat obtenir les característiques (*features*) del corrent de membrana del cardiomiòcit sota l'estimulació d'un voltatge contant són:

a) Pics del transitori d'entrada de calci

El corrent iònic transmembrana que podem observar a través de la micropipeta de registre és el corrent transitori d'entrada de calci, I_{TI} . La mesura bàsica d'aquest corrent és l'obtenció del seu valor de pic. Per tant, es mesura l'amplitud del corrent transitori d'entrada de calci, I_{TI} . S'utilitza un detectors de pics que troba els màxims locals del senyal buscant els punts que siguin més grans que els dos punts adjacents, mentre s'apliquen un filtre d'amplitud per descartar els pics mes petit qu un determinat lllindar. Així per a que el pic es pugui considera significatiu, s'ha definit el següent lllindar empiric:

$$Thr = \frac{1}{2} \cdot \tilde{\sigma}(x) \quad (2.18)$$

Per a calcular la desviació estandard, σ , s'ha utilitzat un estimador robust basat enla desviació absoluta mitjana (MAD) (Leys et al. 2013). L'estimador de desviació estàndard per a una distribució normal ve donat per:

$$\tilde{\sigma}(x) = \frac{1}{\Phi^{-1}(3/4)} \cdot MAD(x) = 1,4826 \cdot MAD(x) \quad (2.19)$$

On

Φ^{-1} és el la inversa de la funció de distribució acumulada.

$MAD(x)$ és desviació absoluta mitjana.

Per una distribució normal, la inversa de la distribució acumulada, Φ^{-1} , s'avalua a una probabilitat de $P=3/4$. L'argument $3/4$ permet que $\pm MAD$ cobreixi el 50% (entre $1/4$ i $3/4$) de la funció de distribució acumulada normal (Hoaglin et al. 1983).

Per a cada màxim detectat es realitza una interpolació quadràtica per estimar la magnitud i la posició del pic del senyal en termes d'índexs fraccionats.

Podem recuperar el pic original, x_{peak} , a partir del pic interpolat, \tilde{x}_{peak} , de la manera següent:

$$x_{peak} = x_o + (\tilde{x}_{peak} - 1) \cdot dx \quad (2.20)$$

On

x és el primer valor de x .

x_{peak} és el màxim local sense interpolar.

\tilde{x}_{peak} és el màxim local després de l'interpolació.

dx és l'espaiat de senyal.

Com els pics d'entrada de calci espontanis (I_{TI}) es tracten de pics negatius, és a dir, els mínims locals s'utilitza la mateixa tècnica per a buscar els màxims locals però invertint el senyal; $i(n)=i(n) \cdot (-1)$. Els pics detectats que coincideixen amb el punts finals del senyal no es consideren com a possibles extrems. A més, si es troben valors repetits, el primer s'identifica com el pic (veure Fig. 2.30).

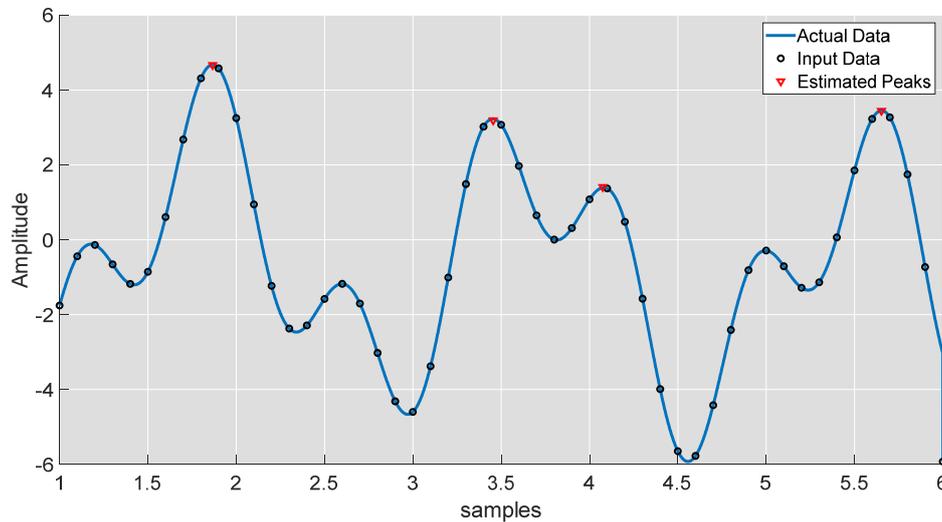


Fig. 2.30. Exemple d'interpolació quadràtica per estimar la magnitud i la posició del pic del senyal.

b) Mesura de l'activitat del NCX

L'activitat de l'intercanviador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), la podem caracteritzar evaluant l'àrea sota la corba del corrent transitori d'entrada de calci, I_{TI} . El valor de l'àrea s'obté per integració numèrica, utilitzant el mètode del trapezoidal. Aquest mètode aproxima la integral dividint l'àrea amb petits trapezoides que faciliten el càlcul de l'àrea. Abans de calcular l'àrea sota a cada pic, es necessita definir també la línia de base (*baseline*) corresponent a cada pic.

Per determinar la línia de base, $bas(y)$, d'un determinat pic $P(x,y)$, primer es troben els màxims canvis de pendent més pròxima a l'esquerra del pic, $P_L(x,y)$, i a la dreta del pic, $P_R(x,y)$ (veure Fig. 2.31). Llavors, el pic que té un valor de l'ordenada y més baix es defineix com la línia de base, $bas(y)$. La intersecció de línia de base amb senyal defineix els intervals d'integració superior i inferior, els intervals a i b respectivament. Un cop definits els intervals d'integració podem calcular l'integral del senyal, $s(x)$, com:

$$Q = \int_a^b s(x) \cdot dx \quad (2.21)$$

La integral es pot aproximar amb el mètode del trapezoidal de la forma següent:

$$Q \approx \frac{b-a}{n} \cdot (s(a) + s(x_1) + \dots + s(x_{n-1})) \quad (2.22)$$

S'ha definit l'espai entre cada punt igual a 1 mostra.

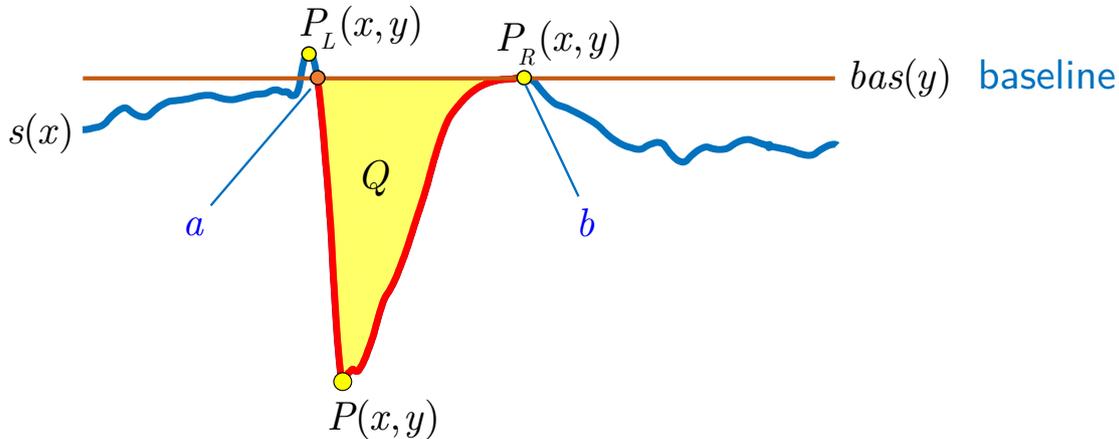


Fig. 2.31. Esquema de la detecció dels intervals d'integració numèrica a partir de la línia de base (*baseline*).

c) Mesura de la dinàmica del NCX

La dinàmica de l'intercanviador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), la podem caracteritzar mesurant la velocitat d'activació i d'inactivació de de l'intercanviador NCX. El paràmetre a mesurar per a caracteritzar la velocitat d'activació és el pendent (negatiu) resultant de calcular un ajust lineal en el descens del corrent transitori d'entrada de calci, I_{TI} . Mentre que de forma similar, la velocitat d'inactivació és el pendent (positiu) resultant de calcular un ajust lineal en l'ascens del corrent transitori d'entrada de calci, I_{TI} . A continuació es descriu el procediment que s'ha seguit per obtenir el pendent lineal del corrent. Es parteix calculant el punt de canvi del senyal de corrent, x , per a dos finestres temporales situades a l'esquerra del pic, W_L , i a la dreta del pic, W_R . Per tant, s'obté un punt de canvi per a cada una de les dues finestres, W_L i W_R .

El punt de canvi (*change point*) d'un senyal, x , es defineix com la mostra, x_i , en què alguna propietat estadística del senyal canvia bruscament (Killick et al. 2012). En el nostre cas la propietat estadística seleccionada en qüestió és la mitjana (*mean*) del senyal. Per trobar un punt de canvi del senyal, x , primer de tot, es divideix el senyal en dues seccions, fent variar la ubicació del punt de divisió, k , fins que l'error de l'índex residual, J , assoleix un mínim.

Per tant, l'error residual queda definit com:

$$J(k) = \sum_{i=1}^{k-1} (x_i - \text{mean}(x_1 \dots x_{k-1}))^2 + \sum_{i=k}^N (x_i - \text{mean}(x_k \dots x_N))^2 \quad (2.23)$$

On

k és el punt de divisió.

x és el senyal.

N és la longitud del senyal.

De manera equivalent, l'error residual es pot expressar com:

$$J(k) = (k - 1) \cdot \text{var}(x_1 \dots x_{k-1}) + (N - k + 1) \cdot \text{var}(x_k \dots x_N) \quad (2.24)$$

L'objectiu es anar minimitzant de forma iterativa fins aconseguir un valor del punt de divisió, k , tal que l'error residual, J , sigui el més petit possible. Llavors, aquest valor de k serà l'índex en què el senyal cavia de manera més significativa respecte la mitjana ([Lavielle. et al. 2005](#)).

Un cop s'ha trobat punt de divisió, k , de màxim canvi es calcula la mitjana en les dues seccions, és a dir; de x_1 fins x_{k-1} i en l'altra secció de x_k fins x_N . D'aquesta manera podem escriure que per a la finestra esquerra, W_L , la mitjana de cada secció serà:

$$\begin{aligned} yHL_k &= \text{mean}(x_1 \dots x_{k-1}) \\ yLL_k &= \text{mean}(x_k \dots x_N) \end{aligned} \quad (2.25)$$

I de forma similar, podem escriure que per la finestra dreta, W_R , la mitjana de cada secció serà:

$$\begin{aligned} yHR_k &= \text{mean}(x_k \dots x_N) \\ yLR_k &= \text{mean}(x_1 \dots x_{k-1}) \end{aligned} \quad (2.26)$$

Un cop calculades les mitjana de cada secció calculem la intersecció amb el senyal x contingut a la finestra esquerra, $x(W_L)$, i a la finestra dreta, $x(W_R)$ (veure [Fig. 2.32](#)). Una bona explicació de la metodologia seguida pel càlcul d'una intersecció 2D, es pot trobar a ([Prasad. 1991](#)). En el nostre cas, no es realitza cap interpolació per l'obtenció del punt de creuament. S'agafa com a punt d'intersecció la mostra més pròxima a l'intersecció pel costat esquerra, és a dir, la mostra més propera l'intersecció i més petita que el punt d'intersecció.

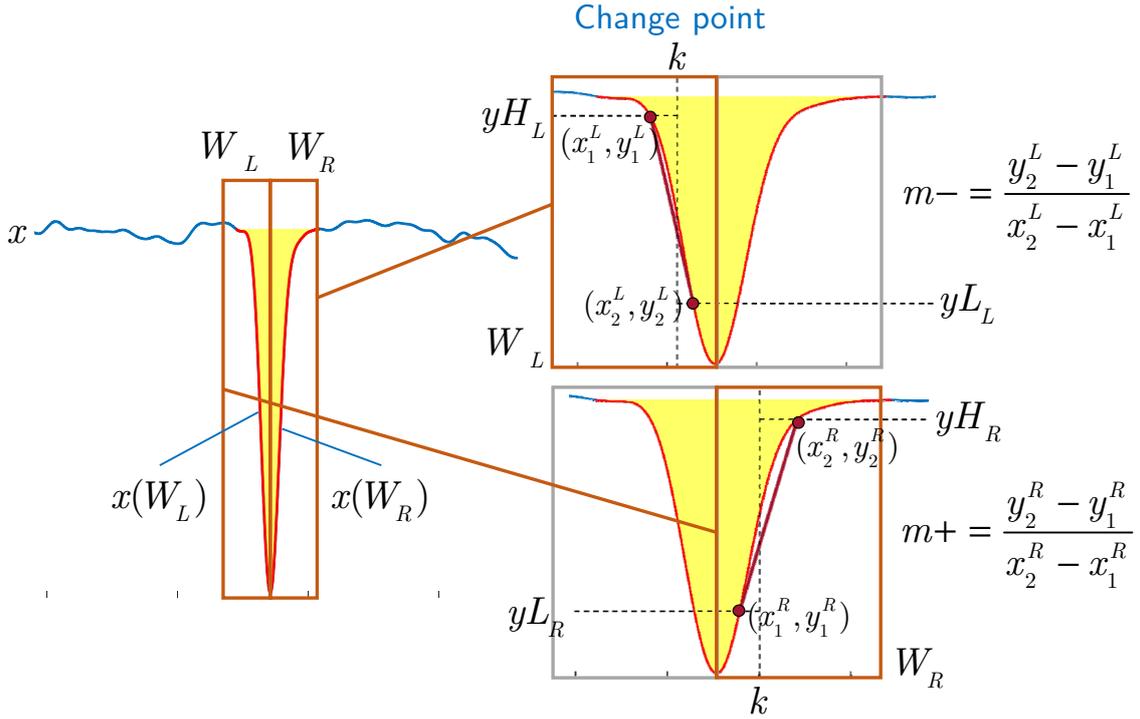


Fig. 2.32. Paràmetres obtinguts pel càlcul del pendent dels pics del corrent transitori d'entrada de calci, I_{TT} .

Definim les coordenades d'intersecció de la finestra esquerra, W_L , la manera següent:

$$\begin{aligned} (x_1^L, y_1^L) &= yH_L \cap x(W_L) \\ (x_2^L, y_2^L) &= yL_L \cap x(W_L) \end{aligned} \quad (2.27)$$

i definim les coordenades d'intersecció de la finestra dreta, W_R , la manera següent:

$$\begin{aligned} (x_1^R, y_1^R) &= yL_R \cap x(W_R) \\ (x_2^R, y_2^R) &= yH_R \cap x(W_R) \end{aligned} \quad (2.28)$$

Per últim, ja podem calcular el pendent (negatiu) de la finestra esquerra, W_L , com:

$$m_- = \frac{y_2^L - y_1^L}{x_2^L - x_1^L} \quad (2.29)$$

i el pendent (positiu) de la finestra dreta, W_R , com:

$$m+ = \frac{y_2^R - y_1^R}{x_2^R - x_1^R} \quad (2.30)$$

2.8.2.2 Mesures per a un voltatge d'estimulació variable

Les mesures que s'han elaborat obtenir les característiques (*features*) del corrent de membrana del cardiomiòcit sota l'estimulació d'un voltatge variable són:

a) Mesura i representació gràfica del corrents iònics del cardiomiòcit

Les corrents iòniques transmembrana que podem observar a través de la micropipeta de registre són: el corrent de calci tipus-L, I_{Ca} , i el corrent de cua de l'intercanviador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), I_{Tail} . La mesura bàsica d'aquests corrents és l'obtenció del seu valor de pic. Per tant, es mesura l'amplitud del corrent calci, I_{Ca} , i del corrent de cua, I_{Tail} . La mesura de l'amplitud del corrent capacitiu, I_{Cap} , no té interès a nivell de diagnòstic, però sí que interessa mesurar-lo per obtenir les propietats elèctriques del cardiomiòcit. Les corrents iòniques transmembrana de calci tipus-L, I_{Ca} , i el corrent de cua, I_{Tail} , representen la quantitat de calci, Ca^{2+} , que flueix a través del sarcolema.

b) Mesura de la inactivació dels canals iònics

La fase d'inactivació d'un canal es produeix quan desapareix el corrent del canal estudiat. Així, la fase d'inactivació dels canals de calci és la fase de desaparició del corrent de calci tipus-L, I_{Ca} .

El paràmetre a mesurar per a caracteritzar la velocitat d'inactivació és la constant de temps de la corba d'ascens del corrent de calci, I_{Ca} . Aquest paràmetre s'ha obtingut ajustant la corba a un model exponencial simple del tipus;

$$f(x) = a \cdot \left(1 - e^{-\frac{(x-b)}{\tau}} \right) + c \quad (2.31)$$

On

a és el corrent transitori màxim.

I_{ss} és l'estat estacionari.

c és el corrent de pic.

b és el temps transcorregut fins el pic.

τ és la constant de temps.

El valor de l'amplitud de corrent transitori màxim, a , es defineix com;

$$a = I_{ss} - c \quad (2.33)$$

On

a és el corrent transitori màxim.

I_{ss} és l'estat estacionari.

c és el corrent de pic.

En la Fig. 2.33 es mostra l'ajust del corrent de calci tipus-L, I_{ca} , a un model exponencial simple, d'on es pot obtenir la constant de temps, τ .

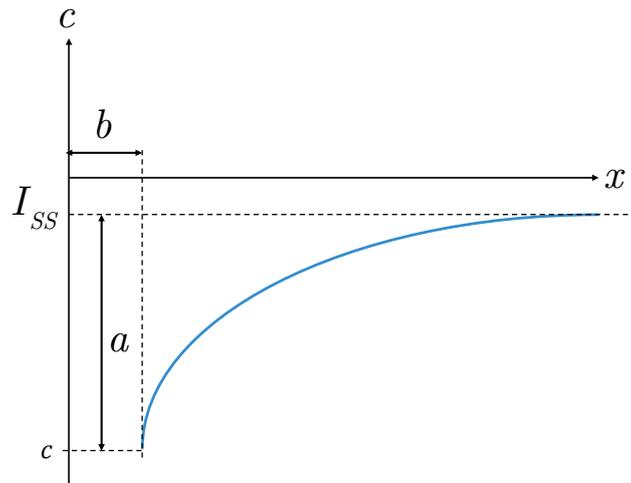


Fig. 2.33. Ajust d'un model exponencial simple per a determinar la constant de temps, τ , per a l'inactivació del corrent de calci tipus-L, I_{ca} .

El cas de corrent de cua, I_{Tail} , és una mica més complex. La corba d'inactivació té dues dinàmiques clarament diferenciades; una dinàmica ràpida i una dinàmica lenta. Per tant, són necessàries dues constants de temps per a poder caracteritzar correctament aquesta corba de cua. Anomenarem τ_1 a la constant de temps ràpida i τ_2 a la constant de temps lenta (veure Fig. 2.34). Així, les dues constants de temps, τ_1 i τ_2 , s'han obtingut ajustant la corba a un model exponencial doble del tipus;

$$f(x) = P \cdot 0,01 \cdot a \cdot \left(1 - e^{-\frac{(x-b)}{\tau_1}} \right) + (100 - P) \cdot 0,01 \cdot a \cdot \left(1 - e^{-\frac{(x-b)}{\tau_2}} \right) + c \quad (2.34)$$

On

a és el corrent transitori màxim.

I_{ss} és l'estat estacionari.

c és el corrent de pic.

b és el temps transcorregut fins el pic.

τ_1 és la constant de temps ràpida.

τ_2 és la constant de temps lenta.

P és el percentatge de senyal ràpida.

Altrament, amb el següent canvi de variable:

$$a_1 = P \cdot 0,01 \cdot a \quad (2.35)$$

l'equació anterior es pot expressar de forma més simplificada com segueix;

$$f(x) = a_1 \cdot \left(1 - e^{-\frac{(x-b)}{\tau_1}} \right) + (1 - a_1) \cdot \left(1 - e^{-\frac{(x-b)}{\tau_2}} \right) + c \quad (2.36)$$

Aquesta forma de simplificada de l'equació és la que s'ha utilitzat per la determinació dels paràmetres cinètics dels corrents de cua, I_{Tail} .

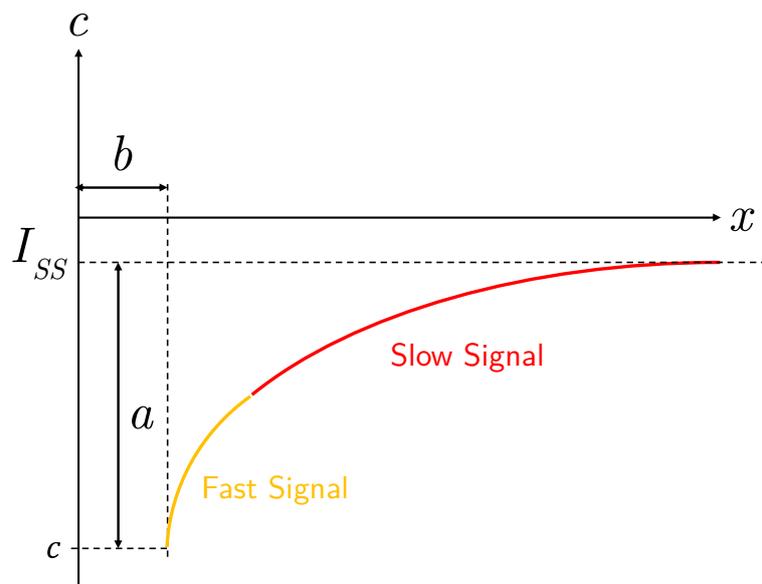


Fig. 2.34. Ajust de un model doble exponencial per a determinar la constant de temps ràpida, τ_1 , i la constant de temps lenta, τ_2 , per a l'inactivació del corrent de cua, I_{Tail} .

Els valors de les constants de temps, τ_1 i τ_2 , s'obtenen ajustant les equacions (2.31) i (2.36), respectivament. Avaluar la bondat de l'ajust (*Goodness Of the Fit*, GOF). Com que el valor del coeficient de determinació (o *r*-square), R^2 , no és una mesura apropiada de la qualitat i complexitat del model, utilitzem el Criteri d'Informació d'Akaike (*Akaike Information Criterion*, AIC) (Spiess et al. 2010). L'AIC penalitza tant l'infraajustament com el sobreajustament i el model amb menor AIC es considera el model òptim (Beier et al. 2001). El criteri AIC compara els models d'ajust des de la perspectiva de l'entropia a la teoria de la

informació, mesurada per la divergència de Kullback-Leibler (Burnham et al. 2002). L'AIC ve donat per (Akaike. 1974, Akaike 1998):

$$AIC = 2 \cdot k - 2 \cdot \log(\hat{L}) \quad (2.37)$$

On

k és el nombre de paràmetres estimats i L és el valor màxim de la versemblança del model.

Per al nostre cas de residus normalment distribuïts, podem estimar la versemblança a partir de la suma de l'estimació quadràtica d'errors (SSE), aleshores l'AIC es converteix en (Burnham et al. 2002):

$$AIC = 2 \cdot k + n \cdot \log\left(\frac{SSE}{n}\right) \quad (2.38)$$

On

l'SSE és l'estimació quadràtica dels errors i n és la mida de la mostra del model.

El nombre de paràmetres estimats, k , és $k=4$ paràmetres pel model exponencial simple i $k=5$ paràmetres pel model exponencial doble. Utilitzant un conjunt de dades de 24 cèl·lules amb patch-clamp ($N=24$) on l'estímul s'ha repetit successivament 30 vegades ($N_{sweep}=30$), aleshores tenim $N_{Tail}=720$ senyals de corrent de cua per comprovar la qualitat dels nostres models: model exponencial simple o model doble exponencial. La Taula 2.9 mostra el valor mitjà del criteri AIC al senyal de cua per al cas de l'ajust exponencial simple i l'exponencial doble.

Com que el valor del criteri AIC és inferior en el cas del model exponencial doble, es decideix utilitzar aquest model per extreure les característiques relatives al senyal de cua, I_{Tail} . Això és coherent amb el que s'ha observat, ja que la corba d'inactivació obtinguda a les dades experimentals del senyal de cua té dues dinàmiques clarament diferenciades: una dinàmica ràpida, τ_1 , i una dinàmica lenta, τ_2 . (Veure Fig. 2.34).

Model	Mitjana AIC $N_{Tail}=720$
Model exponencial simple	6.33e+03
Model doble exponencial	5.07e+03

Taula 2.9. Valors AIC per als models exponencials simple i doble.

c) Mesura de del transport de calci

Ens interessa poder mesurar el transport dels ions calci a través de la membrana cel·lular (sarcolema) que té lloc durant la fase de despolarització i a través de l'intercanviador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) durant la fase de repolarització. El transport de calci a través de la membrana cel·lular es calcula a partir de l'àrea sota la corba del corrent calci, I_{Ca} , durant la despolarització i a partir de l'àrea sota la corba (*Area Under the Curve, AUC*) del corrent cua, I_{Tail} , durant la repolarització. Pel càlcul del transport de calci en fase de despolarització, no s'ha de tenir en compte l'àrea sota la corba del pic capacitiu. Per això, s'ha calcula estrictament l'àrea sota la corba del pic de corrent calci tipus-L, I_{Ca} .

d) Mesura de l'alternança batec-batec

Es presenta un índex per mesurar l'alternança batec-batec (*beat to beat*), comprès entre 0 i 1. Abans de presentar l'índex, és necessari definir la variable D , entesa com la diferència entre valors consecutius i s'expressa com:

$$D(t) = m(t) - m(t - 1) \quad (2.39)$$

L'índex d'alternança, CI_{Idx} , s'ha definit com la ràtio del valor mitjà de la diferència quadràtica d'amplitud entre dos valors consecutius, D , dividit el valor més gran de la diferència quadràtica d'amplitud entre dos valors consecutius:

$$CI_{Idx} = \frac{1}{(N - 1) \cdot \max(D(t)^2)} \cdot \sum_{t=1}^{N-1} D(t)^2 = \frac{\text{mean}(D(t)^2)}{\max(D(t)^2)} \quad (2.40)$$

Amb la finalitat de ressaltar els canvis, tant en el numerador com en el denominador, la variable D ha estat elevada a una potència de dos.

En la [Fig. 2.35](#) es representa el càlcul de l'índex d'alternança per un cardiomiòcit auricular amb resposta tipus uniforme o regular i un altre amb resposta tipus alternant, utilitzant l'àrea sota la corba del corrent de calci tipus-L (QCa) i l'àrea sota la corba del corrent de la cua (QTail). Observis com en la [Fig. 2.35 A](#) i [Fig. 2.35 C](#) la resposta és de tipus regular ja que no s'aprecien canvis d'àrea entre pols d'estimulació (*sweep*) consecutius. Així, la resposta és bastant constant. Per contra, a les [Fig. 2.35 B](#) i [Fig. 2.35 D](#) es produeix un canvi del valor de l'àrea entre pols d'estimulació consecutius i segueix un patró alternant.

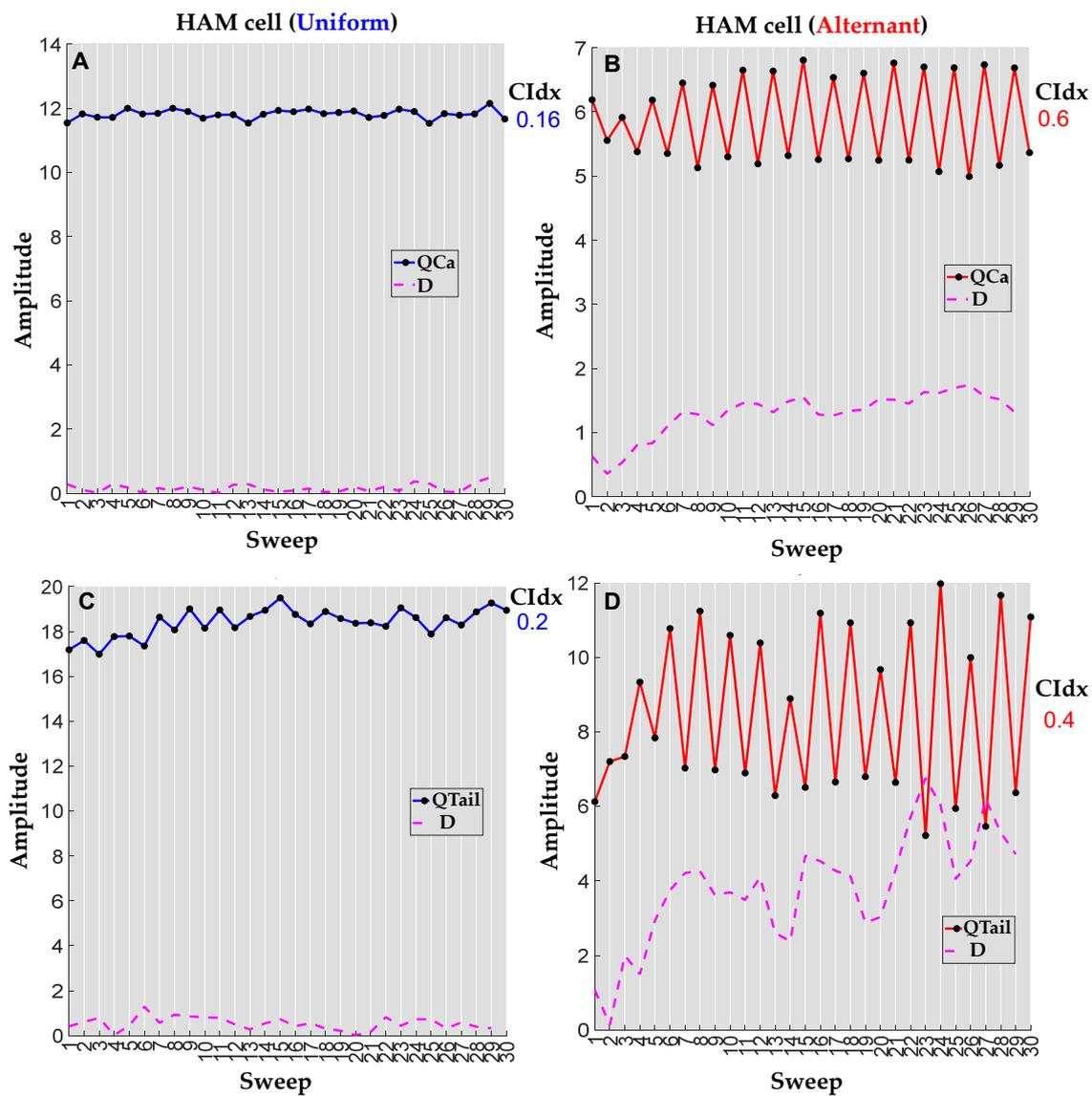


Fig. 2.35. Càlcul de l'índex d'alternança. **A-B.** Càlcul de l'índex d'alternança en una resposta de cardiomiòcits uniforme i alternant mitjançant l'àrea de corrent de calci (QCa). **C-D.** Càlcul de l'índex d'alternança en una resposta de cardiomiòcits uniforme i alternant mitjançant l'àrea de corrent de la cua (QTail).

2.8.3 Validació del mètode d'extracció de característiques

En aquest apartat es valida l'extracció de característiques utilitzant un senyal de calci controlat generat per simulació numèrica. Per validar la precisió dels paràmetres obtinguts al nostre marc computacional, s'ha utilitzat el model d'ordre zero (model elèctric) per generar senyals sintètics realistes que descriguin el protocol de pinça polsada, voltatge d'estimulació variable, descrit a la [secció 2.6.2](#). En aquesta secció, s'ha comparat l'extracció semimanual de les característiques davant de l'extracció automàtica de característiques que s'ha desenvolupat i descrit a la [secció 2.8.2](#). El model elèctric que s'ha dissenyat descriu un experiment the patch-clamp de cèl·lula aïllada. Els paràmetres del model elèctric s'han ajustat perquè coincideixin amb els paràmetres mesurats experimentalment (veure [Taula 2.6](#)). El circuit elèctric s'ha implementat i simulat utilitzant el programari LTspice ([Analog Devices Inc, Massachusetts, Estats Units](#)). El circuit elèctric biofísic utilitzat per simular l'experiment de patch clamp es mostra a la [Fig. 2.23](#).

La validació mitjançant simulacions s'ha centrat en el l'etapa de despolarització, en què el potencial de la membrana cel·lular esdevé més positiu, i és un pas important en el procés de contracció muscular. El model elèctric de l'experiment de patch-clamp descriu correctament com el voltatge i el corrent en el cardiomiòcit canvien amb el temps en resposta al pols de despolarització simulat. El valor de les característiques calculat semimanualment per a un impuls d'estímul de despolarització s'ha utilitzat com a valor de referència (*ground truth*) i es compara amb el valor calculat amb el sistema automàtic d'extracció de característiques (vegeu [l'apartat 2.6.1: Extracció de característiques](#)). La [Taula 2.10](#) mostra l'error relatiu entre el valor real i el valor calculat automàticament.

Característiques (pols despolarització)	Error \mathcal{E} (%)
Area	0.86 %
Amplitud del pic	0.32 %
Contant de temps (Model una única exponencial)	1.27 %

Taula. 2.10. Error en les característiques calculades automàticament en un pols sintètic.

Aquesta simulació és útil per validar el nostre sistema, però també ens permet predir com afecten els diferents paràmetres elèctrics del cardiomiòcit a l'experiment de patch-clamp, així com la configuració dels paràmetres físics del dispositiu (*hardware*): pipeta i amplificador.

2.9 Resultats i discussió

Aquest apartat té com a objectiu presentar les característiques clàssiques que descriuen la dinàmica dels corrents de membrana (amplituds, àrees, constants de temps) a les cèl·lules cardíaques i explicar si són útils per distingir entre un règim uniforme i un alternant, si es troba una diferència estadísticament significativa entre les dues respostes. Tot i això, encara que aquestes característiques podrien ser l'entrada d'un classificador que distingeixi entre les dues respostes, aquestes característiques no permeten mesurar el grau d'alternança del cardiomiòcit. Per això, s'ha presentat una nova mesura per quantificar el grau d'alternança que presenta un cardiomiòcit anomenada índex d'alternança.

Els resultats que es presenten a continuació han estat sotmesos a una validació estadística. S'ha utilitzat una base de dades composta amb 24 senyals de patch clamp ($N=24$) dels quals 13 tenen un comportament uniforme i 11 tenen un comportament altern. Com cada cèl·lula ha estat somesa a 30 polsos d'estimulació, s'obtenen un total de $30 \cdot 13=390$ valors per a cada característica amb comportament uniforme i $30 \cdot 11=330$ valors per a cada característica amb comportament alternant. Els valors usats per a l'anàlisi estadística estan expressats amb la mitjana (*mean*) i l'error estàndard de la mitjana (*Standard Error of the Mean*, SEM) de la manera següent; $\text{mean} \pm \text{SEM}$. La notació emprada per la significància estadística és la següent: $p > 0,05$ (ns), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) i $p \leq 0,0001$ (****). Es consideren estadísticament significatius els p -valors que compleixen: $p \leq 0,05$ (*). La mostra de dades no és gaussiana, per tant, s'ha utilitzat el test no paramètric de la prova de suma de rang de Wilcoxon (*Wilcoxon rank-sum*).

2.9.1 Estimulació amb voltatge fix

En aquest apartat es presenten els resultats estadístics de les característiques (*features*), calculades per un voltatge d'estimulació fix. Es comparen les cèl·lules de línia cel·lular humana: HAM, amb les cèl·lules de ratolí: RAT.

S'observen diferències estadísticament significatives en les mesures de les amplituds del corrent transitoris d'entrada de calci, I_{Ti} , entre els cardiomiòcits de humà, HAM, i ratolí, RAT, amb un p -valor de $p \leq 0,05$ (*). (Veure Fig. 2.36).

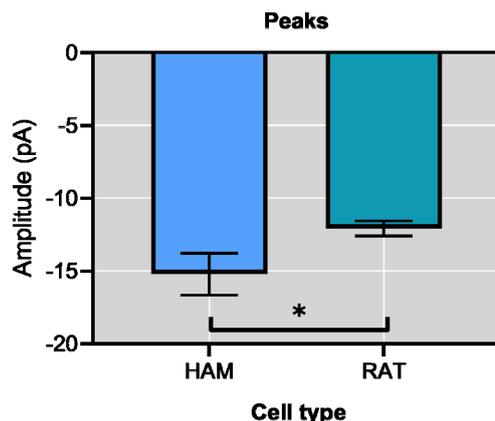


Fig. 2.36. Amplituds dels corrents transitoris d'entrada de calci registrats a través de la membrana cel·lular per a cardiomiòcits tipus HAM i RAT amb un protocol d'estimulació fix.

S'observen diferències estadísticament significatives en les mesures del pendent de pujada (*slope left*) i el pendent de baixada (*slope right*) del del pic de corrent transitoris d'entrada de calci, I_{Ti} , entre els cardiomiòcits de humà, HAM, i ratolí, RAT. Obtenim uns p -valors de $p \leq 0,01$ (**) i $p \leq 0,001$ (***) pel de pujada (*slope left*) i el pendent de baixada (*slope right*) respectivament. (Veure Fig. 2.37).

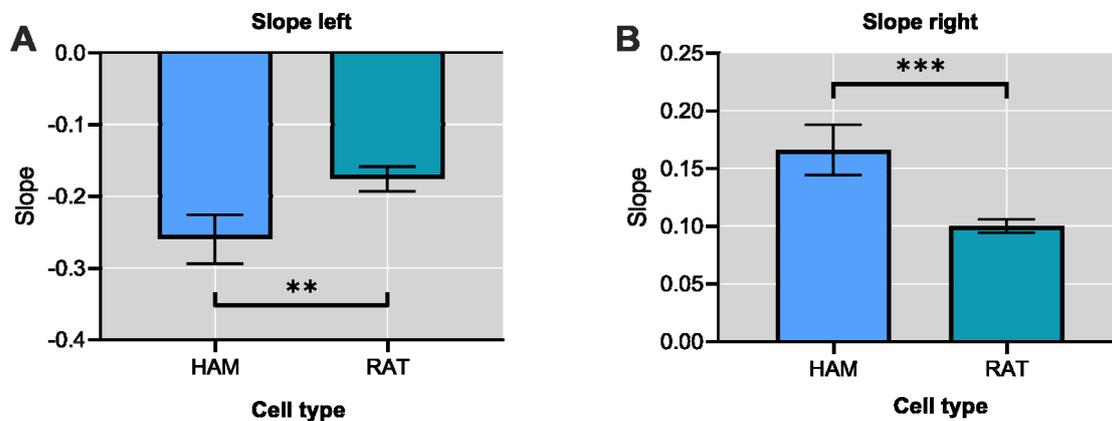


Fig. 2.37. Pendents dels corrents transitoris d'entrada de calci registrats a través de la membrana cel·lular per a cardiomiòcits tipus HAM i RAT amb un protocol d'estimulació fix. **A.** Pendent de pujada (*slope left*). **B.** pendent de baixada (*slope right*).

No s'observa cap diferència en la mesura de l'àrea sota la corba (QITI) del corrent transitoris d'entrada de calci, I_{Ti} , entre els cardiomiòcits de humà, HAM, i ratolí, RAT (Veure Fig. 2.38). Per tant, no és una bona característica per a diferenciar cardiomiòcits de humans i de ratolí.

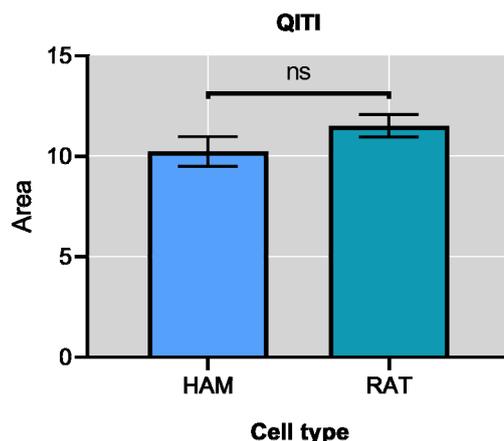


Fig. 2.38. Area sota la corba (QITI) dels corrents transitoris d'entrada de calci registrats a través de la membrana per a cardiomiòcits tipus HAM i RAT amb un protocol d'estimulació fix.

2.9.2 Estimulació amb voltatge variable

En aquest apartat es presenten els resultats estadístics de les característiques (*features*), calculades per un voltatge d'estimulació variable. Es comparen cardiomiòcits amb resposta tipus uniforme i alternant.

2.9.2.1 Mesures d'amplitud

S'observen diferències estadísticament significatives en les mesures de les amplituds del corrent de calci tipus-L, I_{Ca} , entre els cardiomiòcits amb resposta uniforme i alternant, amb un p -valor de $p \leq 0,01$ (**). A la Fig. 2.39.A s'observa una disminució de l'amplitud dels pics de corrent de calci tipus-L, I_{Ca} , en els cardiomiòcits que presenten un comportament alternant.

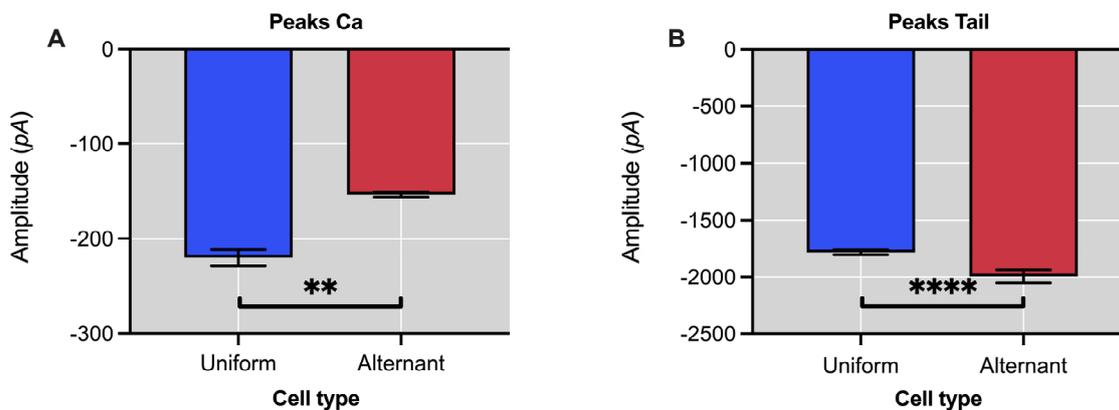


Fig. 2.39. Amplituds dels corrents registrats a través de la membrana cel·lular per a cardiomiòcits tipus uniforme i alternants. **A.** Amplitud del corrent de calci, I_{Ca} . **B.** Amplitud del corrent de cua, I_{Tail} .

Aquest fet, concorda amb l'observació que l'alternança a nivell cel·lular ha estat associada a una disminució del corrent de calci tipus-L, I_{Ca} , (Wagoner et al. 1999), causat per un increment en l'alliberament espontani i fluctuant de calci al reticle sarcoplasmàtic (SR) (Mackenzie et al. 2004, Diaz et al. 2004, Hove-Madsen et al. 2004, Hove-Madsen et al. 2006, Llach et al. 2011). Per tant, es mostra com la incidència dels fenòmens d'alternança és regulada per una disminució del corrent de calci, I_{Ca} , a través de la membrana del cardiomiòcit. Malgrat aquests estudis, encara no està del tot clar com la dinàmica de calci intracel·lular afecta a l'alternança batec-batec (*beat to beat*) quan la freqüència d'estimulació augmenta. També s'ha observat en cardiomiòcits ventriculars de rata que l'alternança és induïda per la disminució del corrent iònic de calci tipus-L, I_{Ca} . Aquest fet és causat per l'alternança del calci alliberat pel reticle sarcoplasmàtic (SR) (Diaz et al. 2004, Kockskamper and Blatter. 2002, Picht et al. 2006, Aistrup et al. 2006, Li et al. 2009).

Per a poder correlacionar l'activat del corrent amb la concentració de calci dins del reticle sarcoplasmàtic (SR) ens faria falta disposar d'un registre òptic d'imatge de calci (*calcium imaging*) on els ions de calci es marquen amb un fluoròfor que permet quantificar la variació de calci intracel·lular en funció de intensitat lumínica emesa (per més informació vegis el [Capítol 3](#)). Però s'ha de tenir en compte que en la utilització de la tècnica de pinçament de membrana combinada amb imatge de calci que utilitza fluoròfors sensibles al calci, com ara el *fluo-4*, els fluoròfors constitueixen un tampó de calci exogen que pot interferir en la regulació del calci batec-batec (Hove-Madsen and Bers. 1992).

Pel que fa a les mesures de les amplituds dels corrents de cua de l'intercanviador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), I_{Tail} , entre els cardiomiòcits amb resposta uniforme i alternant s'observa una diferència estadística amb un p -valor de $p \leq 0,0001$ (****). Però, l'amplitud del cardiomiòcit amb resposta uniforme és menor. (Veure [Fig. 2.39.B](#)).

El fet que els cardiomiòcits amb un patró batec-batec alternant tinguin una disminució de l'amplitud del corrent de calci tipus-L, I_{Ca} , valida l'ús de farmacologia destinada a inhibir de forma total o parcial l'activitat del corrent de calci tipus-L, I_{Ca} , ja que pot ser una solució per tal de regular una resposta alternant cap a una resposta uniforme.

A més, a partir de models d'experimentació animal s'ha mostrat que concentració plasmàtica de calci es troba lligada al desenvolupament de l'alternança elèctrica, de tal manera que l'alternança pot induir-se si es redueix

la concentració plasmàtica de calci amb agents quelants de calci, que l'atraparan, per exemple l'EDTA (Cinca et al. 1978). I de forma oposada, l'alternança elèctrica i mecànica es pot revertir en humans mitjançant l'administració de calci (Pastore et al. 1999).

2.9.2.2 Mesures de transport de calci

S'observen diferències estadísticament significatives en les mesures de les àrees sota la corba (AUC) dels corrents de calci tipus-L, I_{Ca} , entre els cardiomiòcits amb resposta uniforme i alternant, amb un p -valor de $p \leq 0,001$ (***) (Veure Fig. 2.40.A).

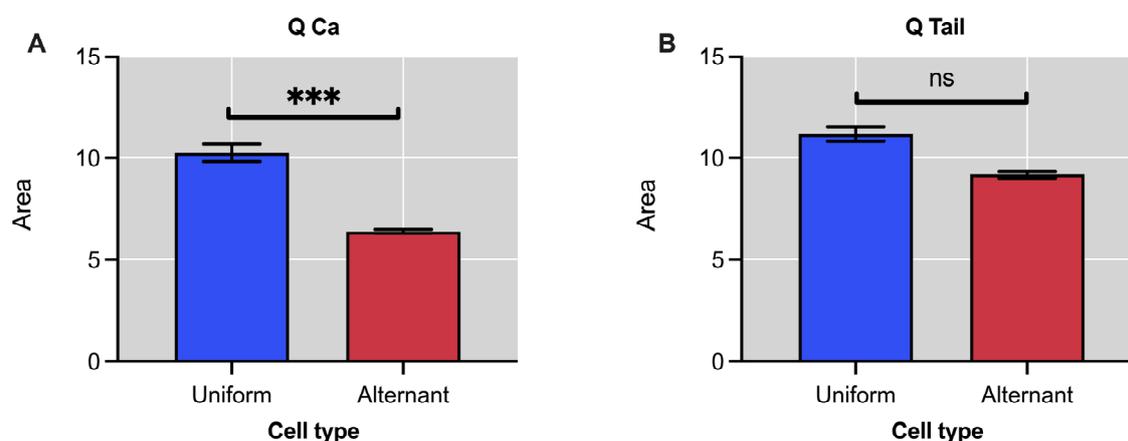


Fig. 2.40. Àrea sota la corba dels corrent registrats a través de la membrana cel·lular per a cardiomiòcits tipus uniforme i alternants. **A.** Àrea sota la corba del corrent de calci, QCa. **B.** Àrea sota la corba del corrent de cua, QTail.

En canvi, no hi ha diferències significatives (n.s) en les mesures de les àrees sota la corba (AUC) dels corrents de cua de l'intercanviador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), I_{Tail} , entre els cardiomiòcits amb resposta uniforme i alternant. (Veure Fig. 2.40.B). Així, l'àrea sota la corba del corrent de cua, no sembla ser indicativa de presència o absència de fenòmens d'alternança en el cardiomiòcit.

2.9.2.3 Mesures de la constant de temps

En la Fig. 2.41, es mostra les constants de temps calculades pels a cardiomiòcits amb resposta tipus uniforme i resposta alternant. Podem destacar que la constant de temps del corrent de cua ràpida, τ_1 , en els senyals de tipus uniforme és significativament menor en comparació amb els senyals alternants amb un p -valor de $p \leq 0,01$ (**) (Fig. 2.41 B). Per tant, la dinàmica en la primera fase de l'inactivació (τ_1) és més ràpida en els senyals tipus uniforme comparat amb els senyals alternants. Aquest augment de la durada de les

constants de temps 1 també s'ha observat en miòcits de pacients amb fibril·lació auricular, FA (Herraiz-Martinez. 2015, Van Wagoner 2000). En canvi, la constant de temps del corrent cua lenta, τ_2 , en els senyals tipus uniformes es significativament més gran comparada amb els senyals alternants amb un p -valor de $p \leq 0,0001$ (****) (Fig. 2.41 C).

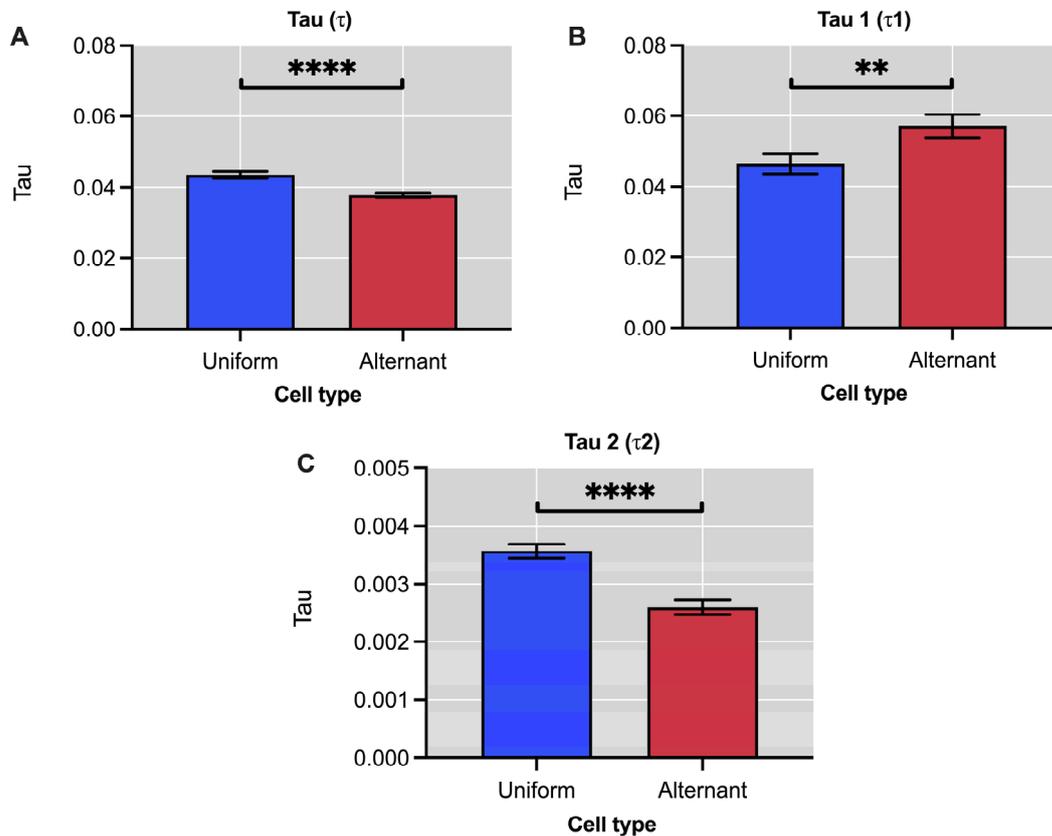


Fig. 2.41. Constant de temps per a cardiomiòcits tipus uniforme i alternants. **A.** Constant de temps del corrent calci, τ . **B.** Costant de temps del corrent cua ràpida, τ_1 . **C.** costant de temps del corrent cua lenta, τ_2 .

S'observa com les constants de temps τ_1 és significativament més lentes en el cas de les cèl·lules amb comportament alternant. Aquest augment de la duració de les constants de temps també s'ha observat en miòcits de pacients amb fibril·lació auricular, FA. (Van Wagoner et al. 1999).

2.9.2.4 Mesures de l'índex d'alternança

Com que l'índex d'alternança, CIdx, és una mesura nova, i no es disposa de referències de control, s'ha decidit aplicar el càlcul de l'índex als paràmetres pels quals es disposa d'indicis que podrien tenir un comportament alternant entre els

diferents pols d'estimulació successius que s'apliquen a l'experiment de pinçament de membrana de cèl·lula completa.

Les constants de temps no semblen ser les dades més significatives per a calcular l'índex d'alternança, CIdx. Només l'índex calculat amb la constant de temps, τ , mostra diferències estadísticament significatives entre els cardiomiòcits amb resposta uniforme i alternant, amb un p -valor de $p \leq 0,05$ (*). (Veure Fig. 2.42.B). La resta de mesures de la constant de temps utilitzades pel càlcul de l'índex d'alternança, CIdx, no presenten diferències estadísticament significatives (n.s) entre cardiomiòcits amb resposta uniforme o alternant. (Veure Fig. 2.42.A, Fig. 2.42.C).

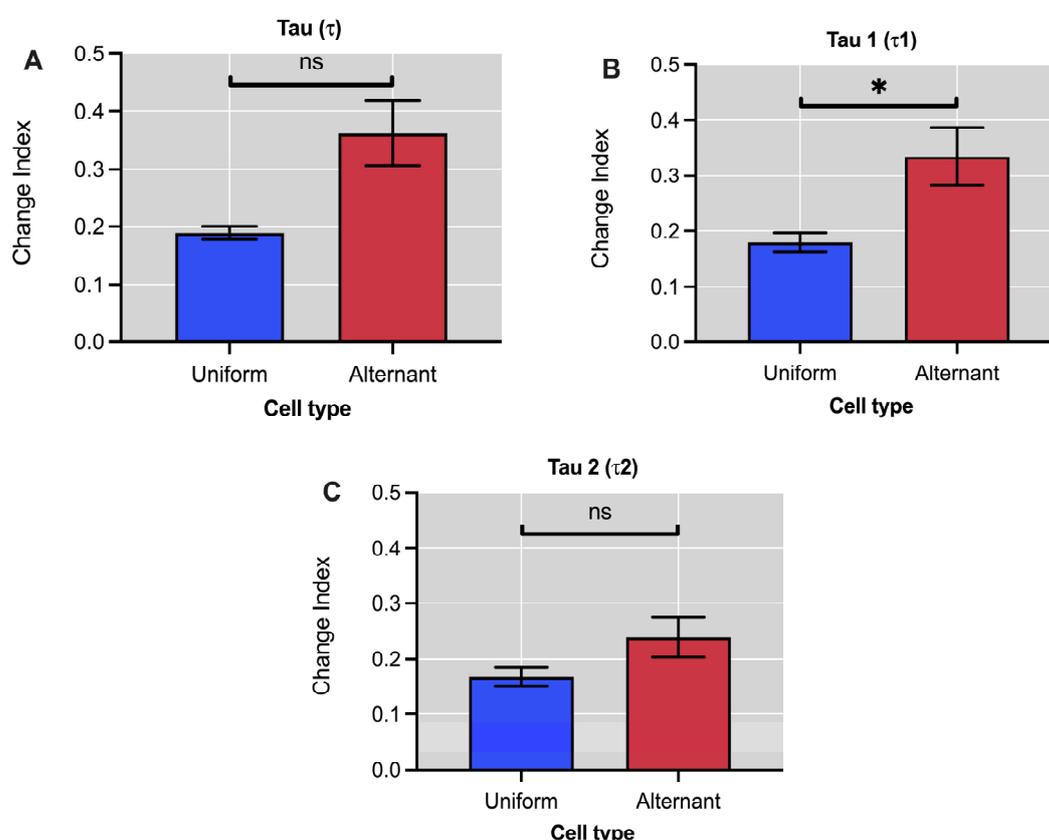


Fig. 2.42. Índex d'alternança, CIdx, per a cardiomiòcits tipus uniforme i alternants. **A.** Índex d'alternança calculat amb la constant de temps del corrent calci, τ . **B.** Índex d'alternança calculat amb la constant de temps del corrent cua ràpida. **C.** Índex d'alternança calculat amb la constant de temps del corrent cua lenta.

De forma similar als comportaments dels registres d'amplitud i àrea, sembla ser que la dinàmica del corrent de calci tipus-L, I_{Ca} , té un paper important en la regulació dels fenòmens d'alternança. Precisament, s'observen diferències estadísticament significatives a l'índex calculat amb les mesures de les àrees sota la corba (AUC) dels corrents de calci tipus-L, I_{Ca} , entre els cardiomiòcits amb

resposta uniforme i alternant amb un p -valor de $p \leq 0,001$ (***) . (Veure Fig. 2.43.A).

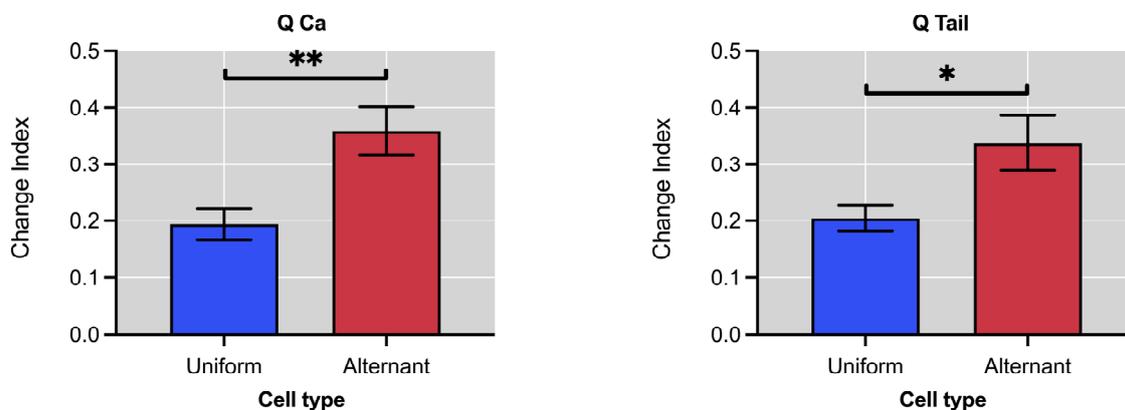


Fig. 2.43. Índex d'alternança, CIdx, per a cardiomiòcits tipus uniforme i alternants. **A.** Índex d'alternança calculat amb l'àrea sota la corba del corrent de calci, QCa. **B.** Índex d'alternança calculat amb l'àrea sota la corba del corrent de cua, QTail.

Finalment, en cas d'emprar el corrent de cua, I_{Tail} , per a calcular l'índex d'alternança, CIdx, es generen diferències significatives amb un p -valor de $p \leq 0,05$ (*). Veure Fig. 2.43.B.

Referències

- [1] D. R. van Wagoner, A. L. Pond, M. Lamorgese, S. S. Rossie, P. M. McCarthy, and J. M. Nerbonne, “Atrial L-Type Ca^{2+} Currents and Human Atrial Fibrillation,” *Circ Res*, vol. 85, no. 5, pp. 428–436, Sep. 1999, doi: 10.1161/01.RES.85.5.428.
- [2] G. Major and J. D. Evans, “Solutions for transients in arbitrarily branching cables: IV. Nonuniform electrical parameters,” *Biophys J*, vol. 66, no. 3, pp. 615–633, Mar. 1994, doi: 10.1016/S0006-3495(94)80836-7.
- [3] G. Major, “Solutions for transients in arbitrarily branching cables: III. Voltage clamp problems,” *Biophys J*, vol. 65, no. 1, pp. 469–491, Jul. 1993, doi: 10.1016/S0006-3495(93)81039-7.
- [4] G. Major, J. D. Evans, and J. J. B. Jack, “Solutions for transients in arbitrarily branching cables: II. Voltage clamp theory,” *Biophys J*, vol. 65, no. 1, pp. 450–468, Jul. 1993, doi: 10.1016/S0006-3495(93)81038-5.
- [5] G. Major, J. D. Evans, and J. J. Jack, “Solutions for transients in arbitrarily branching cables: I. Voltage recording with a somatic shunt,” *Biophys J*, vol. 65, no. 1, pp. 423–449, Jul. 1993, doi: 10.1016/S0006-3495(93)81037-3.
- [6] J. Magistretti, M. Mantegazza, E. Guatteo, and E. Wanke, “Action potentials recorded with patch-clamp amplifiers: are they genuine?,” *Trends Neurosci*, vol. 19, no. 12, pp. 530–534, Dec. 1996, doi: 10.1016/S0166-2236(96)40004-2.
- [7] H. Satoh, L. M. Delbridge, L. A. Blatter, and D. M. Bers, “Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects,” *Biophys J*, vol. 70, no. 3, pp. 1494–1504, Mar. 1996, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79711-4.
- [8] C. L. Lei, M. Clerx, D. G. Whittaker, D. J. Gavaghan, T. P. de Boer, and G. R. Mirams, “Accounting for variability in ion current recordings using a mathematical model of artefacts in voltage-clamp experiments,” *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 378, no. 2173, p. 20190348, Jun. 2020, doi: 10.1098/rsta.2019.0348.
- [9] A. J. Sherman, A. Shrier, and E. Cooper, “Series Resistance Compensation for Whole-Cell Patch-Clamp Studies Using a Membrane State Estimator,” *Biophys J*, vol. 77, no. 5, pp. 2590–2601, Nov. 1999, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77093-1.
- [10] H. Singh, A. K. Pannu, V. Suri, A. Bhalla, and S. Kumari, “Pericardial effusion and electrical alternans,” *QJM: An International Journal of Medicine*, vol. 112, no. 2, pp. 135–136, Feb. 2019, doi: 10.1093/qjmed/hcy191.
- [11] M. E. Díaz, S. C. O’Neill, and D. A. Eisner, “Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content Fluctuation Is the Key to Cardiac Alternans,” *Circ Res*, vol. 94, no. 5, pp. 650–656, Mar. 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000119923.64774.72.
- [12] H. Akima, “A Method of Bivariate Interpolation and Smooth Surface Fitting Based on Local Procedures,” *Commun. ACM*, vol. 17, no. 1, pp. 18–20, Jan. 1974, doi: 10.1145/360767.360779.
- [13] H. Akima, “A New Method of Interpolation and Smooth Curve Fitting Based on Local Procedures,” *J. ACM*, vol. 17, no. 4, pp. 589–602, Oct. 1970, doi: 10.1145/321607.321609.

- [14] Y. Okada, *Patch Clamp Techniques*. Tokyo: Springer Japan, 2012. doi: 10.1007/978-4-431-53993-3.
- [15] A. Herraiz-Martínez *et al.*, “Ageing is associated with deterioration of calcium homeostasis in isolated human right atrial myocytes,” *Cardiovasc Res*, vol. 106, no. 1, pp. 76–86, Apr. 2015, doi: 10.1093/cvr/cvv046.
- [16] M. Prasad, “Intersection of line segments,” in *Graphics Gems II*, J. Arvo, Ed. Boston: Academic Press, 1991, pp. 7–9.
- [17] M. Lavielle, “Using penalized contrasts for the change-point problem,” *Signal Processing*, vol. 85, no. 8, pp. 1501–1510, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.sigpro.2005.01.012.
- [18] R. Killick, P. Fearnhead, and I. A. Eckley, “Optimal Detection of Changepoints With a Linear Computational Cost,” *J Am Stat Assoc*, vol. 107, no. 500, pp. 1590–1598, Dec. 2012, doi: 10.1080/01621459.2012.737745.
- [19] D. R. van Wagoner and J. M. Nerbonne, “Molecular Basis of Electrical Remodeling in Atrial Fibrillation,” *J Mol Cell Cardiol*, vol. 32, no. 6, pp. 1101–1117, Jun. 2000, doi: 10.1006/jmcc.2000.1147.
- [20] D. R. van Wagoner, A. L. Pond, M. Lamorgese, S. S. Rossie, P. M. McCarthy, and J. M. Nerbonne, “Atrial L-Type Ca²⁺ Currents and Human Atrial Fibrillation,” *Circ Res*, vol. 85, no. 5, pp. 428–436, Sep. 1999, doi: 10.1161/01.RES.85.5.428.
- [21] C. Leys, C. Ley, O. Klein, P. Bernard, and L. Licata, “Detecting outliers: Do not use standard deviation around the mean, use absolute deviation around the median,” *J Exp Soc Psychol*, vol. 49, no. 4, pp. 764–766, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.jesp.2013.03.013.
- [22] D. L. Donoho, “De-noising by soft-thresholding,” *IEEE Trans Inf Theory*, vol. 41, no. 3, pp. 613–627, May 1995, doi: 10.1109/18.382009.
- [23] T. T. Cai, “On Block Thresholding in Wavelet Regression: Adaptivity, Block size, and Threshold Level.,” *Stat Sin*, pp. 1241–1273, 2002.
- [24] D. L. Donoho, “Progress in Wavelet Analysis and WVD: A Ten Minute Tour.,” *Progress in Wavelet Analysis and Applications*, pp. 109–128, 1993.
- [25] D. L. Donoho and I. M. Johnstone, “Ideal Spatial Adaptation by Wavelet Shrinkage,” *Biometrika*, vol. 81, no. 3, p. 425, Aug. 1994, doi: 10.2307/2337118.
- [26] Y. Meyer, *Wavelets and Operators*. Cambridge University Press, 1993. doi: 10.1017/CBO9780511623820.
- [27] S. G. Mallat, “A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation,” *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, vol. 11, no. 7, pp. 674–693, Jul. 1989, doi: 10.1109/34.192463.
- [28] I. Daubechies, *Ten Lectures on Wavelets*. Society for Industrial and Applied Mathematics, 1992. doi: 10.1137/1.9781611970104.
- [29] T. Sakaba, A. Hazama, and Y. Maruyama, “Patch-Clamp Capacitance Measurements,” 2012. doi: 10.1007/978-4-431-53993-3_17.
- [30] L. Staerk, J. A. Sherer, D. Ko, E. J. Benjamin, and R. H. Helm, “Atrial Fibrillation,” *Circ Res*, vol. 120, no. 9, Apr. 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309732.
- [31] Y. Li, M. E. Díaz, D. A. Eisner, and S. O’Neill, “The effects of membrane potential, SR Ca²⁺ content and RyR responsiveness on systolic Ca²⁺ alternans in rat

- ventricular myocytes,” *J Physiol*, vol. 587, no. 6, Mar. 2009, doi: 10.1113/jphysiol.2008.164368.
- [32] G. L. Aistrup *et al.*, “Pacing-induced Heterogeneities in Intracellular Ca²⁺ Signaling, Cardiac Alternans, and Ventricular Arrhythmias in Intact Rat Heart,” *Circ Res*, vol. 99, no. 7, Sep. 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000244087.36230.bf.
- [33] L. Hove-Madsen and D. M. Bers, “Indo-1 binding to protein in permeabilized ventricular myocytes alters its spectral and Ca binding properties,” *Biophys J*, vol. 63, no. 1, Jul. 1992, doi: 10.1016/S0006-3495(92)81597-7.
- [34] M. Kodama *et al.*, “Mechanical alternans in patients with chronic heart failure,” *J Card Fail*, vol. 7, no. 2, Jun. 2001, doi: 10.1054/jcaf.2001.24122.
- [35] L. Hove-Madsen *et al.*, “The proarrhythmic antihistaminic drug terfenadine increases spontaneous calcium release in human atrial myocytes,” *Eur J Pharmacol*, vol. 553, no. 1–3, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.ejphar.2006.09.023.
- [36] L. Hove-Madsen *et al.*, “Atrial Fibrillation Is Associated With Increased Spontaneous Calcium Release From the Sarcoplasmic Reticulum in Human Atrial Myocytes,” *Circulation*, vol. 110, no. 11, Sep. 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000141296.59876.87.
- [37] A. Llach, C. E. Molina, J. Fernandes, J. Padró, J. Cinca, and L. Hove-Madsen, “Sarcoplasmic reticulum and L-type Ca²⁺ channel activity regulate the beat-to-beat stability of calcium handling in human atrial myocytes,” *J Physiol*, vol. 589, no. 13, Jul. 2011, doi: 10.1113/jphysiol.2010.197715.
- [38] L. Mackenzie, H. L. Roderick, M. J. Berridge, S. J. Conway, and M. D. Bootman, “The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction,” *J Cell Sci*, vol. 117, no. 26, Dec. 2004, doi: 10.1242/jcs.01559.
- [39] M. E. Díaz, S. C. O’Neill, and D. A. Eisner, “Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content Fluctuation Is the Key to Cardiac Alternans,” *Circ Res*, vol. 94, no. 5, Mar. 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000119923.64774.72.
- [40] E. Picht, J. DeSantiago, L. A. Blatter, and D. M. Bers, “Cardiac Alternans Do Not Rely on Diastolic Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content Fluctuations,” *Circ Res*, vol. 99, no. 7, Sep. 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000244002.88813.91.
- [41] J. Kockskämper and L. A. Blatter, “Subcellular Ca²⁺ alternans represents a novel mechanism for the generation of arrhythmogenic Ca²⁺ waves in cat atrial myocytes,” *J Physiol*, vol. 545, no. 1, Nov. 2002, doi: 10.1113/jphysiol.2002.025502.
- [42] S. Stewart, “Population prevalence, incidence, and predictors of atrial fibrillation in the Renfrew/Paisley study,” *Heart*, vol. 86, no. 5, Nov. 2001, doi: 10.1136/heart.86.5.516.
- [43] J. Cinca *et al.*, “The dependence of T wave alternans on diastolic resting period duration,” *Eur J Cardiol*, vol. 74, pp. 299–309, 1978.
- [44] F. Navarro-Lopez, J. Cinca, G. Sanz, J. Magriña, and A. Betriu, “Isolated T Wave Alternans Elicited by Hypocalcemia in Dogs,” *J Electrocardiol*, vol. 11, no. 2, Jan. 1978, doi: 10.1016/S0022-0736(78)80098-3.
- [45] A. S. Go *et al.*, “Prevalence of Diagnosed Atrial Fibrillation in Adults,” *JAMA*, vol. 285, no. 18, May 2001, doi: 10.1001/jama.285.18.2370.

- [46] V. Fuster *et al.*, “ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation—Executive Summary,” *Circulation*, vol. 114, no. 7, Aug. 2006, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.177031.
- [47] V. Shusterman, A. Goldberg, and B. London, “Upsurge in T-Wave Alternans and Nonalternating Repolarization Instability Precedes Spontaneous Initiation of Ventricular Tachyarrhythmias in Humans,” *Circulation*, vol. 113, no. 25, Jun. 2006, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.607895.
- [48] D. S. Rosenbaum, L. E. Jackson, J. M. Smith, H. Garan, J. N. Ruskin, and R. J. Cohen, “Electrical Alternans and Vulnerability to Ventricular Arrhythmias,” *New England Journal of Medicine*, vol. 330, no. 4, Jan. 1994, doi: 10.1056/NEJM199401273300402.
- [49] J. M. Pastore, S. D. Girouard, K. R. Laurita, F. G. Akar, and D. S. Rosenbaum, “Mechanism Linking T-Wave Alternans to the Genesis of Cardiac Fibrillation,” *Circulation*, vol. 99, no. 10, Mar. 1999, doi: 10.1161/01.CIR.99.10.1385.
- [50] F. Navarro-Lopez, J. Cinca, G. Sanz, A. Periz, J. Magriña, and A. Betriu, “Isolated T wave alternans,” *Am Heart J*, vol. 95, no. 3, Mar. 1978, doi: 10.1016/0002-8703(78)90369-1.
- [51] Z. Qu, A. Garfinkel, P.-S. Chen, and J. N. Weiss, “Mechanisms of Discordant Alternans and Induction of Reentry in Simulated Cardiac Tissue,” *Circulation*, vol. 102, no. 14, Oct. 2000, doi: 10.1161/01.CIR.102.14.1664.
- [52] K. Hiromoto *et al.*, “Discordant Repolarization Alternans-Induced Atrial Fibrillation is Suppressed by Verapamil,” *Circulation Journal*, vol. 69, no. 11, 2005, doi: 10.1253/circj.69.1368.
- [53] H. H. Kalter and M. L. Schwartz, “Electrical alternans.,” *N Y State J Med*, vol. 48(10), pp. 1164–1166.
- [54] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth, “Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches,” *Pflugers Arch*, vol. 391, no. 2, Aug. 1981, doi: 10.1007/BF00656997.
- [55] W. Rall, R. E. Burke, W. R. Holmes, J. J. Jack, S. J. Redman, and I. Segev, “Matching dendritic neuron models to experimental data,” *Physiol Rev*, vol. 72, no. suppl_4, Oct. 1992, doi: 10.1152/physrev.1992.72.suppl_4.S159.
- [56] W. Rall, “Core Conductor Theory and Cable Properties of Neurons,” in *Handbook of Physiology: The Nervous System*, vol. 1, Bethesda: American Physiological Society, 1977, pp. 39–98.
- [57] W. Rall, “Time Constants and Electrotonic Length of Membrane Cylinders and Neurons,” *Biophys J*, vol. 9, no. 12, Dec. 1969, doi: 10.1016/S0006-3495(69)86467-2.
- [58] W. Rall, *Theoretical Significance of Dendritic Trees for Neuronal Input-Output Relations*. Palo Alto: Stanford University Press, Palo Alto, 1964. doi: 10.7551/mitpress/6743.003.0015.
- [59] G. Major, J. D. Evans, and J. J. Jack, “Solutions for transients in arbitrarily branching cables: I. Voltage recording with a somatic shunt,” *Biophys J*, vol. 65, no. 1, Jul. 1993, doi: 10.1016/S0006-3495(93)81037-3.

- [60] I. Llano, A. Marty, C. M. Armstrong, and A. Konnerth, “Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices,” *J Physiol*, vol. 434, no. 1, Mar. 1991, doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018465.
- [61] M. B. Jackson, “Passive current flow and morphology in the terminal arborizations of the posterior pituitary,” *J Neurophysiol*, vol. 69, no. 3, Mar. 1993, doi: 10.1152/jn.1993.69.3.692.
- [62] M. B. Jackson, “Cable analysis with the whole-cell patch clamp. Theory and experiment,” *Biophys J*, vol. 61, no. 3, Mar. 1992, doi: 10.1016/S0006-3495(92)81880-5.
- [63] M. N. Economo, F. R. Fernandez, and J. A. White, “Dynamic Clamp: Alteration of Response Properties and Creation of Virtual Realities in Neurophysiology,” *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 7, Feb. 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5954-09.2010.
- [64] A. A. Sharp, M. B. O’Neil, L. F. Abbott, and E. Marder, “The dynamic clamp: artificial conductances in biological neurons,” *Trends Neurosci*, vol. 16, no. 10, Oct. 1993, doi: 10.1016/0166-2236(93)90004-6.
- [65] L. Hove-Madsen *et al.*, “Atrial Fibrillation Is Associated With Increased Spontaneous Calcium Release From the Sarcoplasmic Reticulum in Human Atrial Myocytes,” *Circulation*, vol. 110, no. 11, Sep. 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000141296.59876.87.
- [66] P. Weerakoon, E. Culurciello, Y. Yang, J. Santos-Sacchi, P. J. Kindlmann, and F. J. Sigworth, “Patch-clamp amplifiers on a chip,” *J Neurosci Methods*, vol. 192, no. 2, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.06.030.
- [67] E. Neher, “[6] Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments,” 1992. doi: 10.1016/0076-6879(92)07008-C.
- [68] J. Golowasch *et al.*, “Membrane Capacitance Measurements Revisited: Dependence of Capacitance Value on Measurement Method in Nonisopotential Neurons,” *J Neurophysiol*, vol. 102, no. 4, Oct. 2009, doi: 10.1152/jn.00160.2009.
- [69] E. Neher, “Voltage Offsets in Patch-Clamp Experiments,” in *Single-Channel Recording*, E. Sakmann Bert and Neher, Ed. Boston, MA: Springer US, 1995, pp. 147–153. doi: 10.1007/978-1-4419-1229-9_6.
- [70] E. Neher and A. Marty, “Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 79, no. 21, Nov. 1982, doi: 10.1073/pnas.79.21.6712.
- [71] E. Marty Alain and Neher, “Tight-Seal Whole-Cell Recording,” in *Single-Channel Recording*, E. Sakmann Bert and Neher, Ed. Boston, MA: Springer US, 1995, pp. 31–52. doi: 10.1007/978-1-4419-1229-9_2.
- [72] F. J. Sigworth, “Electronic Design of the Patch Clamp,” in *Single-Channel Recording*, Boston, MA: Springer US, 1995. doi: 10.1007/978-1-4419-1229-9_4.
- [73] K. D. Gillis, “Techniques for Membrane Capacitance Measurements,” in *Single-Channel Recording*, E. Sakmann Bert and Neher, Ed. Boston, MA: Springer US, 1995, pp. 155–198. doi: 10.1007/978-1-4419-1229-9_7.

- [74] C. M. Armstrong and W. F. Gilly, “[5] Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping,” 1992. doi: 10.1016/0076-6879(92)07007-B.
- [75] Y. Gong *et al.*, “Mechanism Underlying Initiation of Paroxysmal Atrial Flutter/Atrial Fibrillation by Ectopic Foci,” *Circulation*, vol. 115, no. 16, Apr. 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.656504.
- [76] B. F. Grewe, D. Langer, H. Kasper, B. M. Kampa, and F. Helmchen, “High-speed in vivo calcium imaging reveals neuronal network activity with near-millisecond precision,” *Nat Methods*, vol. 7, no. 5, pp. 399–405, May 2010, doi: 10.1038/nmeth.1453.

Capítol 3.
Escala cel · lunar

Capítol 3. Escala cel · lular

3.1 Introducció

En aquest capítol es presenta un mètode no invasiu per a l'anàlisi simultània de la contractilitat i l'activitat de calci en cardiomiòcits aïllats. S'avalua la contractilitat espontània dels cardiomiòcits, és a dir, quan no es troben sotmesos a cap tipus d'estimulació externa. Per fer-ho, s'utilitza una anàlisi de vídeo basada en l'algorisme de correlació digital d'imatges (DIC) per estimar propietats contràctils en els cardiomiòcits aïllats durant les fases de contracció com: els camps de desplaçaments, les deformacions (*strains*), i la longitud del sarcolemma. El sistema permet correlacionar les propietats contràctils obtingudes amb el senyal de calci, Ca^{2+} , mitjançant imatge de calci (*calcium imaging*) on s'utilitzen marcadors fluorescents sensibles al calci.

El mètode proposat en aquest capítol per a l'anàlisi simultània de la contracció i el calci intracel · lular és un mètode de baix cost, no invasiu i sense etiquetes (*label-free method*), no requereix l'etiquetatge de les dades per part d'un expert, i presenta grans avantatges quan s'utilitza en registres de llarga durada, ja que aquest tipus de mesura no invasiva elimina les possibles perturbacions introduïdes al cardiomiòcit en contracció.

La validació de robustesa de l'algorisme es fa amb tres desplaçaments (desplaçament rígid, rotació rígida, deformació) utilitzant dades augmentades sintèticament a partir d'imatges reals del cardiomiòcit. Així, en primer lloc, s'aplica un desplaçament rígid simulat de la imatge de referència, després una rotació i, finalment, una deformació lineal controlada de la imatge de referència que simula una deformació realista del cardiomiòcit.

3.1.1 Importància de l'activitat contràctil

Avui dia, les malalties cardiovasculars són la principal causa de mort als Estats Units (Lloyd-Jones. 2006, McClellan et al. 2019, Roth et al. 2020) amb una incidència aproximada de 10 per 1000 habitants entre les persones majors de 65 anys (Jessup and Brozena. 2003), però malauradament, els trasplantaments de cor estan limitats pel nombre de donants de cor disponibles (Jessup and Brozena. 2003, Patel and Kobashigawa. 2011). Per tant, les estructures de teixit cardíac de bioenginyeria ofereixen noves opcions per restaurar i comprendre la funció cardíaca (Jara Avaca et al. 2017, Chingale et al. 2021). A causa de la

limitada capacitat proliferativa dels cardiomiòcits primaris humans (Soonpaa and Field. 1998) i que els teixits de models animals presenten l'inconvenient que la seva fisiologia difereix de la del múscul cardíac humà, aquí s'han utilitzat cèl·lules mare pluripotents induïdes humanes (hiPSCs) (Takahashi et al. 2007, Yu et al. 2007, Paige et al. 2010, Lian et al. 2012, Zhang et al. 2012) i les cèl·lules mare embrionàries humanes (hESCs) (Thomson et al. 1998) poden fer front a aquests desafiaments, ja que aquestes cèl·lules produeixen un nombre il·limitat de cardiomiòcits, degut a que tenen una capacitat il·limitada d'autorenovació i diferenciació multilínia (Zhang et al. 2009, Kehat et al. 2001) i es poden mantenir durant mesos en cultiu (Mummery et al. 2012, Lian et al. 2013, BurrIDGE, et al. 2014). Les cèl·lules mare no només superen la viabilitat cel·lular primària i les diferències fisiològiques amb els models animals, sinó que també permeten fer estudis electrofisiològics i de contractilitat mecànica sota diferents respostes patològiques o farmacològiques. Per tant, les cèl·lules mare s'utilitzen àmpliament en investigació i teràpia en diverses aplicacions, com ara: teixit cardíac de bioenginyeria (Shimizu et al. 2016, Hashimoto et al. 2016), descobriment i assaig de fàrmacs (Pollard et al. 2008), detecció de toxicitat (Blair and Pruitt. 2020), modelatge de malalties cardíques, reparació basada en cèl·lules mitjançant trasplantament a l'hoste (Laflamme et al. 2017) o correlació amb el calci intracel·lular.

El flux sanguini permanent al cor és responsabilitat dels cardiomiòcits. Quan aquests es contrauen, les capes musculars es comprimeixen i les cavitats del cor es recargolen bombejant sang a l'organisme (Parker et al. 2007, Chabiniok et al. 2016), seguint la llei de Frank-Starling (Glower et al. 1985), que estableix que es produeix un augment de l'activitat contràctil del cor en resposta a un augment del volum sanguini. La insuficiència cardíaca afecta la capacitat de les cèl·lules cardíques per contraure's i relaxar-se, cosa que fa que el cor sigui incapaç de bombar sang de manera eficaç per satisfer les demandes de l'organisme, i pot provocar estenosi mitral i fibril·lació auricular (Braunwald and J. Ross. 1964). Per tant, hi ha una diferència significativa en la força contràctil entre les cèl·lules normals i les de la insuficiència cardíaca (Yelamarty et al. 1992). Així doncs, és molt important poder mesurar no només els efectes electrofisiològics, sinó també els canvis en les propietats contràctils dels cardiomiòcits unicel·lulars, ja que poden ajudar-nos a establir les bases per comprendre el mecanisme de la insuficiència cardíaca en cèl·lules patològiques que es produeix a nivell cel·lular i molecular (Yin et al. 2005, Hazeltine et al. 2012), així com els canvis en la contractilitat dels cardiomiòcits en resposta a fàrmacs cardiotòxics. Des de l'observació dels efectes cardiotòxics a llarg termini d'alguns fàrmacs sobre l'estructura i la funció cel·lular del cardiomiòcit, hi ha un interès creixent per fer estudis de cardiotoxicitat in vitro utilitzant cèl·lules

mare (Blair and Pruitt. 2020). A més, les arrítmies cardíques degudes a reaccions adverses secundàries als fàrmacs són una de les principals causes de la seva retirada del mercat (Pollard et al. 2008). Això significa que el desenvolupament i la validació de mètodes precisos per analitzar l'activitat mecànica dels cardiomiòcits (CM) seran molt valuosos tant pel sector sanitari com pel farmacèutic.

3.1.2 Acoblament d'excitació-contracció

En aquest apartat s'explica de manera resumida la fisiologia cardíaca de la contracció dels cardiomiòcits per poder entendre els mecanismes que generen la contracció cel·lular que volem mesurar.

L'ió calci, Ca^{2+} , és el principal ió de control en els processos fisiològics, i també és el responsable de regular l'activitat contràctil dels cardiomiòcits. El calci entra al citosol a través dels canals de calci dependents de voltatge, *calcium voltage-gated channels*, que s'obren quan es produeix un canvi de polaritat a la membrana cel·lular (sarcolemma) per l'arribada d'un potencial d'acció cardíac. El cardiomiòcit disposa d'un reservori específic destinat a emmagatzemar el ions calci, que s'anomena reticle sarcoplasmàtic, *sarcoplasmic reticulum* (SR) (veure Fig. 3.1).

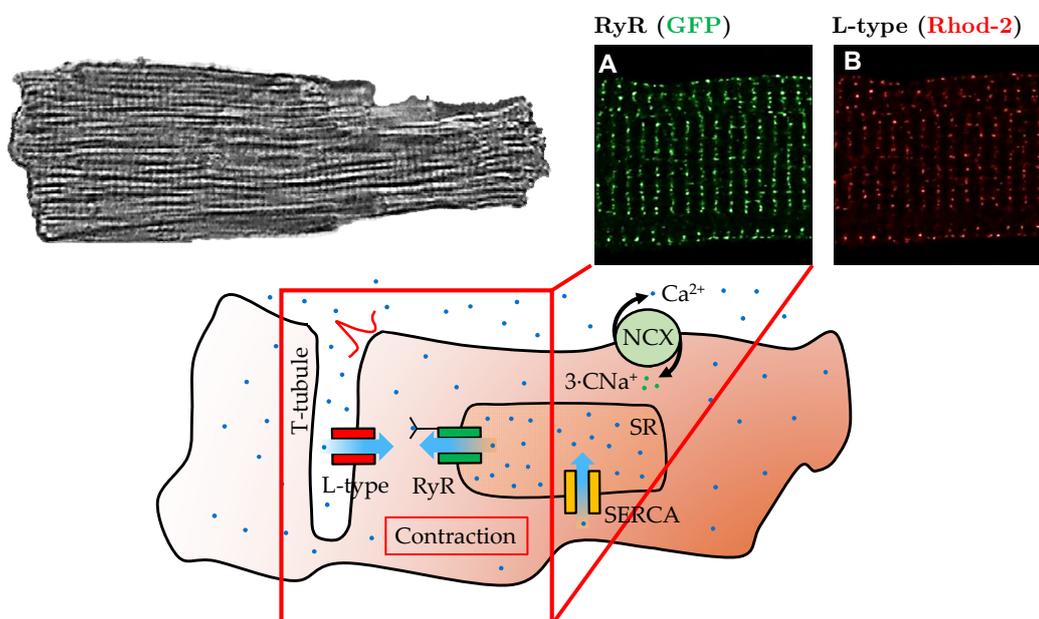


Fig. 3.1. Acoblament excitació-contracció (ECC) al cardiomiòcit.

L'augment del nivell de calci intracel·lular inicia un mecanisme de realimentació positiva anomenat acoblament d'excitació-contracció, *excitation-contraction coupling* (ECC) (Bers. 2002). Així, a mesura que augmenta el calci

intracel·lular, s'obren els receptors de rianodina (*Ryanodine Receptors*, RyRs) que són els responsables d'alliberar el calci emmagatzemat en l'SR al citosol través d'un procés que s'anomena alliberament de calci induït pel calci, *Calcium-Induced Calcium-Release* (CICR).

Els receptors de rianodina són uns canals de calci dependents del lligand de calci, que fan sortir de manera passiva ions de calci fora del reticle a causa d'una diferència de gradient, ja que la concertació de calci en el citosol és més elevada que la concentració en el lumen del reticle sarcoplasmàtic. (Fabiato. 1983, Bers. 2002). En els cardiomiòcits trobem els receptors de rianodina de tipus 2 (RyR2). A més, el reticle sarcoplasmàtic disposa d'una bomba activa o bomba d'ATPasa anomenada, bomba d'ATPasa de calci del reticle sarcoplasmàtic (SERCA), que durant la relaxació de la cèl·lula s'encarrega de regular la concentració de calci dins el reticle sarcoplasmàtic (SR) (Scoote. 2002, Roderick et al. 2003, Peng et al. 2016). En última instància, l'augment generalitzat de la concentració de calci intracel·lular activa la maquinària de contracció cardíaca que farà que el calci s'uneixi amb la proteïna troponina C provocant el solapament entre les proteïnes contràctils d'actina i miosina. A mesura que s'uneixen més caps de miosina als filaments d'actina, es produeix un augment de la força produïda pel cardiomiòcit. Això és cert per als cardiomiòcits sans, però en canvi, els cardiomiòcits patològics resultants d'infart de miocardi (atac de cor), cardiomiopaties o cardiotoxicitat, poden presentar una reducció del nombre de caps de miosina units als filaments d'actina i provocar una menor força de contracció cel·lular (Mulieri et al. 1992, Witjas-Paalberends. et al 2013, Vikhorev i Vikhoreva. 2018, Ujfalusi. et al. 2018, Cuomo. et al. 2019). Llavors, els cardiomiòcits no són capaços de produir la despesa cardíaca (*cardiac output*) i provoquen una insuficiència cardíaca. L'homeòstasi de calci intracel·lular es garanteix amb unes altres bombes, ubicades al sarcolemma, que s'anomenen intercanviadors de sodi-calc, (*Sodium-calcium exchanger*, NCX) i tenen la capacitat de transportar tres ions de sodi dins la cèl·lula i un ió de calci fora de la cèl·lula contra el seu gradient, aprofitant el gradient electroquímico del sodi, i per tant, sense consum d'energia.

3.2 Estat de l'art en mesures de contracció de cardiomiòcits

En aquesta secció, es revisen les diferents tècniques actualment disponibles per avaluar la contractibilitat en cardiomiòcits, amb especial atenció als avantatges, desavantatges i les diferents mesures que proporciona cada tècnica.

3.2.1 Microscòpia de força de tracció (TFM)

Tradicionalment, l'avaluació de les característiques mecàniques dels cardiomiòcits ha requerit tècniques invasives que requereixen molt de temps i que comporten una contaminació de la mostra. El 1980, Harris et al. (Harris et al. 1980) van observar que les cèl·lules adherents, com els CM, exercien importants forces de tracció sobre el seu entorn. Des d'aquest descobriment, s'han realitzat diverses millores relacionades amb el rigor matemàtic i la ciència dels materials en allò que es coneix com a microscòpia de força de tracció (*Traction Force Microscopy*, TFM). La TFM ha estat un dels mètodes més estesos per avaluar les forces de tracció exercides per cèl·lules individuals. En el mètode TFM, la cèl·lula es cultiva en un substrat linealment elàstic que conté marcadors de referència (veure Fig. 3.2), que solen ser perles fluorescents (0,05-0,5 μm de diàmetre) (Wang et al. 2007). A continuació, s'adquireixen dues imatges del substrat, una mentre el substrat està sotmès a forces de tracció cel·lular (substrat amb tensió) i una imatge de referència del substrat després de separar la cèl·lula amb tripsina o fer una lisis cel·lular amb un detergent (substrat sense tensió) (Neu and Genin. 2014, Wei et al. 2020).

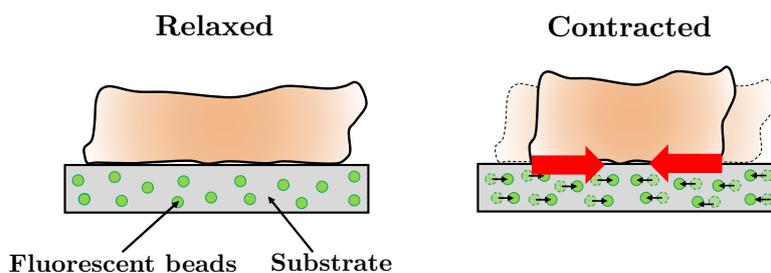


Fig. 3.2. Principi de funcionament de la tècnica de microscòpia de força de tracció (TFM) per a mesurar desplaçaments en una cèl·lula.

Per contra, quan s'utilitza TFM en cardiomiòcits, s'utilitza com a imatge de referència el substrat amb la cèl·lula relaxada adherida i després s'avalua el desplaçament del substrat durant la contracció. (Hazeltine et al. 2012, Hersch et al. 2013, Pasqualini et al. 2018, Wheelwright et al. 2018). El desplaçament del substrat induït pel batut cel·lular es mesura rastrejant els desplaçaments al pla de les perles fluorescents entre les dues imatges, l'actual i la de referència,

utilitzant mètodes òptics com; correlació d'imatges o rastreig de partícules per mesurar el camp de desplaçament de les perles fluorescents (Tseng. et al. 2012). Els materials més utilitzats per al substrat són la membrana de silicona, la poliacrilamida, el polietilenglicol o el polidimetilsiloxà (PDMS), fabricats normalment amb una rigidesa nativa de 1-30 *kPa* i una superfície funcionalitzada amb proteïnes de la matriu extracel·lular (ECM) per el cultiu cel·lular (Butler et al. 2002, Bhana. et al. 2010, Dou et al. 2022). La rigidesa del substrat és un factor clau, ja que afecta la quantitat de força generada per les cèl·lules mare dels cardiomiòcits (Hazeltine. et al 2012, Ribeiro et al. 2015, Wheelwright et al. 2018). Per tant, és important tenir una rigidesa del substrat similar a la del cardiomiòcit fisiològic. A més, el 2005 Shizhuo et al. van demostrar que el desplaçament d'un cardiomiòcit unicel·lular es podia mesurar utilitzant fiducials magnètics i aplicant un camp magnètic (Yin et al. 2005).

A partir del mètode TFM es poden obtenir diversos paràmetres mecànics, com ara: desplaçament horitzontal, camp de desplaçament, camp de deformació, camp de força, freqüència de batec o velocitat de contracció.

3.2.2 Microscòpia de força atòmica (AFM)

La microscòpia de força atòmica (*Atomic Force Microscopy*, AFM) va ser desenvolupada a principis de la dècada de 1980 al centre de recerca d'IBM a Zuric, per un equip dirigit per Gerd Binnig i Heinrich Rohrer, que van rebre el Premi Nobel de Física el 1986 pel seu treball. La microscòpia de força atòmica (AFM) consisteix en un voladís (*cantilever*) que està en contacte amb la superfície d'una mostra (*sample*).

La desviació del voladís de la seva posició d'equilibri es pot utilitzar per estimar les propietats morfològiques i mecàniques de la mostra sotmesa a assaig. Avui dia, la microscòpia de força atòmica (AFM) és una de les principals eines aplicades en biologia per mesurar les propietats mecàniques cel·lulars derivades de la deflexió del voladís en contacte amb una cèl·lula (veure Fig. 3.3), com ara: desplaçament vertical, força vertical, morfologia superficial, elasticitat, plasticitat o comportament adhesiu (Dou et al. 2022).

En el mètode d'AFM aplicat a cèl·lules, el voladís es troba en contacte amb la superfície de la cèl·lula on es projecta un feix làser. El moviment cel·lular indueix fluctuacions al cantilever, que es detecten mesurant el desplaçament del

feix làser reflectit amb un fotodíode de quatre quadrants (*quadrant photodetector*, QPD).

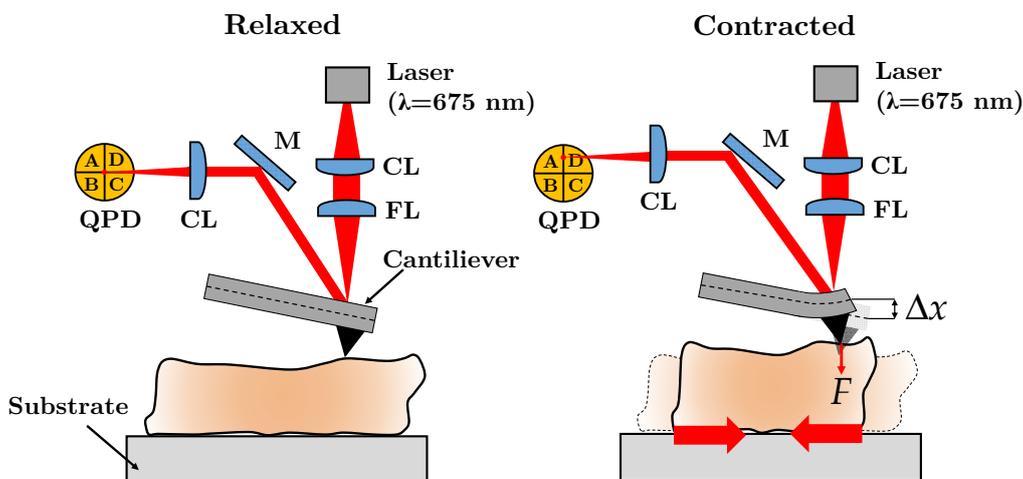


Fig. 3.3. Principi de funcionament de la tècnica de microscòpia de força atòmica (AFM) per a mesurar desplaçaments en una cèl·lula.

La força en direcció vertical (veure Fig. 3.4), F , es quantifica mitjançant la llei de Hooke:

$$F = k_{\text{cant}} \cdot \Delta x \quad (3.1)$$

On

k_{cant} és la constant de molla del voladís.

Δx és el desplaçament del voladís mesurat pel fotodíode QPD.

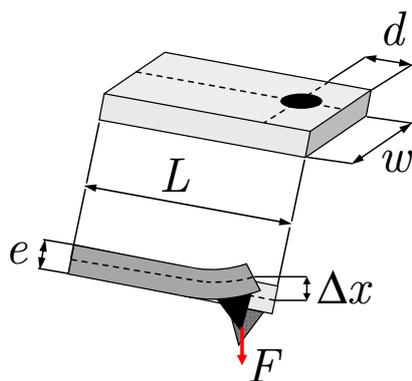


Fig. 3.4. Paràmetres geomètrics del voladís en un sistema d'AFM.

Si es coneixen les dimensions físiques del voladís, la seva constant de la molla, k_{cant} , es pot calcular mitjançant la següent equació (Clifford and Seah. 2005, ISO 11775. 2015):

$$k_{\text{cant}} = \frac{E \cdot w \cdot e^3}{4 \cdot (L - d)^3} \quad (3.4)$$

On

k_{cant} és la constant de molla del voladís.

E és el mòdul de Young (pel Si, $E= 140\text{-}180 \text{ GPa}$).

w és l'amplada del voladís ($20\text{-}30 \mu\text{m}$).

e és l'espessor o gruix del voladís ($4\text{-}5 \mu\text{m}$).

L és la longitud del voladís ($100\text{-}130 \mu\text{m}$).

d és la distància entre la posició de la punta i l'extrem lliure del voladís.

Els estudis en cardiomiòcits utilitzant la tècnica AFM s'han centrat principalment en: avaluar-ne els defectes de contracció (Sun et al. 2012, Yoshikawa et al. 2013), avaluar-ne els efectes o citotoxicitat de fàrmacs (Chen et al. 2016) i investigar la relació entre la contracció i la concentració de calci intracel·lular (Liu et al. 2012). No obstant això, l'AFM és una tècnica àmpliament utilitzada per a la caracterització mecànica de les cèl·lules però té diversos desavantatges quan s'utilitza en un cardiomiòcit. Atès que la tècnica d'AFM només permet mesurar desplaçaments a l'eix vertical z , en un cardiomiòcit bategant només podem mesurar el desplaçament vertical i la força vertical (força de batec, *beating force*) (Domke et al. 1999, Nishimura et al. 2004, Gaitas et al. 2015). La tècnica d'AFM no és adequada per a estudis a llarg termini perquè les mesures impliquen un contacte directe entre la cèl·lula i el cantilever de l'eix z , i la seva naturalesa invasiva suposa un risc inevitable per a la vitalitat i la viabilitat del múscul, i pot pertorbar altres mesuraments, com ara la dinàmica del calci intracel·lular. (Ahola et al. 2014). A més, el contacte directe del voladís amb el cardiomiòcit pot estimular mecànicament la cèl·lula i provocar patrons de batec desordenats no desitjats i fins i tot el cessament ocasional de la contracció (Sun et al. 2012). La reducció de la profunditat d'indentació del cantilever al cardiomiòcit en $10\text{-}30 \text{ nm}$ s'ha revelat per minimitzar eficaçment els trastorns al batec (Liu et al. 2012). Com a darrer inconvenient, l'heterogeneïtat espacial s'ha posat de manifest quan les forces de contracció vertical o els desplaçaments es mesuren a diferents llocs del cardiomiòcit. Per tant, cal fer una mitjana dels valors de contractilitat registrats en múltiples localitzacions del cardiomiòcit per obtenir una mesura més precisa (Liu et al. 2012). Es poden obtenir diversos paràmetres mecànics a partir del mètode d'AFM, com ara: desplaçament vertical, força vertical (força de batec), freqüència de batec, velocitat de contracció i morfologia del cardiomiòcit (Basoli et al. 2018). Tot i això, l'AFM no és el mètode d'elecció per estudiar la mecanobiologia dels cardiomiòcits a causa de la impossibilitat de mesurar les

forces laterals i la complexitat de mesurar els canvis en la força de batec amb la deflexió del cantilever (Hutter i Bechhoefer.1993, Yadav et al. 2020).

3.2.3 Microfabricació

Tot i l'existència de diferents tipus de sistemes micromecànics per avaluar la contractilitat cel·lular (Tan et al. 2003, Zhao et al. 2006, Fu et al. 2010, Kim et al. 2011), actualment encara hi ha poques estructures destinades a mesurar les forces contràctils generades per cardiomiòcits aïllats (Tanaka et al. 2006, Zhao et al. 2006, Kim et al. 2011, Taylor et al. 2013, Rodríguez et al. 2014, Ribeiro et al. al 2015, Beussman et al 2016, Zhang et al 2018). En el cas dels cardiomiòcits, els micropilars (μ pillars) estan fets de material biocompatible i d'alta compliància mecànica, com elastòmers de silicona-polidimetilsiloxà (silicona-PDMS). En aquest cas, les cèl·lules de cardiomiòcits es cultiven a la part superior, i s'adhereixen i s'estenen per les puntes de múltiples micropilars (Dou et al. 2022) (veure Fig. 3.5). No obstant això, els cardiomiòcits es disposen isotròpicament (McCain et al. 2014, Van Delft et al. 2008), provocant una menor flexió mecànica i desplaçaments relativament petits durant la contracció.

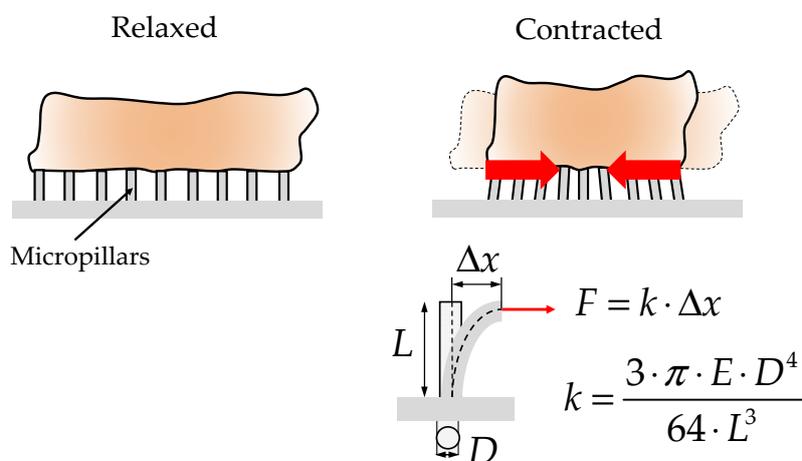


Fig. 3.5. Principi de funcionament de la tècnica de microfabricació per a mesurar desplaçaments en una cèl·lula.

Alguns autors han proposat la creació de patrons o rugositats a la superfície (*surface patterning*) de les matrius de micropilars, ja que milloren els desplaçaments de contracció en augmentar l'adhesió física i l'alineació cel·lular dels cardiomiòcits. Per exemple, si s'afegeixen alguns microsolcs (*μgrooves*) a la part superior dels pilars, fent que els cardiomiòcits alineïn la contracció en una direcció fixa, augmenta la contractilitat de les cèl·lules. (You et al. 2014, Oyumbaatar et al. 2016). També s'han creat micropilars amb forma de bolet

(*mushroom-shaped*) per augmentar l'àrea d'adhesió del cardiomiòcit i la polimerització dels filaments d'actina (Oyunbaatar et al 2016).

El desplaçament del cardiomiòcit es pot estimar en un vídeo que mesura el desplaçament del pilar a cada fotograma durant una contracció respecte a una posició de referència (You et al. 2014). La creació dels micropilars és laboriosa i requereix la fabricació d'un motlle, amb litografia tova o impressió 3D. Un cop fabricat però, és relativament senzill obtenir la part positiva del motlle abocant un material elastomèric i relativament estable en comparació dels substrats de TFM, que canvien la seva rigidesa apreciablement en una setmana (Denisin i Pruitt. 2016). La força de desplaçament del micropilar a la direcció horitzontal, F , es pot quantificar mitjançant la llei de Hooke (Beussman et al. 2016):

$$F = k_{\mu\text{pill}} \cdot \Delta x \quad (3.5)$$

On

$k_{\mu\text{pill}}$ és la constant de molla del micropilar.

Δx és el desplaçament del micropilar.

En un micropilar cilíndric, sense patró de superfície, la constant de molla del micropilar, $k_{\mu\text{pill}}$, es pot calcular si es coneixen les dimensions físiques del micropilar cilíndric mitjançant l'equació següent (Chandurkar et al. 2022):

$$k_{\mu\text{pill}} = \frac{3 \cdot \pi \cdot E \cdot D^4}{64 \cdot L^3} \quad (3.6)$$

On

$k_{\mu\text{pill}}$ és la constant de molla del micropilar.

E és el mòdul de Young (pel PDMS, $E= 360\text{-}870 \text{ KPa}$).

D és el diàmetre del micropilar.

L és la longitud del micropilar.

Amb el mètode de microfabricació, es poden obtenir els mateixos paràmetres mecànics del TFM de manera menys invasiva. El càlcul del desplaçament i la força mitjançant microfabricació és senzill i menys intensiu des del punt de vista computacional en comparació del TFM o els mètodes basats en vídeo (Roca-Cusachs et al. 2017). Tot i això, determinar la rigidesa exacta dels micropilars en condicions fisiològiques no és senzill, ja que tenen una rigidesa efectiva fora del pla que és un ordre de magnitud més rígid que la rigidesa en el pla (Blair and Pruitt. 2020). A més, els micropilars tenen una biointerfície discontinua on les cèl·lules poden enfonsar-se o fins i tot engolir els micropilars depenent de l'estratègia de funcionalització proteica utilitzada. Es poden obtenir diversos

paràmetres mecànics a partir del mètode de microfabricació, com ara: camp de desplaçament, camp de deformació, camp de força, freqüència de batut o velocitat de contracció (Basoli et al. 2018).

3.2.4 Pinces òptiques

La primera referència a l'atrapament òptic (*optical trapping*) data del 1970, quan Arthur Ashkin, dels Laboratoris Bell, va demostrar experimentalment la possibilitat d'atrapar òpticament partícules dielèctriques en aire o aigua enfocant un raig làser a través de la lent d'un microscopi (Ashkin. 1970). El 1986 va desenvolupar el primer dispositiu de pinces òptiques (Ashkin et al. 1986, Ashkin et al. 1987). Les pinces òptiques (*optical tweezers*) permeten atrapar, moure i aplicar una força calibrada sobre partícules microscòpiques. També permeten mesurar el desplaçament d'una partícula o microesfera. En una configuració de pinces òptiques, el medi circumdant sempre absorbeix part de la llum dispersada, per la qual s'utilitza una làser infraroig ($\lambda = 975 \text{ nm}$) perquè la taxa d'absorció a l'aigua i la majoria de mostres biològiques és menor a aquesta longitud d'ona. S'utilitzen microesferes típicament de sílica (SiO_2) o microesferes de poliestirè perquè els seus efectes d'escalfament són mínims, a causa de la taxa d'absorció relativament baixa i de la bona conductància tèrmica amb l'aigua circumdant (Peterman et al. 2003). El diàmetre de les microesferes oscil·la entre 0,2 i 5 μm (Bustamante et al. 2021).

Quan un feix de llum làser enfocat a través d'un objectiu d'alta obertura numèrica (NA) incideix sobre una partícula (típicament NA 1,2-1,4), el moment de la llum canvia en ser absorbida (*absorbed*), reflectida (*reflected*) o dispersada (*scattered*), i refractada (*refracted*). Per a partícules amb un radi, R , molt més gran que la longitud d'ona de la llum làser ($R \gg \lambda$), la partícula es comporta en el règim de Mie o d'òptica de raigs, on la llum incident del raig làser pot tractar-se com una col·lecció de raigs i les forces òptiques que actuen sobre la partícula es poden explicar utilitzant òptica geomètrica de raigs (*geometrical ray-optics*). A més, si l'índex de refracció de la partícula (microesfera) és més gran que el del medi: $\eta_{\text{esfera}} > \eta_{\text{medi}}$, la partícula actua com un objecte refractiu i es produeix una desviació de refracció (*refractive deviation*), que canvia la direcció del feix de llum làser (*laser beam*), donant lloc a un canvi de moment sense absorbir la seva energia. Els fotons del làser transporten energia i moment. El moment lineal d'un fotó ve donat per la relació de Broglie:

$$p = \frac{h}{\lambda_p} \quad (3.7)$$

On

h és la constant de Planck ($6,62 \cdot 10^{-34} J \cdot s$).

λ_p és la longitud d'ona del fotó.

La següent figura Fig. 3.6 mostra un sistema de pinça òptica per mesurar el desplaçament d'una microesfera atrapada en una cèl·lula. La cèl·lula es disposa en un sistema microfluídic que permet perfusionar un fluid de velocitat coneguda.

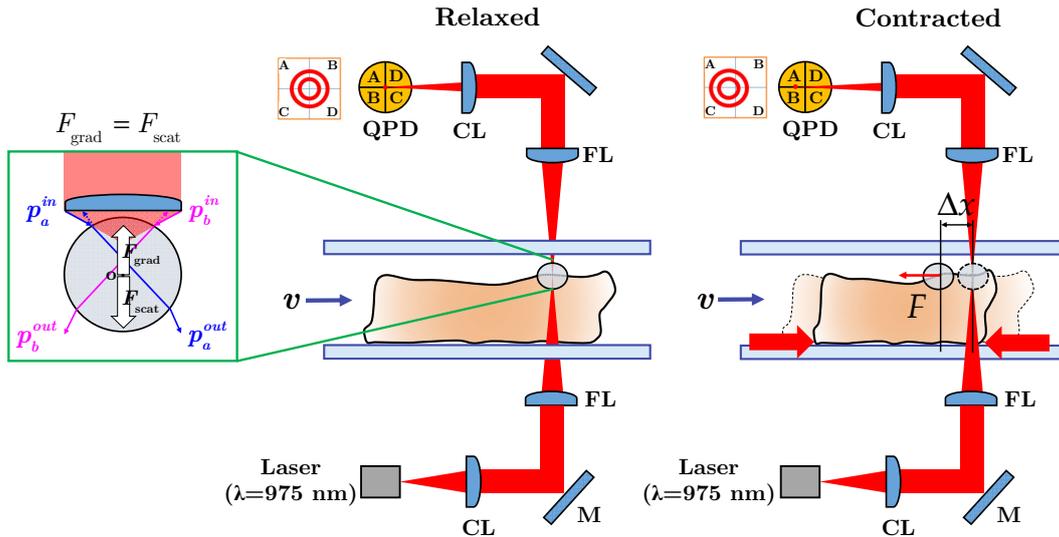


Fig. 3.6. Principi de funcionament de la tècnica de pinça òptica en una cèl·lula.

Els canvis totals de moment (moment net) o impuls, Δp , lliurats a la microesfera pels raigs de llum es poden calcular sumant el canvi de moment associat a cada refracció (Wei et al. 2015), com segueix:

$$\Delta p = \sum_i \Delta p_i \quad (3.8)$$

$$\Delta p_i = \Delta p_i^{in} + \Delta p_i^{out}$$

Com a aproximació, donats dos raigs (raig a i raig b) i amb només dues refraccions (veure Fig. 3.7), obtenim:

$$\Delta p = \Delta p_a + \Delta p_b$$

$$\Delta p_a = \Delta p_a^{in} + \Delta p_a^{out}$$

$$\Delta p_b = \Delta p_b^{in} + \Delta p_b^{out} \quad (3.9)$$

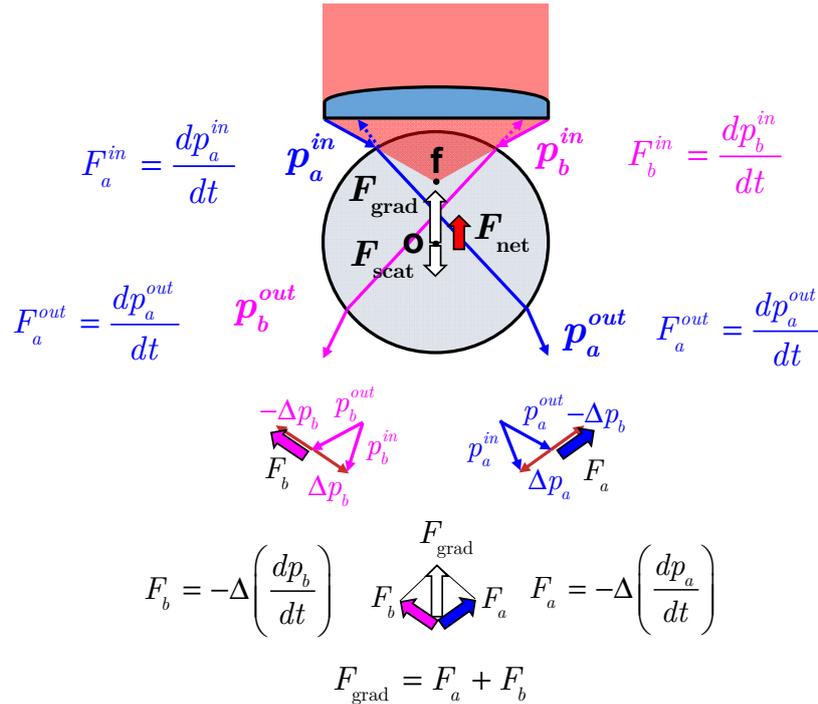


Fig. 3.7. Forces exercides sobre una microesfera.

Utilitzant la segona llei de Newton, la força exercida sobre la microesfera es pot determinar com el canvi de moment de la microesfera en un interval de temps finit:

$$F = \frac{d\Delta p}{dt} \quad (3.10)$$

Si a més l'objecte que interactua amb la llum és prou petit, com una microesfera, la conservació del moment lineal dicta que la taxa de canvi del moment que actua sobre la microesfera ha d'anar acompanyada d'una taxa de canvi del moment idèntica al feix de llum làser, però de signe oposat (Ribezi-Crivellari. 2013, Bustamante et al. 2021):

$$F = -\frac{d\Delta p}{dt} \quad (3.11)$$

La força neta exercida per la llum sobre la microesfera, F_{net} , és la composició de dues forces principals:

$$F_{\text{net}} = F_{\text{grad}} + F_{\text{scat}} \quad (3.12)$$

On

F_{grad} és la força de gradient.

F_{scat} és la força de dispersió.

La força de gradient o força de refracció, F_{grad} , que actua com una força restauradora que atrau la microesfera cap a l'eix x i el punt focal del feix, f . La força de dispersió o força de refracció, F_{scat} , que empeny la microesfera en la direcció de propagació de la llum, contrarestant l'efecte de la força de dispersió. Quan ens trobem al règim de Mie o de l'òptica de raigs ($R \gg \lambda$), s'obté un atrapament estable dels objectes microscòpics quan la força de gradient, F_{grad} , i la força de dispersió, F_{scat} , s'equilibren entre si : $F_{\text{grad}} = F_{\text{scat}}$ (Bustamante et al. 2021). Hi ha molts mètodes per calibrar la rigidesa de la trampa (*trap stiffness*) de la pinça òptica, però el més senzill és el mètode de la força d'arrossegament (*drag force method*), en què la microesfera se sotmet a un flux al llarg de l'eix x de viscositat coneguda i velocitat donada. El flux de fluid circula en una càmera de mostres mitjançant un tub connectat. Les càmeres de mostres solen consistir en un dispositiu microfluídic o dos portamostres (*coverslips*) de microscopi units amb Parafilm fos (Manneville et al. 2012) o enganxats amb cinta adhesiva de doble cara (Peterman et al. 2003). En aquest mètode, la força resultant, F_{ext} , és una combinació de la força exercida per la partícula, $F_{\mu\text{sph}}$, la força d'atrapament, F_{trap} , i la força d'arrossegament viscos, F_{drag} :

$$F_{\text{ext}} = F_{\mu\text{sph}} + F_{\text{trap}} + F_{\text{drag}} \quad (3.13)$$

On

F_{ext} és la força resultant a la microesfera.

$F_{\mu\text{sph}}$ és la força exercida per la microesfera.

F_{trap} és la força d'atrapament de la trampa òptica.

F_{drag} és la força d'arrossegament viscos de la microesfera.

La força de la microesfera, $F_{\mu\text{sph}}$, es pot modelitzar com un simple sistema de massa (*mass-system*) aplicant la primera llei de Newton:

$$F_{\mu\text{sph}} = m_{\mu\text{sph}} \cdot a_{\mu\text{sph}} \quad (3.14)$$

On

$m_{\mu\text{sph}}$ és la massa de la microesfera.

$a_{\mu\text{sph}}$ és l'acceleració de la microesfera.

La força d'atrapament, F_{trap} , és gairebé proporcional al desplaçament de la microesfera aplicat al làser òptic d'atrapament. Es pot modelar com un sistema de molla (*spring-system*) de primer ordre governat per la llei de Hook (Astumian. 2007, Pesce et al. 2020):

$$F_{\text{trap}} = k_{\text{trap}} \cdot \Delta x \quad (3.15)$$

On

F_{trap} és la força d'atrapament de la trampa òptica.

k_{trap} és la rigidesa de la trampa òptica.

Δx és el desplaçament mesurat des del punt focal a l'eix x .

Atès que el moviment de la microesfera es veu impedit per un fluid amortidor viscos, la força d'arrossegament viscos, F_{drag} , que un fluid exerceix sobre una microesfera es pot modelitzar com un sistema amortidor de primer ordre descrit per la següent expressió:

$$F_{\text{drag}} = \gamma_{\text{drag}} \cdot v_{\text{flow}} \quad (3.16)$$

On

γ_{drag} és el coeficient d'amortiment viscos.

v_{flow} és la velocitat del flux.

El coeficient d'amortiment viscos en una partícula esfèrica en un flux viscos amb un baix nombre de Reynolds, ve donat per la llei de viscositat de Stokes (Neuman and Block. 2004):

$$\gamma_{\text{drag}} = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_{\mu\text{sph}} \cdot v_{\text{flow}} \quad (3.17)$$

On

η és el coeficient d'amortiment viscos.

$R_{\mu\text{sph}}$ és el radi de la microesfera.

v_{flow} és la velocitat del flux.

Finalment, la força exercida per una microesfera sota l'acció d'una trampa òptica en un medi perfusionat amb un dissolvent, es pot descriure mitjançant un sistema massa-molla-amortidor (*mass-spring-damper*) de segon ordre:

$$F_{\text{ext}} = m_{\mu\text{sph}} \cdot \ddot{x} + k_{\text{trap}} \cdot \Delta x + \gamma_{\text{drag}} \cdot \dot{x} \quad (3.19)$$

Per a microesferes suficientment petites ($R \sim \mu\text{m}$), el terme inercial és molt menor que el terme d'arrossegament viscos: $|m \cdot a| \ll |\gamma \cdot v|$, en aquestes condicions el sistema es troba sobreemortit i el terme inercial es pot considerar menyspreable (Berg-Sørensen et al., 2004). Coneixent el coeficient d'amortiment viscos, γ_{drag} , i mesurant el desplaçament x podem inferir la rigidesa de la trampa òptica, k_{trap} , al llarg de l'eix x :

$$k_{\text{trap}} = \frac{\gamma_{\text{drag}} \cdot \dot{x}}{\Delta x} \quad (3.20)$$

El desplaçament x de la microesfera en la pinça òptica es detecta mitjançant un detector QPD. Abans de la detecció, hem de focalitzar el raig làser utilitzant una lent convergent.

Els estudis amb pinces òptiques en cardiomiòcits són encara en gran mesura preliminars perquè quan els cardiomiòcits maduren i es tornen contràctils, les seves forces de contracció són de l'ordre dels μN . La força aplicada per una pinça òptica és inferior a $1 \mu N$ per evitar que la llum danyi les cèl·lules. Per tant, les forces exercides per les pinces òptiques són massa petites per manipular un cardiomiòcit contràctil, cosa que fa que aquest mètode no sigui adequat per al seu ús en cèl·lules cardíques contràctils (Yadav et al. 2021, Yang et al. 2022).

3.2.5 Mètodes basats en vídeo

La tendència actual en el mesurament de la contractilitat cel·lular és utilitzar mètodes no invasius, per la qual cosa els mètodes òptics estan prenent protagonisme. Els mètodes òptics es basen en l'enregistrament d'una seqüència de vídeo (normalment $>40 \text{ Hz}$) on una mostra se sotmet a un desplaçament. Un algorisme de processament d'imatges digitals detecta el canvi entre dos fotogrames consecutius i estima el desplaçament dels píxels o el canvi a l'àrea de l'espècimen. Per garantir el funcionament correcte d'aquests algorismes, cal assegurar-se que l'espècimen presenta un patró aleatori que permeti identificar inequívocament el desplaçament d'una determinada regió de píxels entre dos fotogrames consecutius.

Els mètodes òptics han estat àmpliament utilitzats en l'àrea de la Ciència de Materials per mesurar la deformació de la proveta en assaigs mecànics experimentals (tracció, compressió, fatiga, torsió i cisalladura). En els assaigs mecànics experimentals, se sol pintar amb un esprai un patró de partícules aleatòries (*speckles*) per poder utilitzar aquests mètodes òptics, ja que els materials que se solen estudiar tenen una superfície plana o una morfologia amb patrons no característics (Sutton et al. 2009). Els cardiomiòcits tenen estructures amb patrons naturals (sarcòmers, mitocondris, línies z) (Yaniv et al. 2011) que es poden rastrejar durant el moviment mitjançant la il·luminació uniforme de la seva superfície (Zhang and Arola et al. 2003). Tot i que els mètodes basats en vídeo són no invasius i lliures d'etiquetes, per a l'anàlisi de la

contractilitat, encara hi ha poques aplicacions per facilitar els mesuraments de la contractilitat als cardiomiòcits. Una de les primeres publicacions utilitza un detector de contorn analògic per monitoritzar el desplaçament a partir del senyal de la línia d'escombrada del cardiomiòcit (Steadman et al. 1988). L'avantatge dels mètodes òptics per a l'estimació del desplaçament és que superen els problemes de punts d'adhesió focal que trobem a les tècniques de TFM i microfabricació, ja que la cèl·lula no s'adhereix uniformement a tota la superfície delimitada per l'adhesió focal.

Actualment, el mesurament del camp de desplaçament dels cicles de contracció-relaxació en el cardiomiòcit mitjançant mètodes òptics, es basa principalment en mètodes de correlació d'imatges, principalment basats en la correlació digital d'imatges (DIC) (Ahola et al. 2014, Kijlstra et al. 2015, Ribeiro et al. 2017, Sala et al. 2018, Shradhanjali et al. 2019, Cheuk et al. 2020) (veure Fig. 3.8), seguiment de partícules (Estruch-Samper 2012, Rajasingh et al. 2018, Taylor et al. 2010) o algorismes de flux òptic (Kamgoué et al. 2009, Huebsch et al. 2015). A més, les tècniques basades en mètodes de flux òptics són costoses des del punt de vista computacional i poden ser inexactes, amb grans desplaçaments (Lam Po Tang et al. 2019).

Mentre que la gravació de vídeo és senzilla, l'anàlisi d'imatges basat en aquests mètodes és més complexa. Tot i que el camp de desplaçament es pot extreure després de processar les imatges, calen moltes suposicions i equacions constitutives per transformar-lo en mapes de força (Blair and Pruitt. 2020). Això és fonamentalment diferent de les eines d'anàlisi que es basen en l'avaluació del canvi d'àrea durant la contracció o en el mesurament de com varia el contorn a cada fotograma. Per això, en la detecció automàtica del contorn del cardiomiòcit a cada fotograma, se sol utilitzar un algorisme d'umbralització global de la imatge com el mètode d'Otsu (Otsu. 1979).

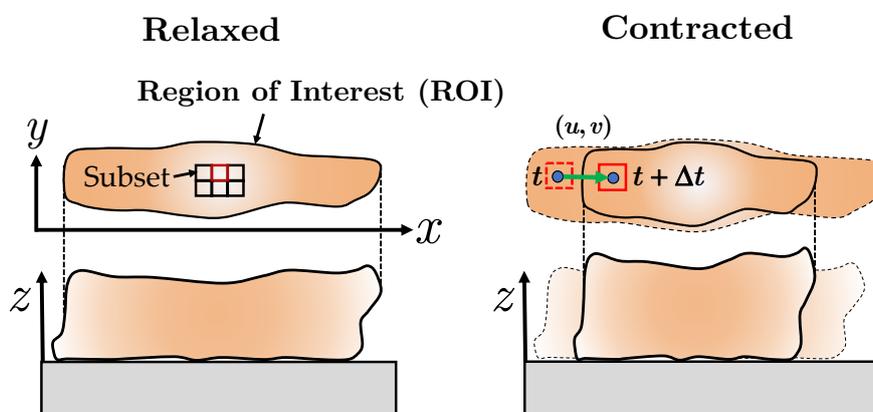


Fig. 3.8. Principi de funcionament de la tècnica de correlació digital d'imatge.

En concret, la tècnica DIC va ser introduïda per primera vegada per Peters i Ranson l'any 1982 (Peters and Ranson. 1982), i malgrat la seva antiguitat és una de les tècniques basades en correlació i més usades.

Sala (Mummery et al. 2017, Sala et al. 2018) proposa l'algorisme MUSCLEMOTION basat en l'avaluació de la contracció d'una cèl·lula fixada mitjançant un enfocament molt simple i intuïtiu que quantifica els canvis absoluts en la intensitat dels píxels entre un fotograma de referència i el fotograma d'interès, de la següent manera: $img_{result} = |img_i - img_{ref}|$, on img_i és el fotograma d'interès, img_{ref} és el fotograma de referència i img_{result} és la imatge resultant.

Altres autors també avaluen el canvi de contorn, però utilitzen descriptors de Fourier per codificar la forma d'un cardiomiòcit bidimensional (Bazan et al. 2009, Bazan et al. 2011). El principal avantatge dels mètodes òptics basats en vídeo és que poden obtenir de manera no invasiva diversos paràmetres mecànics per caracteritzar la contractilitat del teixit cardíac i els cardiomiòcits com: camp de desplaçament, camp de deformació, camp de força, freqüència de batec, velocitat de contracció, àrea del cardiomiòcit i escurçament del sarcòmer (Basoli et al. 2018, Dou et al. 2022). Aquests mesuraments sovint es registren simultàniament amb mesuraments electrofisiològics. Les tècniques de correlació digital d'imatge poden ajudar millorar l'estimulació mecànica, elèctrica i química, fet que podria contribuir al desenvolupament de teixits cardíacs més madurs (Lou et al. 2021).

Els estudis que utilitzen la correlació digital d'imatge per estudiar el teixit cardíac, malgrat que es tracta de una tècnica no invasiva, solen fixar la mostra (Lou et al. 2021). En aquest experiment, la cèl·lula es mou lliurement, per tant, és possible avaluar el moviment del batec espontani del cardiomiòcit.

L'any 2019, Shradhanjali (Shradhanjali et al. 2019) proposa una tècnica DIC que actualitza el contorn en cada fotograma (*frame*), que anomena *Adaptive Reference-Digital Image Correlation* (AR-DIC) i dona lloc a millors resultats respecte a un contorn de la cèl·lula fixe. Tot i que aquesta tècnica també és aplicada a cardiomiòcits amb contracció espontània, la validació de l'algorisme no es realitza amb dades de cèl·lules, sinó amb la base de dades *2D-Challenge 1.0* de la societat de mecànica experimental (*Society for Experimental Mechanics*, SEM). Aquest procediment també actualitza el contorn de la cèl·lula de manera dinàmica.

Malgrat la recerca efectuada, la majoria d'articles no arriben a la resolució completa i realista del problema. Per exemple, les imatges dels cardiomiòcits no són reals, els moviments introduïts són sintètics (imposats per unes funcions matemàtiques), l'estudi es limita als moviments i no a les deformacions, o simplement els resultats són fruit de simulacions.

Per aquesta raó, el present estudi intenta completar la totalitat del procediment de forma realista i coherent:

- Extracció de les imatges reals del cardiomiòcit procedents del microscopi òptic i a la seva velocitat real. Procés de filtrat i reducció del soroll.
- Treball amb la imatge real de la cèl·lula mitjançant la detecció de la seva texturització natural.
- Reconeixement del contorn cel·lular i actualització de la seva forma durant tot el procés.
- Obtenció del camp complet dels desplaçaments i deformacions en funció del temps.
- Càlcul automàtic de la longitud del sarcolemma en funció del temps.
- Correlació de les deformacions i el senyal de calci.

Tot això amb un sistema robust, que admeti que el cardiomiòcit estigui inicialment orientat de qualsevol manera i que els seus moviments i rotacions siguin lliures durant tot el procés.

3.3 Adquisició de les mostres

Per a l'experimentació s'han utilitzat miòcits ventriculars de ratolí (*Mouse Ventricular Myocytes*, MVM) (veure Fig. 3.9). Els miòcits provinents de l'aurícula presenten una forma més arrodonida i allargada, mentre que els miòcits ventriculars tenen una aparença més rectangular i estriada, a més d'una estructura morfològica del reticle sarcoplasmàtic (*sarcoplasmic reticulum*, SR) molt més complexa i ramificada comparada amb els miòcits auriculars. (Bootman et al. 2006). Els miòcits ventriculars tenen també una proporció més elevada de T-túbuls, *T-tubules*, on els receptors de rianodina (RyRs) i els canals de calci tipus-L (*Cav1.2*) se solapen (Chen-Izu et al. 2006). En els miòcits auriculars, l'estructura que substitueix els túbuls T pren el nom de tub axial transversal (*transverse axial tube*). Els RyRs es presenten en agrupacions de 10 a 100 receptors, i en els miòcits ventriculars es distribueixen homogèniament seguint els túbuls T (Chen-Izu et al. 2006, Yano et al. 2006). Per l'experimentació, només es seleccionen els miòcits amb elongació i estriació clarament visible.

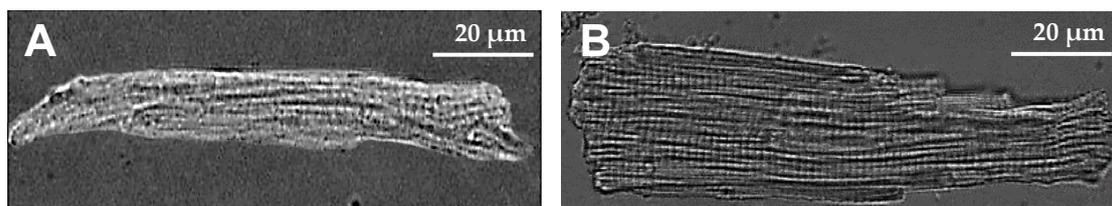


Fig. 3.9. Comparació entre un cardiomiòcit auricular i ventricular de ratolí. **A.** Cardiomiòcit auricular. **B.** Cardiomiòcit ventricular.

Durant l'experimentació s'han registrat simultàniament les imatges de calci en el canal de fluorescència i les imatges de la contracció del miòcit en el canal òptic. Les imatges han estat adquirides amb el microscopi confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanya) amb un objectiu de magnificació nominal de $63\times$ (HCX PL APO 63X) i amb una obertura numèrica, *numerical aperture*, $NA=1.3$ i immersió amb glicerol. S'han adquirit de $N_{samples}=7500$ mostres de dimensió 512×150 píxels amb una freqüència de mostreig de $F_s=83.33$ Hz. La relació píxel a mm es de 0.2832 píxel/mm. El fluo-4 s'excita amb una longitud d'ona de $\lambda_{ex} = 488$ nm i l'emissió de fluorescència es mesura en una de longitud d'ona compresa entre $\lambda_{em} = 480-580$ nm detectada amb el detector de fotons híbrids de Leica (HYD) integrat al microscopi. El miòcits, primer són incubats a temperatura ambient (20 °C) amb una concentració de 2.5 a 5 μM de fluo-4 AM durant $10-20$ min, després es renten, i finalment es deixen en repòs per a fer la de-esterificació durant 30 minuts abans de començar amb l'experimentació. Les imatges registrades són emmagatzemades amb el format

natiu dels microscopis Leica, és a dir, l'extensió *.lif*. Els experiments es van realitzar en una solució salina extracel·lular amb la següent composició fisiològica: 2 mM CaCl₂, 132 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.33 mM NaH₂PO₄, 4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 5 mM glucosa, 5 mM àcid pirúvic. El pH es va ajustar a 7.5 amb NaOH, a temperatura ambient (20 °C). El protocol ha estat aprovat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i compleix la Declaració de principis ètics d'Hèlsinki de l'Associació Mèdica Mundial (*World Medical Association*, WMA).

3.4. Models pel moviment i deformació del cardiomiòcit

En aquest apartat es presenta com, a partir del desplaçaments inferits mitjançant la tècnica de correlació digital d'imatge (DIC), podem obtenir les deformacions del cardiomiòcit a partir de l'aplicació dels principis de la mecànica dels medis continus. La mecànica dels medis continus és un model matemàtic per estudiar la deformació de qualsevol tipus de material (Mase et al. 2010, Ayneto i Ferrer. 2014), i és aplicable també a la descripció matemàtica del moviment i la deformació del cardiomiòcit. El fet de tractar els materials com a sistemes continus suposa un gran avantatge, ja que ens permet utilitzar les eines matemàtiques clàssiques de les funcions contínues, com ara la diferenciació. A més, a la pràctica, la justificació fonamental és que les prediccions realitzades utilitzant la mecànica dels medis continus concorden amb les observacions i mesures reals (Rudnicki. 2014). En aquest capítol, utilitzarem el supòsit bàsic que el cardiomiòcit és perfectament continu, és a dir, que no hi ha buits ni fissures al seu interior. Pel nostre estudi, no ens calen altres consideracions sobre la seva homogeneïtat o la resposta mecànica del cardiomiòcit.

La Fig. 3.10 mostra el plantejament del problema i la nomenclatura utilitzada en la mecànica dels continus, però aplicada específicament al moviment i la deformació del cardiomiòcit. En general, l'estudi és tridimensional, tot i que en el nostre cas, en treballar amb imatges, el problema esdevé bidimensional. En la mateixa figura es poden observar les dues configuracions del cardiomiòcit.

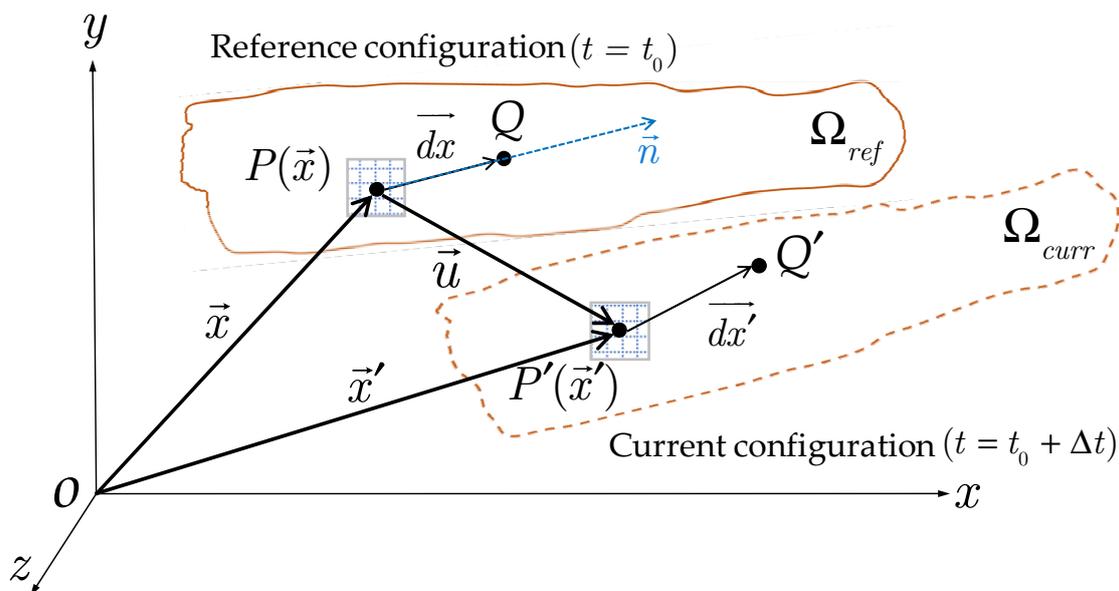


Fig. 3.10. Moviment i deformació del cardiomiòcit. Configuració de referència $t = t_0$ davant de la configuració actual en el temps $t = t_0 + \Delta t$.

En primer lloc, es té la configuració de referència al temps inicial $t=t_0$. Aquesta configuració de referència s'escull adequadament en cada cas. A continuació, la mateixa figura mostra la configuració actual del cardiomiòcit en el temps t . L'increment de temps entre les dues configuracions és $\Delta t = t - t_0$. $P(\vec{x})$ és la posició de la partícula de material, el cardiomiòcit, a la configuració inicial, on \vec{x} és el vector de posició a les coordenades de referència (x, y, z) . Després del moviment i la deformació de la cèl·lula, la següent posició de la mateixa partícula material és $P(\vec{x}')$, on \vec{x}' és el vector de posició a les coordenades actuals (x', y', z') . Així, el moviment de cada partícula de la cèl·lula és el vector \vec{u} , de components (u, v, w) , i es pot calcular com la diferència entre els vectors de posició final i inicial de la següent manera:

$$\vec{u} = \vec{x}' - \vec{x} \quad \vec{u} = \begin{pmatrix} u \\ v \\ w \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x' - x \\ y' - y \\ z' - z \end{pmatrix} \quad (3.21)$$

En aquest estudi es fa una simplificació important pel que fa al moviment de la partícula material $P(\vec{x})$: donades les condicions de contorn en què es troba la cèl·lula, es suposa que els moviments estaran continguts en el pla mitjà de la cèl·lula. En aquest pla mitjà: $z=z'=0$ ($w=0$), i per tant, el vector desplaçament, \vec{u} , es pot simplificar com:

$$\vec{u} = \begin{pmatrix} u \\ v \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x' - x \\ y' - y \end{pmatrix} \quad (3.22)$$

On

u és el desplaçament horitzontal sobre l'eix x .

v és el desplaçament vertical sobre l'eix y .

Altrament, el fet de treballar en un pla tridimensional produiria un augment significatiu de la complexitat experimental per obtenir aquest moviment fora del pla de la superfície externa de la cèl·lula. Per això, requeriria l'ús de tecnologia DIC tridimensional (Pan. 2018), que utilitza dues càmeres instal·lades al microscopi i un procés complex de calibratge addicional. A la pràctica, aquest moviment w es pot considerar negligible per les presents aplicacions. Quan el vector de posició a les coordenades de referència, \vec{x} , s'utilitza com a variable independent, s'anomena descripció material o Lagrangiana (descripció de Green-Lagrange). Així que, aquesta descripció segueix les partícules materials en el temps. En canvi, quan el vector de posició a les coordenades actuals, \vec{x}' ,

s'utilitza com a variable independent, la descripció s'anomena espacial o euleriana (descripció Almansi-Euler). En aquest cas, la descripció analitza el moviment en posicions fixe de l'espai. La nomenclatura utilitzada en aquest capítol es mostra a la Fig. 3.11.

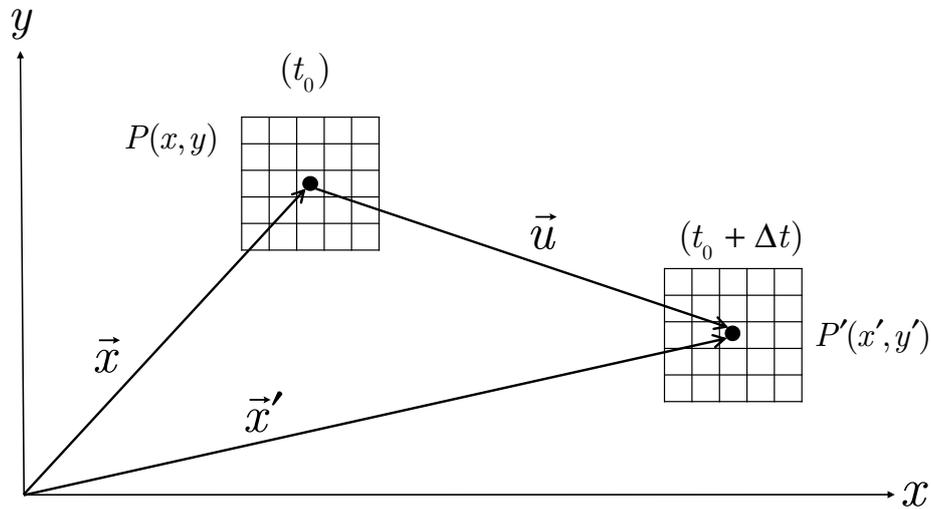


Fig. 3.11. Nomenclatura utilitzada per la descripció del desplaçament.

La **Taula 3.1**, mostra la nomenclatura utilitzada en les variables abans i després de la deformació. Cal tenir en compte, que en condicions ideals d'il·luminació $f(x,y) = g(x',y')$.

Abans de la deformació	Després de la deformació	Descripció
$P(\vec{x})$	$P'(\vec{x}')$	Posició inicial/final de la partícula
x,y	x',y'	Coordenades inicial/ final
$f(x,y)$	$g(x',y')$	Valor de l'escala de grisos inicial/ final (0-255)

Taula 3.1. Taula resum de les variables utilitzades abans i després de la deformació.

Aquest vector de desplaçament, $\vec{u}(\vec{x},t)$, s'utilitza per definir el tensor de deformació de Green-Lagrange, $E(\vec{x},t)$, que descriu l'evolució del desplaçament respecte als eixos x i y , i es defineix com:

$$E(\vec{x},t) = \frac{1}{2} \cdot [(I_d + \nabla \vec{u}(\vec{x},t)^T) \cdot (I_d + \nabla \vec{u}(\vec{x},t)) - I_d] \quad (3.23)$$

On

I_d és la matriu identitat.

$I_d \nabla \bar{u}$ és el tensor gradient de desplaçament de $\bar{u}(\bar{x}, t)$.

Les components transversal, longitudinal i angular d'aquest tensor de deformació de Green-Lagrange, $E(\bar{x}, t)$, es poden representar per les components del camp de desplaçament. Aquestes són funció del temps t i de la posició del punt $P(\bar{x})$ en la configuració de referència del cardiomiòcit. En una representació bidimensional (2D) el tensor de deformació de Green-Lagrange, $E(\bar{x}, t)$, que és simètric i ve donat per:

$$E(\bar{x}, t) = \begin{bmatrix} E_{xx} & E_{xy} \\ E_{xy} & E_{yy} \end{bmatrix} \quad (3.24)$$

A la pràctica, aquests valors són entorn al valor adimensional de 0,015 (15% en termes percentuals) des del principi al final de la contracció. En una formulació que permet calcular les grans deformacions del cardiomiòcit (model de grans deformacions), les components de deformació, E_{ij} , del tensor de deformació de Green-Lagrange, E , per un model de grans deformacions prenen la forma:

$$E(\bar{x}, t) = \begin{bmatrix} E_{xx} & E_{xy} \\ E_{xy} & E_{yy} \end{bmatrix} \quad \begin{aligned} E_{xx} &= \frac{1}{2} \cdot \left(2 \cdot \frac{\partial u}{\partial x} + \left(\frac{\partial u}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial x} \right)^2 \right) \\ E_{yy} &= \frac{1}{2} \cdot \left(2 \cdot \frac{\partial v}{\partial y} + \left(\frac{\partial u}{\partial y} \right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial y} \right)^2 \right) \\ E_{xy} &= \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial x} \cdot \frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} \cdot \frac{\partial v}{\partial y} \right) \end{aligned} \quad (3.25)$$

On

E_{xx} és la deformació longitudinal amb el model de grans deformacions.

E_{yy} és la deformació transversal amb el model de grans deformacions.

E_{xy} és la deformació angular amb el model de grans deformacions.

Ara bé, si el càlcul es realitza entre configuracions relatives properes en el temps, per exemple, en una seqüència de vídeo del moviment del cardiomiòcit, es podria utilitzar les expressions simplificades del tensor de deformació infinitesimal. Aquesta formulació permet calcular les deformacions petites del cardiomiòcit (model de petites deformacions), llavors, les components de deformació, E_{ij} , del tensor de deformació de Green-Lagrange, E , per un model de petites deformacions prenen la forma:

$$E(\vec{x}, t) = \begin{bmatrix} E_{xx} & E_{xy} \\ E_{xy} & E_{yy} \end{bmatrix} \quad \begin{aligned} \varepsilon_{xx} &= \frac{\partial u}{\partial x} \\ \varepsilon_{yy} &= \frac{\partial v}{\partial y} \\ \varepsilon_{xy} &= \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} \right) \end{aligned} \quad (3.26)$$

On

ε_{xx} és la deformació longitudinal amb el model de petites deformacions.

ε_{yy} és la deformació transversal amb el model de petites deformacions.

ε_{xy} és la deformació angular amb el model de petites deformacions.

En la Fig. 3.12, es mostra una representació geomètrica de les deformacions infinitesimals (model de petites deformacions). No obstant això, en el present estudi, s'ha preferit utilitzar el model de grans deformacions del tensor de deformació de Green-Lagrange per tal d'obtenir una major precisió en els càlculs numèrics.

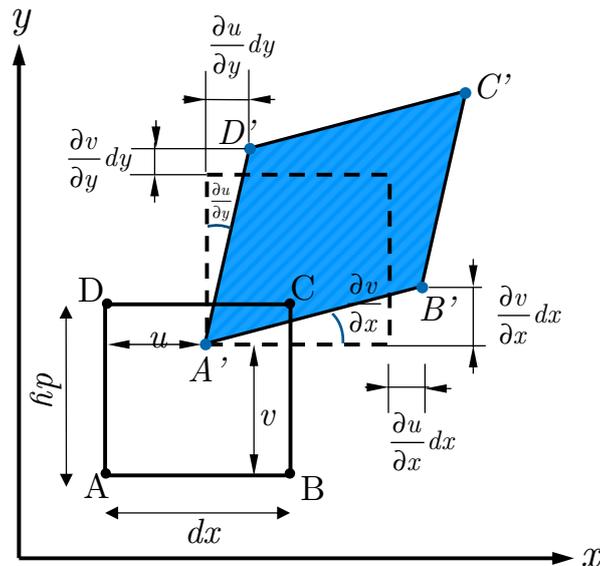


Fig. 3.12. Interpretació geomètrica de les components derivades del tensor de deformació infinitesimal en el pla xy (Cantó-Navés et al. 2021).

El tensor de Green-Lagrange, E , conté informació sobre el valor d'estirament (o relació d'estirament), λ_{stretch} , de la partícula P per a qualsevol direcció d'una línia (Veure Fig. 3.10):

$$\lambda_{\text{stretch}} = \frac{\overline{P'Q'}}{PQ} = \frac{|d\vec{x}'|}{|d\vec{x}|} = \sqrt{1 + 2 \cdot \vec{n} \cdot E \cdot \vec{n}} \quad (3.27)$$

On \vec{n} és un vector unitari en la direcció del segment lineal infinitesimal en la configuració de referència $d\vec{x}$ (Veure Fig. 3.10), i aquest es defineix com:

$$\vec{n} = \frac{d\vec{x}}{|d\vec{x}|} \quad (3.28)$$

Sobre la computació de la deformació, existeix una confusió en la terminologia de deformació Lagrangiana, $E_{\text{Lagrangiana}}$, i deformació Euleriana, $E_{\text{Euleriana}}$, com reporta Amzulescu (Amzulescu et al. 2019) en una revisió sistemàtica de l'aplicació de les tècniques de Correlació d'Imatges Digital (Digital Image Correlation, DIC) al teixit miocàrdic, el que és coneix com imatge de tensió miocàrdica (*myocardial strain imaging*). El motiu de les possibles confusions és per raons històriques, ja que al 1973 Mirsky i Parmley (Mirsky and Parmley. 1973) van utilitzar la deformació Lagrangiana (*Lagrangian strain*) per primera vegada per descriure la deformació del miocardi (*myocardial strain*) que va ser mesurada amb ultrasons amb imatge doppler tissular, equivalent a la velocitat de deformació Euleriana (*Eulerian strain rate*), que és defineix normalment de manera euleriana. Per tant, cal integrar la velocitat de deformació (*strain rate*) per tal d'obtenir la deformació Euleriana en forma logarítmica i després convertir-la en deformació Lagrangiana. Malgrat que és una terminologia consolidada, no és encertat parlar de deformació euleriana. Te més sentit parlar de una deformació lagrangiana actualitzada, i aquesta és la terminologia que serà emprada en aquest capítol (veure Fig. 3.13).

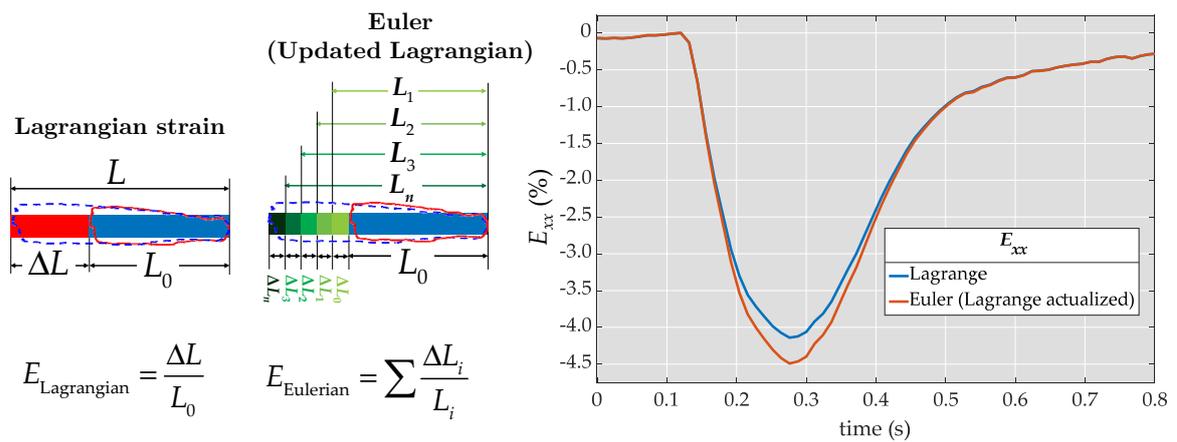


Fig. 3.13. Diferència en el càlcul de la deformació lagrangiana i lagrangiana actualitzada en una contracció representativa d'un cardiomiòcit.

La Fig. 3.14 representa conceptualment els possibles moviments de sòlid rígid de la cèl·lula.

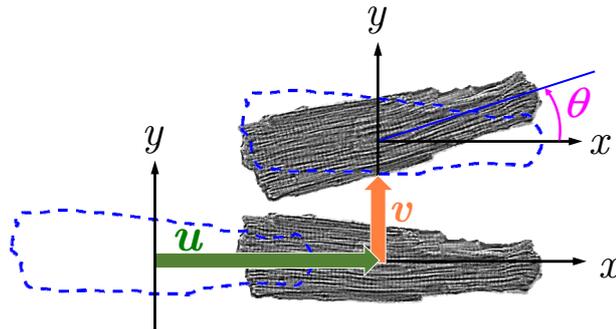


Fig. 3.14. Desplaçament combinat de sòlid rígid u , v i rotació, θ .

És a dir, la cèl·lula es podria moure lliurement sobre el pla d'estudi x - y sense experimentar cap deformació. Per exemple, un moviment lineal sobre l'eix x , notat com a u , un moviment lineal sobre l'eix y , notat com a v , i finalment una rotació θ . Justament, aquest moviment de sòlid rígid haurà de ser eliminat de la nostra anàlisi, ja que no aporta cap informació útil sobre la contractilitat cel·lular.

La Fig. 3.15 representa conceptualment les possibles deformacions de la cèl·lula i que són contemplades a la mecànica clàssica dels medis continus. Així, la cèl·lula podria patir deformacions longitudinals, E_x , segons l'eix x (B), deformacions transversals, E_{yy} , segons l'eix y (C), i també distorsions angulars dels eixos ortogonals x - y de referència, E_{xy} (D). A més, fent una analogia imaginativa respecte una barra prismàtica virtual, d'acord amb Tracqui (Tracqui et al. 2009), el cardiomiòcit podria experimentar una flexió (bending), produint-se una curvatura de la seva fibra central (E).

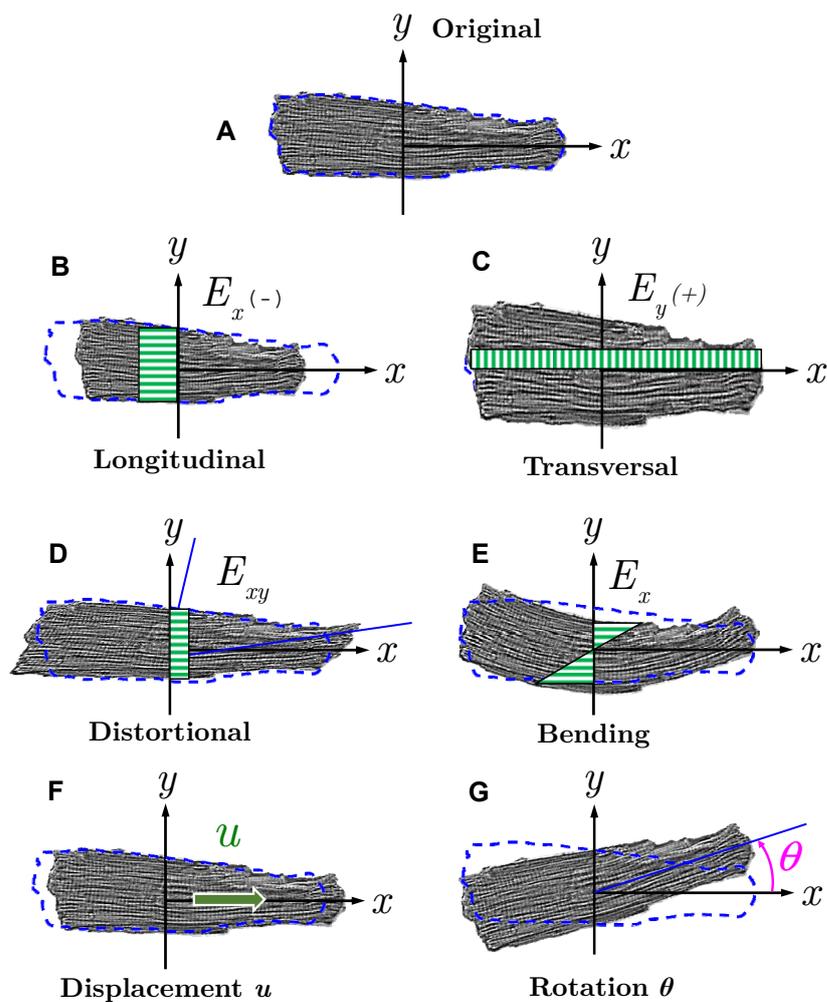


Fig. 3.15. A. Original cardiomiòcit. B. Deformació longitudinal E_{xx} . C. Deformació transversal E_{yy} . D. Deformació angular E_{xy} . E. Flexió (Bending). F. Desplaçament sòlid rígid u . G. Rotació sòlid rígid θ .

3.5. Mètode computacional per l'anàlisi de contracció i calci

En aquest apartat es presenta el sistema computacional, per l'anàlisi simultània de la contractilitat i l'activitat de calci en cardiomiòcits (veure Fig. 3.16).

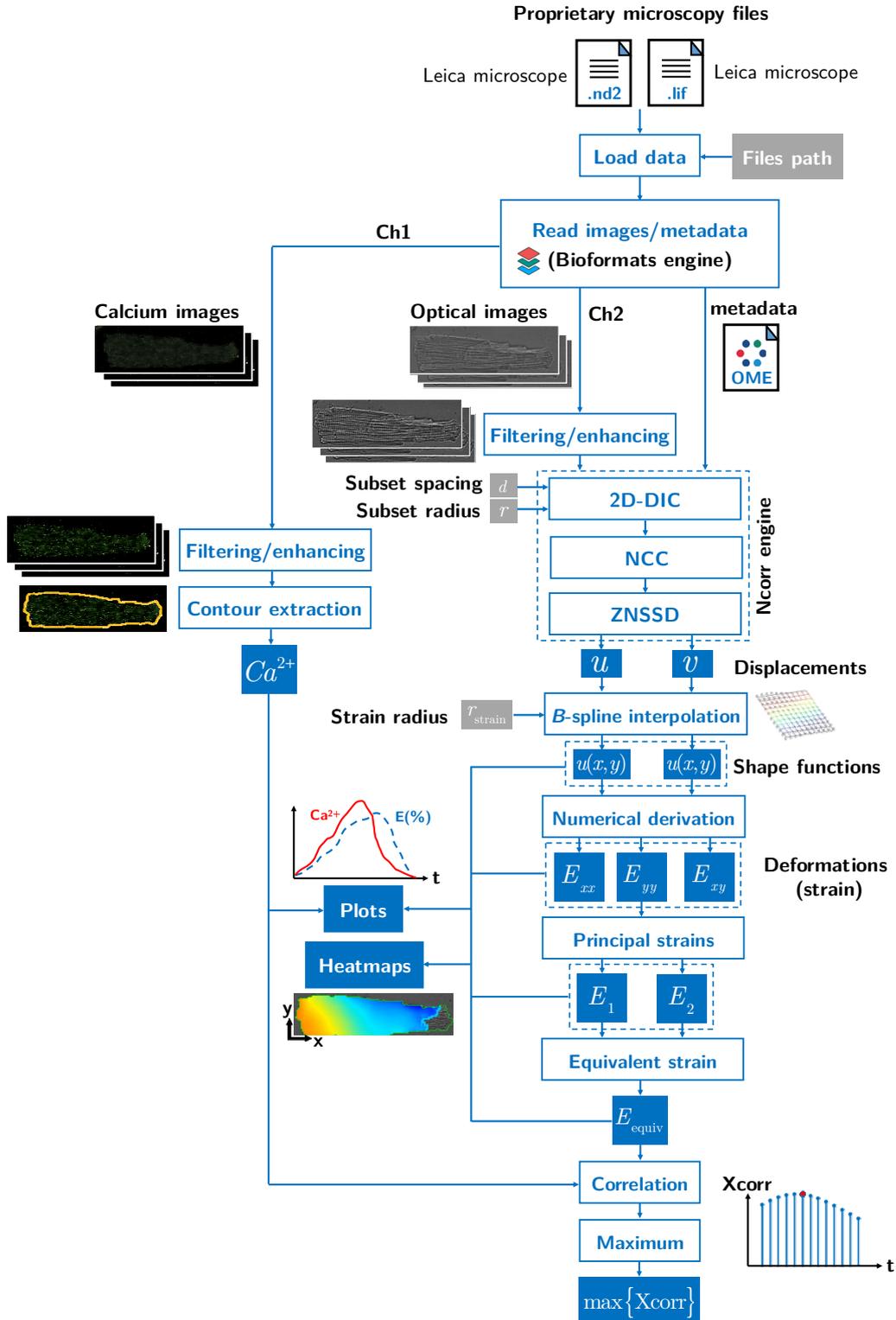


Fig. 3.16. Diagrama de blocs del sistema computacional emprat en aquesta tesi per l'anàlisi de la contracció i calci de un cardiomiòcit aïllat.

Les imatges adquirides amb el microscopi s'han processat mitjançant un script personalitzat programat amb el programari MATLAB r2022b ([MathWorks, Boston, EUA](#)).

La plataforma per l'anàlisi de la contracció mecànica i calci de un cardiomiòcit aïllat, ofereix una solució completa d'inici a fi (*end-to-end*): des de carregar les dades amb el format propi del microscopi confocal, passant per processar les dades i representar els mapes de calor (*heatmaps*) i les series temporals dels desplaçaments i deformacions (*strains*).

3.5.1 Carregar les dades i els paràmetres del microscopi

Les dades del microscopi es carreguen a l'ordinador utilitzant l'extensió Bioformats v6.11 per a Matlab ([Glencoe Software, Seattle, EUA](#)). Aquest addon permet obtenir tant les imatges microscòpiques del canal òptic i del canal de calci fluorescent, com les metadades amb tots els paràmetres físics i de configuració utilitzats durant el registre, com la conversió de píxels a unitats, la freqüència de mostreig, F_s , i el nombre de mostres, N_{sample} .

3.5.2 Càlcul dels desplaçaments per correlació d'imatge digital

Tot i que els inicis de la Correlació d'Imatges Digital (*Digital Image Correlation*, DIC) es remunten a diversos treballs de 1982 ([Pan. 2018](#)), és en els anys següents quan es produeix un veritable desenvolupament de les seves bases teòriques i aplicacions. Especialment a partir de l'any 2000, gràcies a les grans millores a la tecnologia computacional i també als dispositius d'adquisició d'imatge que augmenten la seva resolució ([Sutton et al. 2009](#)). Així, en aquest estudi, la tècnica DIC es pot aplicar adequadament a les imatges òptiques del microscopi aprofitant avantatjosament la textura superficial característica del cardiomiòcit. La [Fig. 3.17](#) mostra una textura artificial de puntets (*artificial speckle patterns*) obtinguda aplicant un pintura acrílica que és projectada de forma aleatòria sobre la superfície d'un metall ([Blaber et al. 2015](#)) i també sobre la superfície un policarbonat transparent ([Cantó-Navés et al. 2021](#)).

En el nostre cas, aquesta opció convencional seria pràcticament impossible, ja que no podem utilitzar un esprai o gravar un patró, per això, s'aprofita la textura natural del cardiomiòcit obtinguda mitjançant una il·luminació uniforme de la seva superfície. La nostra metodologia aprofita el fet que les imatges òptiques obtingudes dels cardiomiòcit es visualitzen de manera molt clara: el citoesquelet, els sarcòmer entre les línies z fosques i les estructures

mitocondrials (Yaniv et al. 2011). A més, s'ha millorat digitalment el contrast mitjançant l'equalització de l'histograma i també la brillantor de les imatges.

Aquestes estructures tenen patrons característics que es poden seguir durant el moviment cel·lular (Zhang and Arola. 2004) amb una il·luminació uniforme de la superfície del cardiomiòcit.

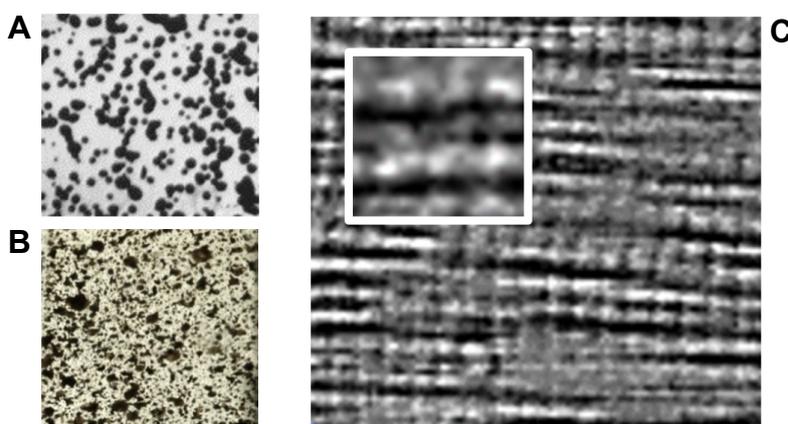


Fig. 3.17. A i B Textures amb un patró aleatori de taques generades amb un espray de pintura (Blaber et al. 2015) i (Cantó-Navés et al. 2021) C. Textura natural present al cardiomiòcit.

El procediment, utilitzat per obtenir el camp de deformació en el cardiomiòcit, consta de dos càlculs consecutius. En primer lloc, els desplaçaments s'obtenen correlacionant les intensitats de gris entre la imatge corresponent a la configuració de referència $f(x_i, y_i)$ amb la imatge corresponent a la configuració actual $g(x'_i, y'_i)$, vegeu la Fig. 3.15. Tot seguit, les components del tensor de deformació de Green-Lagrange (veure apartat 3.4) poden obtenir-se derivant les funcions d'interpolació dels desplaçaments obtinguts anteriorment. En els paràgrafs següents s'ofereix una explicació més detallada d'aquests dos passos.

El principi bàsic de la DIC és el seguiment (*tracking*) o emparellament (*matching*) dels mateixos punts (o píxels) entre les dues imatges gravades abans i després de la deformació, o entre dues deformacions consecutives, vegeu la Fig. 3.15. En els algorismes de correlació d'imatge 2D és molt important garantir el paral·lelisme entre el CCD de la càmera i la superfície plana de la mostra (Helm and Deanner. 2004, Meng et al. 2006, Sutton et al. 2008, Pan et al. 2009), que en el nostre cas, és el paral·lelisme entre la placa de cultiu del cardiomiòcit i el CCD de la càmera del microscopi confocal.

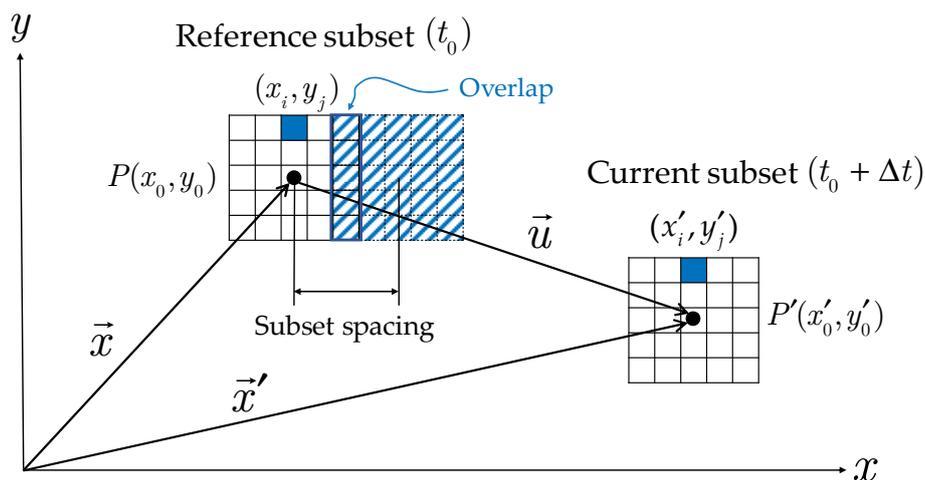


Fig. 3.18. Posició del centre del subconjunt (*subset*) de referència $P(x_0, y_0)$. Posició del centre del subconjunt actual $P(x'_0, y'_0)$. Cas particular amb les dimensions del subconjunt = 5x5, rang $M = -2$ a $+2$. Distància entre centres dels subconjunts = 4 píxels (solapament).

L'algoritme 2D-DIC divideix la regió d'interès (ROI) de la imatge en subconjunts (*subsets*). Les distàncies entre els centres dels subconjunts es denominen l'espaiat entre subconjunts (*subset spacing*). L'espaiat entre subconjunts té un efecte més important sobre la resolució espacial que la mida dels subconjunts (Sutton et al. 2009). Un menor espaiat entre subconjunts produeix més punts de dades DIC i, per tant, una major resolució espacial. Normalment, es recomana un espai de subconjunts d'un terç a la meitat de la mida del subconjunt (Sutton et al. 2009, Blaber et al. 2015) de manera que els subconjunts veïns se solapin parcialment, tot i que aquest valor pot variar àmpliament depenent de les aplicacions específiques. Per a més consideracions, en el cas particular de les imatges de cardiomiòcits, veure l'apartat 3.6.2 d'aquesta tesi.

La selecció de la dimensió del subconjunt (*subset*) és crítica per a la precisió dels desplaçaments mesurats en l'algoritme DIC, ja la mida del subconjunt determina l'àrea utilitzada per a rastrear els desplaçaments entre els subconjunts de referència i el subconjunt deformat. Així, per aconseguir una anàlisi de correlació fiable en l'algoritme DIC, la mida d'un subconjunt ha de ser prou gran perquè contingui un patró prou distintiu amb una gamma gran de nivells de gris per distingir-se a si mateix d'altres subconjunts (Pan et al. 2009).

A la Fig. 3.19 es mostren els contorns que defineixen les dimensions d'un subconjunt (*subset*).

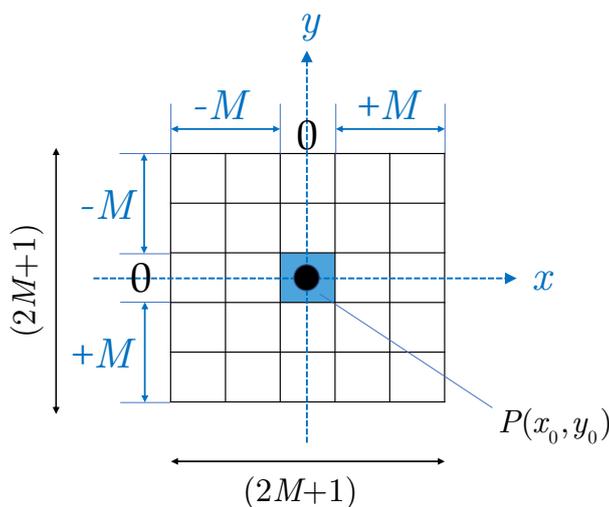


Fig. 3.19. Definició dels contorns del subconjunt (*subset*) pel cas particular $M=2$.

Per a calcular els desplaçaments del punt P , es tria un subconjunt de referència quadrat de $(2M+1) \times (2M+1)$ píxels centrat en el punt $P(x_0, y_0)$ de la imatge de referència i s'utilitza per emparellar-ne la ubicació corresponent a la imatge deformada $P'(x'_0, y'_0)$.

Per avaluar el grau de similitud entre el subconjunt de referència (*reference subset*) i el subconjunt actual deformat (*current reference*), s'ha de definir obligatòriament un criteri de correlació.

En la literatura consultada existeixen dos tipus de criteris de correlació: la correlació creuada (CC) i la correlació de diferència de suma quadrada (SSD) (Pan et al. 2009). Ambdós criteris, CC i SSD, estan relacionats i és possible formular equacions matemàtiques de conversió entre ells. Per una detallada equivalència entre els criteris vegeu (Pan et al. 2007).

La relació completa de totes les mesures de correlació presents a la literatura actual es resumeix a la Taula 3.2. Encara que es poden trobar diferents definicions de criteris de correlació a la literatura, aquests criteris de correlació es poden classificar en dos grups, els criteris CC i els criteris de correlació SSD (Giachetti. 2000, Tong. 2005), definits anteriorment.

Críteris de correlació	Definició	
Cross-correlation (CC)	$CC = \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M f(x_i, y_j) \cdot g(x'_i, y'_j)$	
Normalized cross-correlation (NCC)	$NCC = \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M \frac{f(x_i, y_j) \cdot g(x'_i, y'_j)}{\bar{f} \cdot \bar{g}}$	
Zero-normalized cross-correlation (ZNCC)	$ZNCC = \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M \frac{(f(x_i, y_j) - f_m) \cdot (g(x'_i, y'_j) - g_m)}{\Delta f \cdot \Delta g}$	
Sum of squared differences (SSD)	$SSD = \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M (f(x_i, y_j) - g(x'_i, y'_j))^2$	
Normalized sum of squared differences (NSSD)	$NSSD = \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M \left(\frac{f(x_i, y_j)}{\bar{f}} - \frac{g(x'_i, y'_j)}{\bar{g}} \right)^2$	
Zero-normalized sum of squared differences (ZNSSD)	$ZNSSD = \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M \left(\frac{f(x_i, y_j) - f_m}{\Delta f} - \frac{g(x'_i, y'_j) - g_m}{\Delta g} \right)^2$	
$f_m = \frac{1}{(2 \cdot M + 1)^2} \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M f(x_i, y_j)$	$\bar{f} = \sqrt{\sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M f(x_i, y_j)^2}$	$\Delta f = \sqrt{\sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M (f(x_i, y_j) - f_m)^2}$
$g_m = \frac{1}{(2 \cdot M + 1)^2} \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M g(x'_i, y'_j)$	$\bar{g} = \sqrt{\sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M g(x'_i, y'_j)^2}$	$\Delta g = \sqrt{\sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M (g(x'_i, y'_j) - g_m)^2}$

Taula 3.2. Definicions dels críteris de correlació CC i SSD.

Cal destacar aquí que la principal diferència entre els críteris de correlació és la seva resistència a les condicions d'il·luminació adverses (veure [Taula 3.3](#)). En concret, els críteris normalitzats, com el criteri de correlació ZNCC o ZNSSD ofereixen, a banda de més robustesa al soroll, que són insensibles al desplaçament (*offset*) i escalat lineal de la il·luminació i són els més utilitzats en els algorismes moderns de correlació digital de la imatge ([Pan et al. 2009](#), [Pan et al. 2018](#)).

Críteris de correlació	Característiques
Sum of squared differences (SSD)	Sensible a tots els canvis d'il·luminació del subconjunt deformat
Normalized sum of squared differences (NSSD)	Insensible als canvis d'escala de la intensitat del subconjunt
Zero-normalized sum of squared differences (ZNSSD)	Insensible al desplaçament i també a l'escala de la intensitat del subconjunt

Taula 3.3. Característiques rellevants segons els criteris de correlació SSD.

En general, els algoritmes DIC són capaços de detectar desplaçaments subpíxel de l'ordre de 0,01 píxel (DIC.org). La resolució dels desplaçaments subpíxel s'aconsegueix generalment mitjançant interpolació, en el nostre cas amb una interpolació amb splines, de les dades de la imatge. Per exemple, en la present investigació, 1 píxel=0,2820 μm , per la qual cosa la resolució geomètrica és de $0,01 \cdot 0,2820 = 0,002820 \mu\text{m}$. El mètode de Kamgoué basat en flux òptic ([Kamgoué et al. 2019](#)) no permet resoldre desplaçaments subpíxel, ja que no utilitza funcions d'interpolació. En canvi la metodologia proposada per HajiRassouliha ([HajiRassouliha et al. 2018](#), [Tang et al. 2019](#), [Cheuk et al. 2021](#)) cada fotograma es divideix en imatges més petites, per tal d'aconseguir la resolució subpíxel.

En aquest estudi, els camps de desplaçament dels cardiomiòcits s'estimen de forma robusta utilitzant un script personalitzat desenvolupat en el programari MATLAB r2022b ([Mathworks, Boston, MA, USA](#)), on la correlació 2D s'ha calculat utilitzant l'algoritme 2D-DIC de la toolbox de codi obert Ncorr v1.2 per a Matlab ([Blaber J. 2015](#)), a partir del qual es calcula també el camp de deformació.

Aquest algoritme de DIC 2D disponible al *toolbox* Ncorr, utilitzat en aquesta tesi per a calcular la correlació entre fotogrames successius, ha estat sotmès recentment a un intens banc de proves (*benchmark*) promogut per la societat de mecànica experimental (*Society for Experimental Mechanics, SEM*) per tal de verificar diferents programes de DIC-2D. S'han comparat un total d'11 codis comercials i opensource que havien de resoldre 6 casos de diferent complexitat ([Reu et al. 2022](#)) Els resultats obtinguts per Ncorr són excel·lents i comparables als dels altres codis comercials ([Harilal and Ramji 2014](#), [Atkinson and Thorsten. 2020](#), [Liu. et al 2021](#)). No obstant això, aquestes imatges sotmeses al banc de proves (*benchmark*) eren artificials o generades sintèticament. Recentment Ncorr ha estat utilitzar per fer mesuraments in-vitro de les deformacions de la paret aòrtica ([Giuseppe et al. 2021](#)).

En el nostre cas, les imatges de cardiomiòcits tenen una textura natural molt específica, veure Fig. 3.17 C. Addicionalment, presenten un soroll significatiu. Per tant, resulta imprescindible realitzar una prova de validació específica que s'explica a la secció següent. A més també s'ha utilitzat les toolboxes de: Signal Processing Toolbox, Statistics and Machine Learning Toolbox i Image Processing Toolbox. L'objectiu d'aquest algoritme de correlació 2D és trobar el subconjunt corresponent en les imatges actuals utilitzant dues funcions de correlació de manera successiva: la primera com a primera aproximació per apropar-se al convidat inicial (*initial guess*) i després una segona per refinar més. L'estimació inicial s'ha calculat mitjançant la Correlació Creuada Normalitzada, NCC, que es defineix com (Pan. 2018):

$$NCC = \frac{\sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M f(x_i, y_j) \cdot g(x_i', y_j')}{\sqrt{\sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M f(x_i, y_j)^2 \cdot \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M g(x_i', y_j')^2}} \quad (3.29)$$

On es defineix f_m i g_m com:

$$f_m = \frac{1}{(2 \cdot M + 1)^2} \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M f(x_i, y_j) \quad , \quad g_m = \frac{1}{(2 \cdot M + 1)^2} \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M g(x_i', y_j')$$

D'aquesta manera, l'estimació inicial calcula u i v amb una precisió sencera (píxel). A continuació, el següent pas utilitza un optimitzador no lineal per refinar aquests resultats amb una resolució de subpíxels mitjançant la recerca de la correspondència òptima, calculant la ZNSSD, que es defineix com (Blaber J. 2015, Pan. 2018):

$$ZNSSD = \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M \left(\frac{f(x_i, y_j) - f_m}{\sqrt{\sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M (f(x_i, y_j) - f_m)^2}} - \frac{g(x_i', y_j') - g_m}{\sqrt{\sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M (g(x_i', y_j') - g_m)^2}} \right)^2 \quad (3.30)$$

Així, en la implementació utilitzada en aquesta tesi de l'algoritme DIC 2D provinent del Ncorr toolbox, calcula primer una Correlació Creuada Normalitzada (Normalized cross-correlation, NCC) i després refina l'estimació amb la correlació de la Suma zero-Normalitzada de Diferències al Quadrat (*Zero-normalized sum of squared differences*, ZNSSD).

3.5.3 Càlcul de deformacions amb el tensor de Green-Lagrange.

El càlcul de les deformacions és un pas comú de post-processat dels desplaçaments obtinguts amb qualsevol algorisme de DIC. Una primera aproximació pel càlcul de les deformacions podria ser l'aplicació de la derivació matemàtica directa usant el mètode numèric de les diferències finites entorn els desplaçaments adjacents al punt P , el que correspon a les [equacions 3.24](#) o [equacions 3.25](#) segons si s'aplica un model de grans deformacions o un model de petites deformacions, respectivament. Les expressions simplificades en diferències finites pel cas del tensor de deformació infinitesimal vindran donades per:

$$\begin{aligned}\varepsilon_{xx} &= \frac{\partial u}{\partial x} \approx \frac{u_{(i+1)} - u_i}{\Delta x} \\ \varepsilon_{xy} &= \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\partial v}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial y} \right) \approx \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{v_{(i+1)} - v_i}{\Delta x} + \frac{u_{(j+1)} - u_j}{\Delta y} \right) \\ \varepsilon_{yy} &= \frac{\partial v}{\partial y} \approx \frac{v_{(j+1)} - v_j}{\Delta y}\end{aligned}\quad (3.31)$$

Com hem comentat a l'apartat anterior, quan volem obtenir major precisió en els càlculs numèrics, com és el cas que ens ocupa, utilitzarem el model de grans deformacions. Hi ha expressions similars amb diferències finites per al tensor de deformació de Green-Lagrange. Ara bé, a la pràctica, aquesta metodologia del mètode de diferències finites introdueix molt soroll i són necessàries funcions addicionals de suavitzat i interpolació.

Una alternativa més eficient per obtenir les deformacions en un punt P consisteix en derivar analíticament unes funcions d'interpolació, també anomenades funcions de forma (*shape function*) que han estat ajustades al camp de desplaçaments dels punts que estan propers al punt P , així que aquesta aproximació proporciona una descripció analítica del camp de desplaçament ([Lu and Cary 2000](#), [Schreier and Sutton 2002](#)). Tot seguit, les deformacions es calculen a partir de les derivades analítiques espacials d'aquestes funcions. Les funcions d'interpolació o funcions de forma solen ser un ajustament polinòmic o spline, i el seu ordre afecta la resolució espacial dels mesuraments de la deformació. En el nostre cas, hem utilitzat B -splines biquíntics (*biquintic B-spline*).

La derivació analítica segueix la formulació de les [equacions 3.25](#) (model de grans deformacions) o les [equacions 3.26](#) (model de petites deformacions) segons si s'aplica un model de grans deformacions o un model de petites deformacions,

respectivament. Aquestes funcions d'interpolació s'obtenen a partir del valors dels desplaçaments (u i v) procedents del resultats del DIC. En general, quants més punts intervenen, millor, però això té limitacions pràctiques.

Les deformacions calculades a partir de les derivades analítiques del model de gran deformacions queden expressades com segueix:

$$\begin{aligned}
 E_{xx} &= \frac{1}{2} \cdot \left(2 \cdot \frac{\partial u(x,y)}{\partial x} + \left(\frac{\partial u(x,y)}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial v(x,y)}{\partial x} \right)^2 \right) \\
 E_{yy} &= \frac{1}{2} \cdot \left(2 \cdot \frac{\partial v(x,y)}{\partial y} + \left(\frac{\partial u(x,y)}{\partial y} \right)^2 + \left(\frac{\partial v(x,y)}{\partial y} \right)^2 \right) \\
 E_{xy} &= \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\partial u(x,y)}{\partial y} + \frac{\partial v(x,y)}{\partial x} + \frac{\partial u(x,y)}{\partial x} \cdot \frac{\partial u(x,y)}{\partial y} + \frac{\partial v(x,y)}{\partial x} \cdot \frac{\partial v(x,y)}{\partial y} \right)
 \end{aligned} \tag{3.32}$$

On

$u(x,y)$ és la funció d'interpolació del desplaçament longitudinal u .

$v(x,y)$ és la funció d'interpolació del desplaçament vertical v .

Les deformacions calculades a partir de les derivades analítiques del model de petites deformacions queden expressades com segueix:

$$\begin{aligned}
 \varepsilon_{xx} &= \frac{\partial u(x,y)}{\partial x} \\
 \varepsilon_{yy} &= \frac{\partial v(x,y)}{\partial y} \\
 \varepsilon_{xy} &= \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\partial u(x,y)}{\partial y} + \frac{\partial v(x,y)}{\partial x} \right)
 \end{aligned} \tag{3.33}$$

On

$u(x,y)$ és la funció d'interpolació del desplaçament longitudinal u .

$v(x,y)$ és la funció d'interpolació del desplaçament vertical v .

A la pràctica, és indiferent utilitzar el model de petites deformacions o grans deformacions, ja que en el cas de materials sotmesos a grans deformacions, com els cardiomiòcits, s'aplica el mètode incremental entre imatges successives. Així, si els passos temporals són curts, per exemple mitjançant una seqüència de vídeo amb alta freqüència de mostreig, les deformacions entre passos temporals són petites i la posició dels punts és molt semblant, per tant, els resultats obtinguts amb un model de grans deformacions o petites deformacions seran similars, ja que els infinítesims d'ordre superior seran menystenible (veure Fig. 3.20).

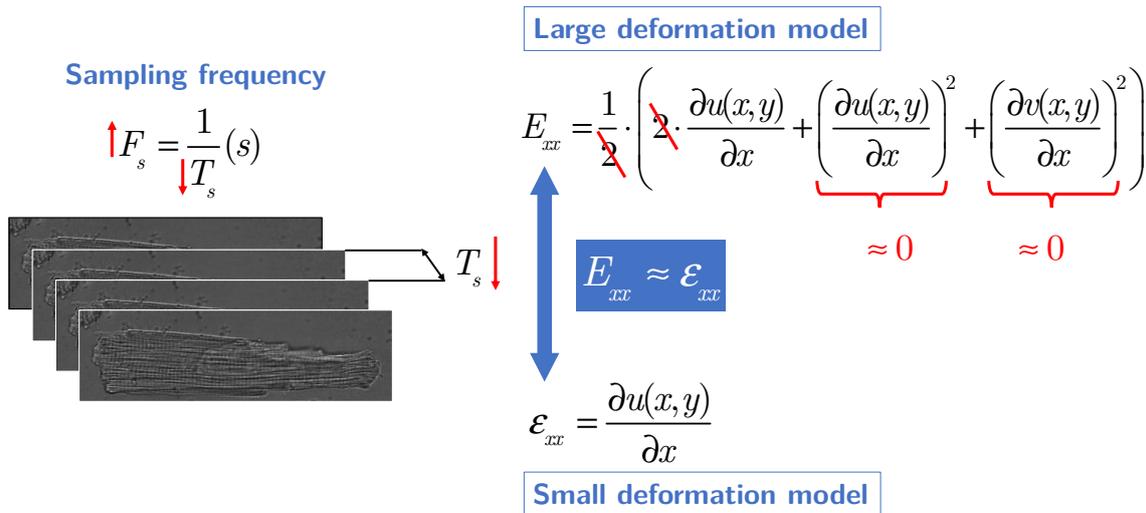


Fig. 3.20. Exemple de l'equivalència del model de grans deformacions i el model de petites deformacions pel cas de la deformació en l'eix x quan s'utilitza el mètode incremental amb una freqüència de mostreig elevada.

Abans s'ha comentat, que per l'emparellament (*matching*) és recomanable utilitzar un subconjunt gran, així, es disposarà d'un subconjunt amb una gamma més gran de nivells de gris i un patró de píxels més característic que destacarà sobre altres subconjunts. Així, aquest subconjunt es podrà reconèixer més específicament a la imatge distorsionada (Pan et al. 2009). Però, per contra, si s'utilitza un subconjunt petit, el camp de deformació es pot aproximar fàcilment a una funció polinòmica d'ordre baix (Pan et al. 2008), mentre que si s'utilitza un subconjunt gran s'haurà d'utilitzar una funció d'interpolació d'ordre alt. Així, si volem utilitzar subconjunts grans, hem d'utilitzar forçosament aproximacions amb ordre alt.

Scherier recomana utilitzar interpolacions basades en *splines* bàsics (B-splines) però d'ordre alt degut a la seva alta precisió, malgrat que tenen un cost computacional més elevat (Scherier et al. 2000). En aquest cas, l'interpolació dels desplaçaments en escala de subpíxels s'ha realitzat mitjançant B-splines biquíntics (*biquintic B-spline*) d'acord amb (Blaber J, 2015) que permet obtenir una interpolació suau i precisa entre els punts de dades.

Per això, es decideix utilitzar funcions *splines* d'ordre superior per l'aproximació dels camps de deformació. La Fig. 3.21 mostra que l'elecció del nombre de punts que intervindran a les funcions d'interpolació és realitzada, concretament, mitjançant la definició d'un paràmetre anomenat radi de deformacions, r_{strain} (*radius strain*) que estableix el nombre de punts radials $(2 \cdot r_{\text{strain}} + 1) \times (2 \cdot r_{\text{strain}} + 1)$

involucrats en les funcions d'interpolació que vindran definides pel radi de deformacions, r_{strain} .

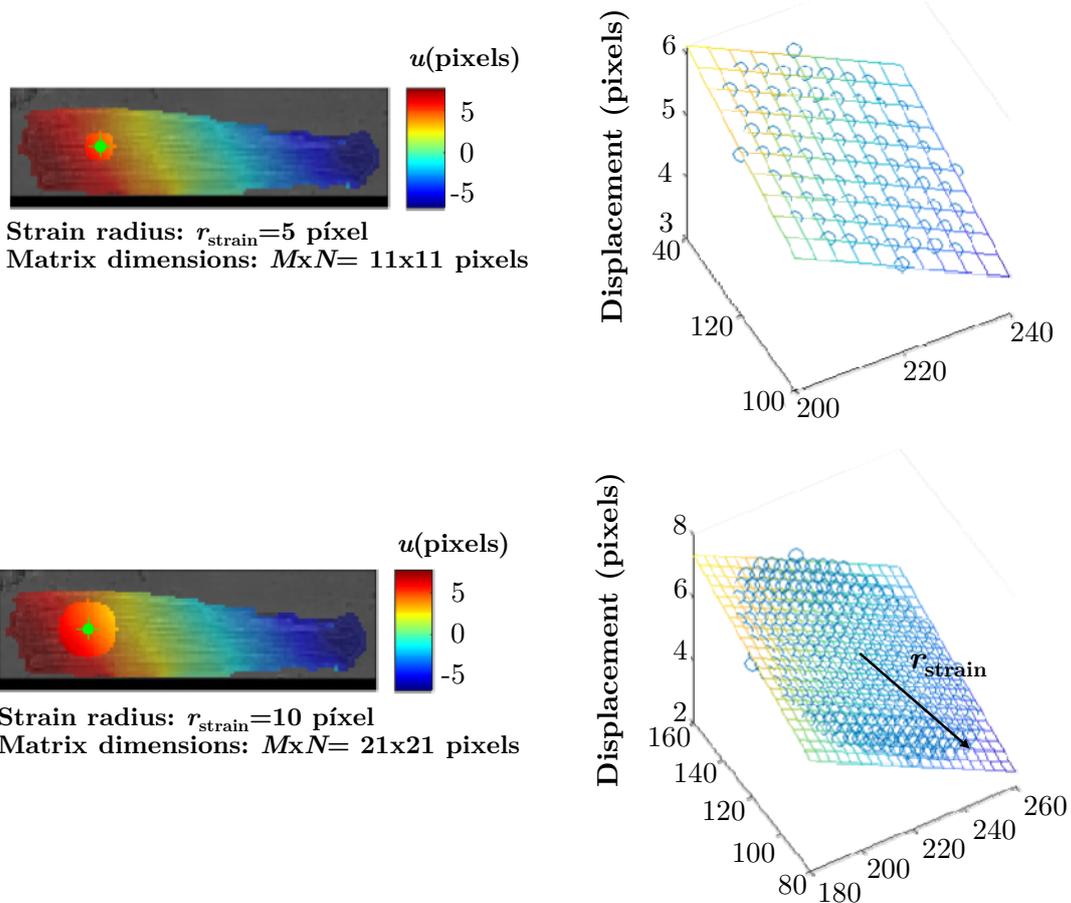


Fig.a 3.21. Funció d'interpolació per obtenir els desplaçaments u en l'eix x per a diferents radis de deformació, r_{strain} (*radius strain*).

Com a conclusió, per tal d'obtenir resultats fiables i precisos a l'anàlisi DIC en una cèl·lula, cal tenir en compte diverses condicions en el muntatge experimental i en la programació de l'algorisme.

Les condicions experimentals que cal tenir en compte per obtenir un bon registre DIC són:

- Augmentar el contrast del patró natural de la cèl·lula. És important augmentar el contrast del patró de motejat (*speckle pattern*) present a la cèl·lula de manera natural. Això ajuda a augmentar la visibilitat dels patrons i millora la precisió dels mesuraments.
- Càmera d'alta qualitat i de baix soroll. És essencial utilitzar una càmera amb un CCD d'alta qualitat i bona relació senyal soroll (SNR) per capturar imatges clares i detallades.

- Il·luminació controlada. És molt important mantenir una il·luminació estable i uniforme durant el procés de registre del vídeo de la contracció de la cèl·lula per evitar variacions en la il·luminació que podrien afectar la precisió dels mesuraments del algoritme DIC.

Pel que fa a les condicions que cal tenir en compte en la programació de un bon algoritme DIC són:

- Dimensió del subconjunt. Es recomana utilitzar un subconjunt (*subset*) més gran per afavorir que la funció de forma (*shape function*) encaixa bé amb el camp de moviments que s'està analitzant. Això permet una correlació més precisa i millora la qualitat de les mesures.
- Correlació robusta. És important utilitzar un criteri de correlació robust i fiable respecte a factors externs com els canvis d'il·luminació o el soroll. El ZNSSD i el ZNCC, són una bona opció, ja que són robustos al soroll, i insensibles al desplaçament i l'escalat lineal de la il·luminació.
- Funcions d'interpolació d'ordre alt. L'ús d'una funció d'interpolació d'ordre elevat, com per exemple, l'esquema d'interpolació amb *B-splines* biquíntics que permet aconseguir una interpolació suau i precisa.

3.6. Resultats i discussió

Els següents apartats presenten els resultats de la validació del mètode de software proposat en aquest capítol mitjançant l'ús de desplaçaments generats sintèticament, però a partir d'una imatge real del cardiomiòcit. A continuació, s'emprarà aquesta metodologia ja convenientment validada a les dades experimentals i imatges reals disponibles.

3.6.1 Validació del mètode de software

Aquesta secció pretén validar la precisió del nostre marc basat en l'algorisme DIC per a descriure la caracterització espaciotemporal de la cèl·lula en tres situacions: **a)** Una translació rígida, **b)** Una rotació rígida i **c)** Una deformació lineal variable amb el temps (veure Fig. 3.22).

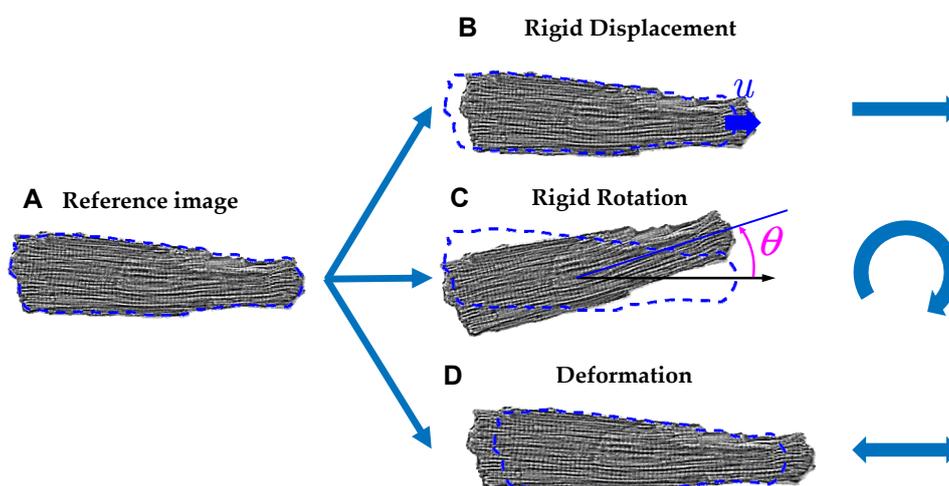


Fig. 3.22. Transformacions geomètriques aplicades a l'imatge del cardiomiòcit durant la validació de la metodologia

El procediment de validació implica la creació de dades sintètiques utilitzant transformacions afins sobre una imatge de referència. La imatge de referència inicial del cardiomiòcit és una matriu $n \times m$, on n i m són les dimensions vertical i horitzontal de la imatge en unitats de píxels, i els valors de les quals representen el valor en escala de grisos dels píxels de la imatge.

A continuació, s'aplica una transformació afí (A) a les coordenades inicials dels píxels (x, y) per a trobar les noves coordenades (x', y') i assignar els valors transformats dels píxels a la nova imatge, de la següent manera:

$$\vec{x}' = A \cdot \vec{x} + \vec{t} \quad \begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{xx} & a_{xy} \\ a_{yx} & a_{yy} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} t_x^i \\ t_y^i \end{pmatrix} \quad (3.34)$$

La matriu de sortida està formada pels valors en escala de grisos de la imatge sintètica desitjada i té la mida de la imatge de referència. Quan la nova posició al centre del píxel d'entrada no coincideix amb un centre exacte del píxel de sortida, es realitza una interpolació dels valors de l'escala de grisos per determinar la posició discreta de sortida. Un cop processades les imatges sintètiques, es comparen els resultats amb el desplaçament teòric en els eixos x i y pel cas del desplaçament i rotació imposada, [apartat 3.6.1.1](#) i [apartat 3.6.1.2](#). També es realitza una comparativa per la component longitudinal de la deformació, E_{xx} , en el cas de la verificació de la deformació lineal, [apartat 3.6.1.2](#). A continuació, s'expliquen detalladament aquestes tres verificacions.

3.6.1.1 Translació rígida

S'imposa a l'imatge de referència una translació uniforme única segons l'eix x , u , a tots els punts. És una translació de sòlid rígid. Des d'un valor petit inicial de $u = 2$ píxels (petit moviment) fins a un valor important de $u = 36$ píxels (gran moviment), i amb variacions de 2 píxels, és a dir 2-4-6-8-10-12-14-16-18-20-22-24-26-28-30-32-34 i 36 aplicat a la vegada. El valor inicial de 2 píxels correspon a una translació real de $0.564 \mu m$, i el valor de 36 píxels són $10.152 \mu m$. La transformació afí pel cas d'una translació rígida, A_{trans} , i pel fotograma i (*frame*), es descriu mitjançant la següent matriu:

$$A_{\text{trans}}(i) = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad \vec{t} = \begin{pmatrix} t_x^i \\ 0 \end{pmatrix} \quad (3.35)$$

on

t_x^i representa la translació a l'eix x pel fotograma específic i , des d'un valor de 2 píxels fins a 36 píxels.

A la [Fig. 3.23](#) es pot comprovar que el resultat final obtingut coincideix significativament amb el resultat esperat. En efecte, el camp de desplaçaments segons l'eix x té el valor esperat de $u = 36$ píxels a tots els punts, amb unes petites oscil·lacions atribuïbles als arrodoniments de tipus numèric, ja que l'error absolut mitjà MAE és molt baix, com mostra la [Fig. 3.24](#) per a cada desplaçament imposat de 2 a 36 píxels.

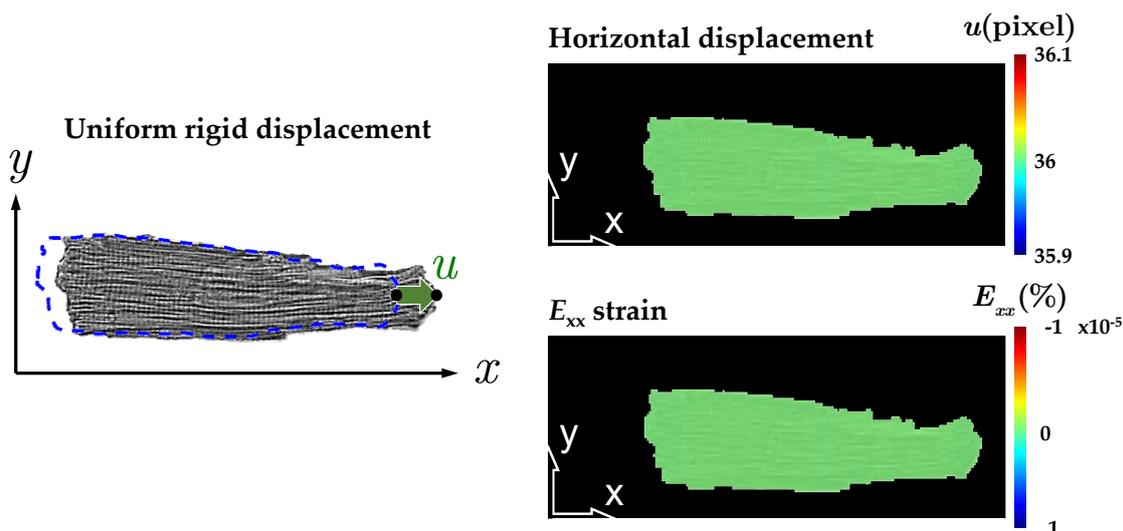


Fig. 3.23. El desplaçament horitzontal, u , i la deformació longitudinal, E_{xx} , quan s'aplica un desplaçament rígid uniforme sintètic de valor $u = 36$ píxels (equivalent a $10.152 \mu m$) a la imatge inicial del cardiomiòcit.

Pel que fa a la deformació E_{xx} , caldria esperar que els seu valor sigui estrictament zero, ja que s'està imposant un moviment de sòlid rígid. Això és pràcticament així, com mostren les dues figures Fig 3.20 i Fig. 3.21. En definitiva, queda validat el procediment DIC pel cas d'una translació imposada fins a 36 píxels.

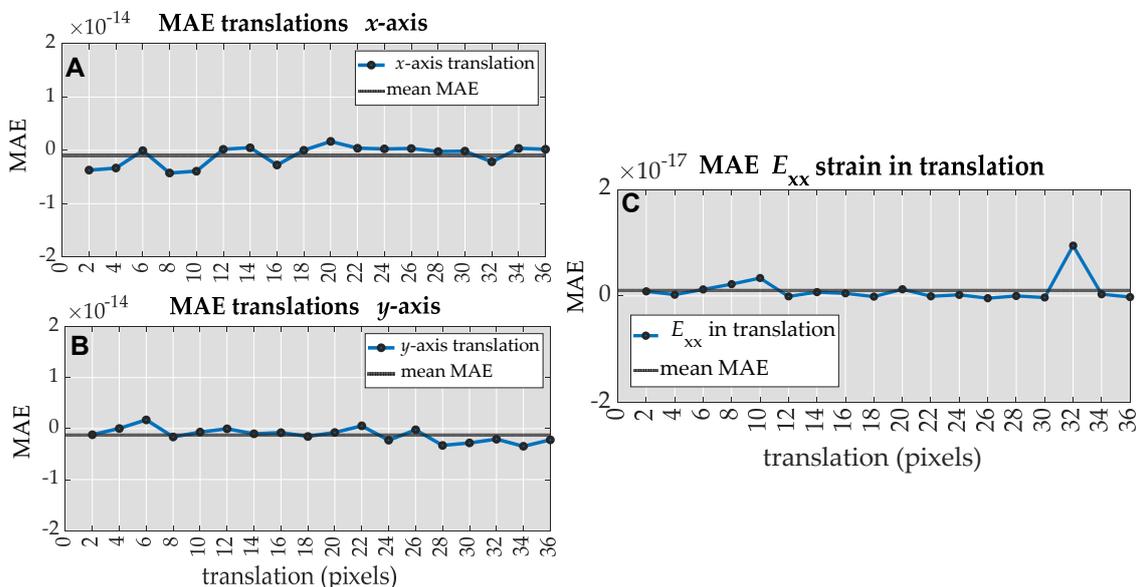


Fig. 3.24. Error absolut mitjà (MAE), en el cas d'una translació segons l'eix x , calculat entre el valor mesurat pel DIC i el valor de la translació imposada. **A.** MAE del desplaçament u . **B.** MAE del desplaçament v . **C.** MAE de la deformació longitudinal E_{xx} .

3.6.1.2 Rotació rígida

S'aplica una rotació imposada a la imatge de referència, mitjançant una rotació sintètica específica, θ_i , que va de 4 a 8 graus (rotació positiva) amb un interval cada 0.25 graus i després va de -4 a -8 graus (rotació negativa) utilitzant el mateix interval. És una rotació de sòlid rígid. La transformació afí per a una rotació rígida, A_{rot} , es descriu mitjançant la següent operació matricial:

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} + \underbrace{\begin{pmatrix} \cos \theta^i & -\sin \theta^i \\ \sin \theta^i & \cos \theta^i \end{pmatrix}}_{A_{rot}(i)} \cdot \begin{pmatrix} x - x_{center} \\ y - y_{center} \end{pmatrix} \quad (3.36)$$

on

x_{center} , y_{center} representa el centre de rotació, que s'ha escollit arbitràriament al baricentre del cardiomiòcit

En l'article de Lam (Tang et al. 2019), es realitza també una validació amb una rotació d'imatges sintètiques de 0° a 90° amb increment de 5° a 5° , però no valida les deformacions, que és un dels objectius principals en una validació de rotació d'un sòlid-rígid.

La Fig. 3.25 es representa el camp de desplaçaments u i v pel cas concret d'una rotació en el sentit de les agulles del rellotge i de valor $\theta_i = +6^\circ$.

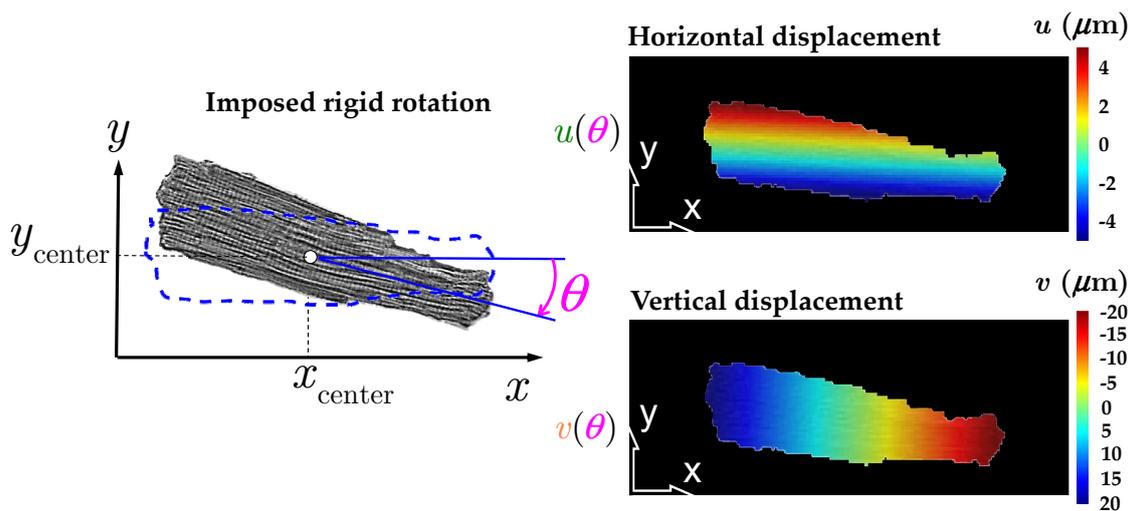


Fig. 3.25. Desplaçament horitzontal i vertical quan s'aplica una rotació rígida imposada sintèticament de valor concret $\theta_i = +6^\circ$ al cardiomiòcit.

La Fig. 3.26 mostra els valors de l'error absolut mitjà (MAE) per a cada rotació imposada respecte al cas del desplaçament u .

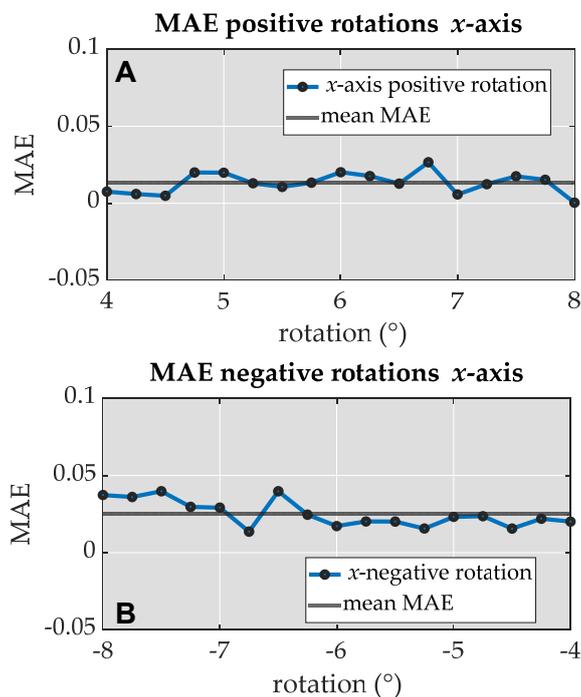


Fig. 3.26. Error absolut mitjà (MAE) del desplaçaments u entre els valors obtinguts pel DIC i els valors analítics conseqüència de la rotació imposada. **A.** MAE del desplaçament u per la rotació positiva. **B.** MAE del desplaçament u per la rotació negativa.

Pel que respecte a la deformació E_{xx} , cal esperar que el seu valor sigui estrictament zero, ja que s'està imposant només una rotació de sòlid rígid. Això és pràcticament així, com mostra la Fig. 3.27, ja que el MAE és inferior a $0.4 \cdot 10^{-4}$ en el pitjor dels casos. En definitiva, queda validat el procediment DIC pel cas d'una translació imposada fins a $\theta = \pm 8^\circ$.

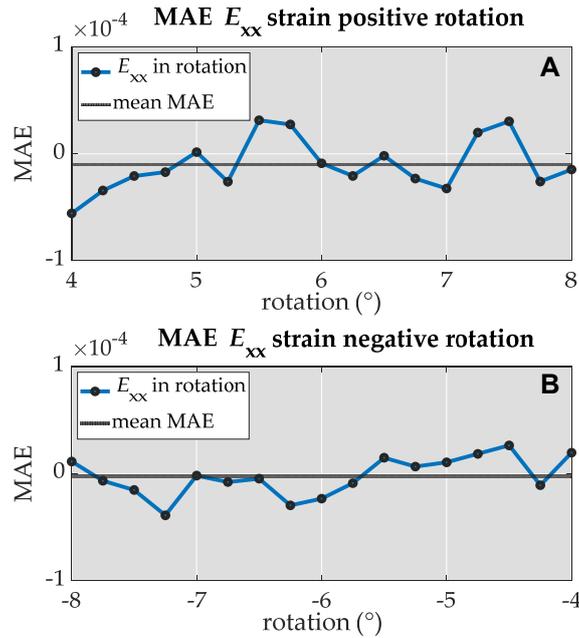


Fig. 3.27. Error absolut mitjà (MAE) de les deformacions longitudinals, E_{xx} , durant la rotació imposada. **A** - Rotació positiva. **B** - Rotació negativa.

3.6.1.3 Deformació imposada

Pel cas de la Deformació longitudinal E_{xx} imposada i variable en el temps la transformació afí, A_{def} , vindrà descrita mitjançant la matriu següent:

$$A_{\text{def}}(i) = \begin{pmatrix} \sqrt{1 + 2 \cdot E_{xx}^{\text{input}}(t)} & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (3.37)$$

On el valor escalar $E_{xx}^{\text{input}}(t)$ correspon a una deformació fisiològica mitjana que ha estat obtinguda experimentalment. Així, el seu valor i també la evolució temporal segueix un ordre de magnitud realista. El temps estudiat comprèn la totalitat de la contracció i la posterior relaxació de la cèl·lula. A un temps determinat, t_i , la deformació $E_{xx}^{\text{input}}(t_i)$ és uniforme a tota la ROI. Al llarg del temps, el màxim valor assolit pel senyal és $E_{xx,\text{max}}^{\text{input}} = -0.10$ (-10% en percentatge).

A la Fig. 3.28 s'observa que els resultats són coherents. Així, la deformació longitudinal, E_{xx} , imposada de valor -0.01, és seguida pràcticament a tots els punts del cardiomiòcit. En cas de la deformació transversal, E_{yy} , hauria de ser teòricament zero, ara bé es detecten alguns petits valors però amb un ordre de magnitud menystenible de 10^{-5} .

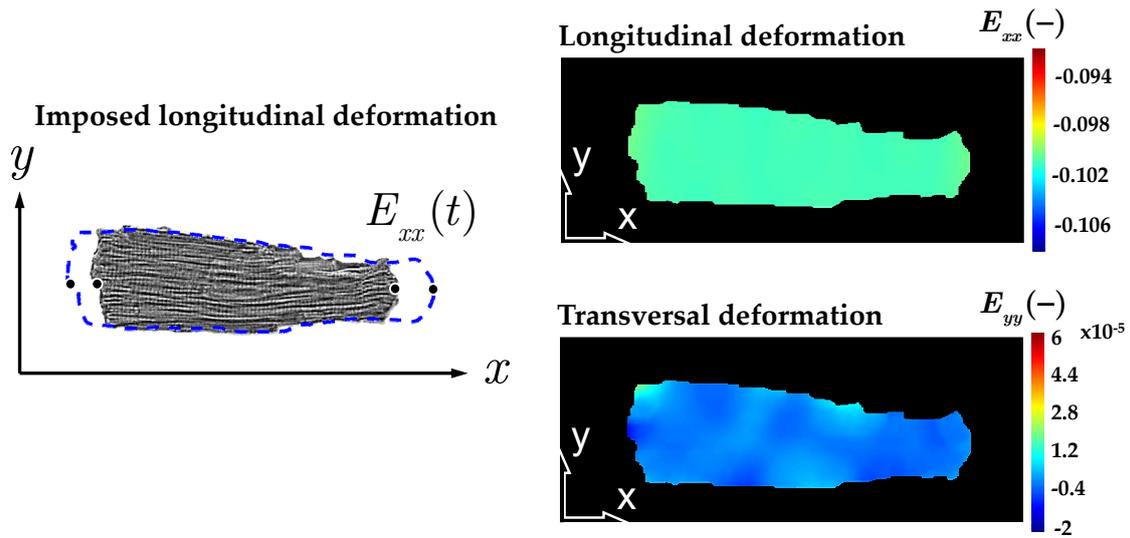


Figura 3.28. La deformació longitudinal, E_{xx} , i la deformació transversal, E_{yy} , corresponent al temps $t=0,2$ s, quan s'imposa una deformació longitudinal sintètica E_{xx} (negativa) de valor concret -0.10 al cardiomiòcit.

Per a quantificar exactament la variació del resultat respecte el valor imposat, es defineix una funció, anomenada *Error*, com la diferència entre la deformació fisiològica uniforme d'entrada, E_{xx}^{input} , i la mitjana de la deformació calculada segons l'algorisme DIC, E_{xx}^{output} . La funció d'error s'ha definit com:

$$Error = \frac{|E_{xx}^{output} - E_{xx}^{input}|}{|E_{xx}^{input}|} \cdot 100 \quad (3.38)$$

La Fig. 3.29 mostra els resultats obtinguts. En primer lloc, la coincidència qualitativa entre els dos senyals és quasi perfecta. Respecte a la funció *Error*, a banda d'una petita deriva inicial, només és remarcable una oscil·lació inferior al 0.5% a la fase final de la relaxació. No obstant, amb el valor màxim contracció de $E_{xx} = -0,10$, l'error és del 0,07%, que és quelcom superior a l'error de 0,02% obtingut per Hong (Hong et al. 2018) per a la mateixa deformació de $E = 0,10$, però en aquest cas sobre un substrat que tenia un texturat de gran qualitat òptica, no sobre les textures naturals del cardiomiòcit.

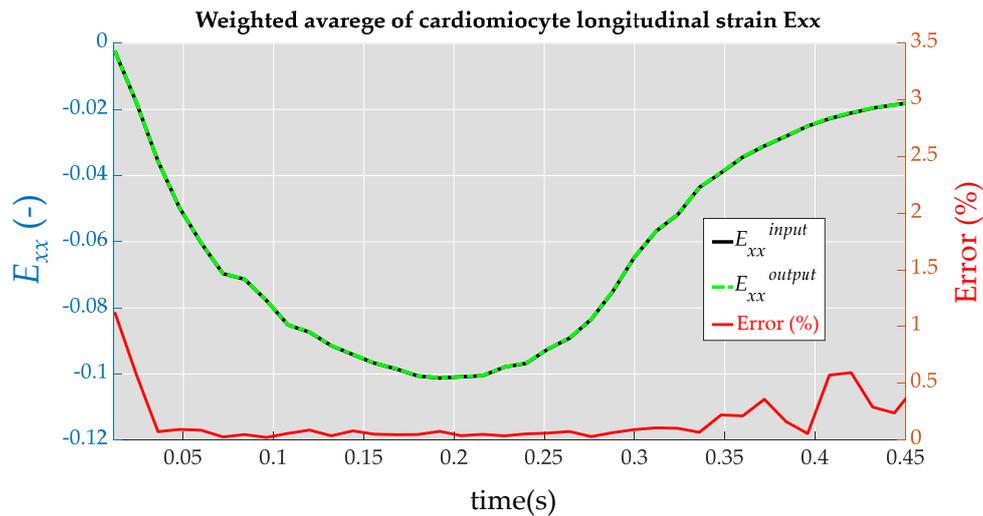


Fig. 3.29. Evolució temporal de la deformació mitjana E_{xx}^{input} davant la E_{xx}^{output} durant tot el procés de contracció del cardiomiòcit. Error relatiu (%) entre les dues deformacions.

3.6.2 Aplicació a les dades experimentals

La selecció de la dimensió del subconjunt (*subset radius*) i l'espaiat entre els subconjunts (*subset spacing*), i els seus efectes en l'anàlisi DIC han estat àmpliament estudiats a la literatura (Sutton et al. 2009, Blaber et al. 2015), però la informació disponible per a mostres biològiques és molt limitada i algunes de les conclusions extreïdes d'aquests estudis es basen freqüentment en observacions empíriques. Els subconjunts de major grandària, és a dir major radi, r , necessiten més temps de càlcul, un factor a tenir en compte per a les imatges de gran dimensionsn (veure la Fig. 3.30).

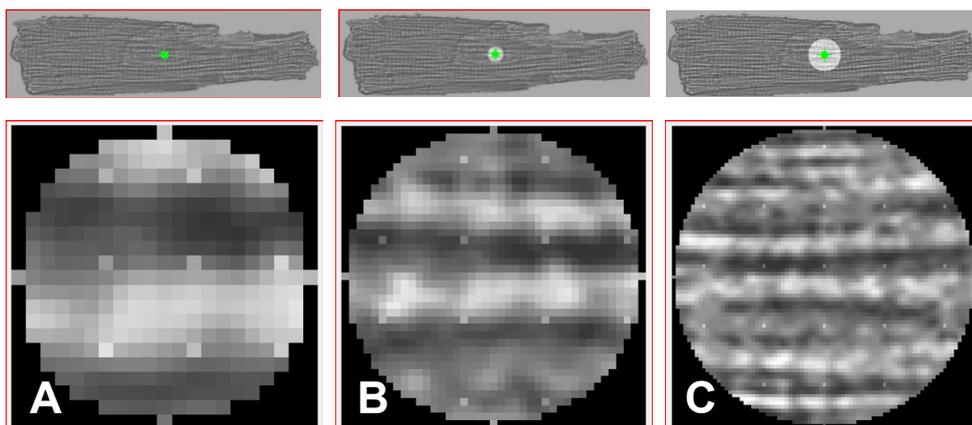


Fig. 3.30. Diferents paràmetres de selecció DIC per a les imatges del cardiomiòcit. **A.** Radi de subconjunt $r = 10$ píxels i espaiat entre subconjunts $d = 5$ píxels. **B.** Radi de subconjunt $r = 20$ píxels i espaiat entre subconjunts $d = 10$ píxels. **C.** Radi de subconjunt $r = 40$ píxels i espaiat de subconjunt $d = 15$ píxels.

A la pràctica, una major resolució espacial, o una estimació més precisa del desplaçament, resulta d'un menor espaiat entre subconjunts. Per contra, si s'augmenta l'espaiat entre subconjunts, la resolució espacial serà menor i, a més, augmentarà el soroll (veure la Fig. 3.30).

En conclusió, un major radi de subconjunt, r , i un menor espaiat de subconjunt, d , donaran com a resultat una millor correspondència de patrons. En l'anàlisi de les nostres imatges del cardiomiòcit s'ha emprat un radi de subconjunt de $r = 10, 20$ i 40 píxels i un espaiat entre subconjunts de $d = 5, 10$ i 15 píxels (veure Fig. 3.30). Així, l'espaiat entre subconjunts resulta aproximadament la meitat del radi del subconjunt

3.6.2.1 Desplaçaments u i v

En aquest apartat s'explica l'obtenció del camp de desplaçaments en el cardiomiòcit, segons els eixos x i y , de nomenclatura $u(t)$ i $v(t)$ respectivament. La Fig. 3.31 mostra el camp de desplaçaments u i v en el temps $t = 0,564$ s. Això correspon aproximadament a l'escenari d'una contracció completament desenvolupada del cardiomiòcit. Es pot observar que el desplaçament a la zona mitjana del cardiomiòcit no presenta pràcticament cap moviment ($u \approx 0$), veure la Fig. 3.31, part superior. La zona esquerra de la cèl·lula mostra un desplaçament positiu ($+u$) al llarg de l'eix x . Per contra, la zona dreta de la cèl·lula mostra un desplaçament negatiu ($-u$). Pel que fa al desplaçament v , s'observa que els moviments són compatibles amb una dilatació generalitzada al llarg de l'eix vertical y . Hi ha una línia mitjana de la cèl·lula que pràcticament no té moviment vertical, $v=0$. Una primera conclusió d'aquests resultats és que els moviments de cos rígid, veure les figures Fig. 3.14 i 3.15, no són gaire rellevants per a les cèl·lules analitzades en el present estudi. Així mateix, es pot concloure inicialment que l'efecte de flexió (*bending*) del cardiomiòcit (veure Fig. 3.15.E), no es apreciable. Aquesta darrera conclusió es confirmarà també amb els resultats obtinguts per a la deformació longitudinal E_{xx} a la secció següent.

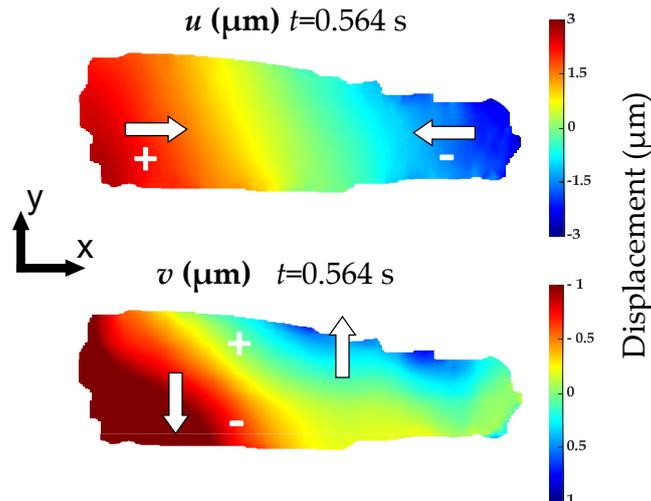


Figura 3.31. Camp de desplaçament $u(t)$ i $v(t)$ en el temps $t = 0.564$ s. Correspon aproximadament a l'escenari d'una contracció generalitzada del cardiomiòcit.

Altrament, la Fig. 3.32 mostra l'evolució temporal del desplaçament horitzontal, $u(t)$, d'un punt concret del cardiomiòcit durant el decurs de la seva contracció i posterior relaxació.

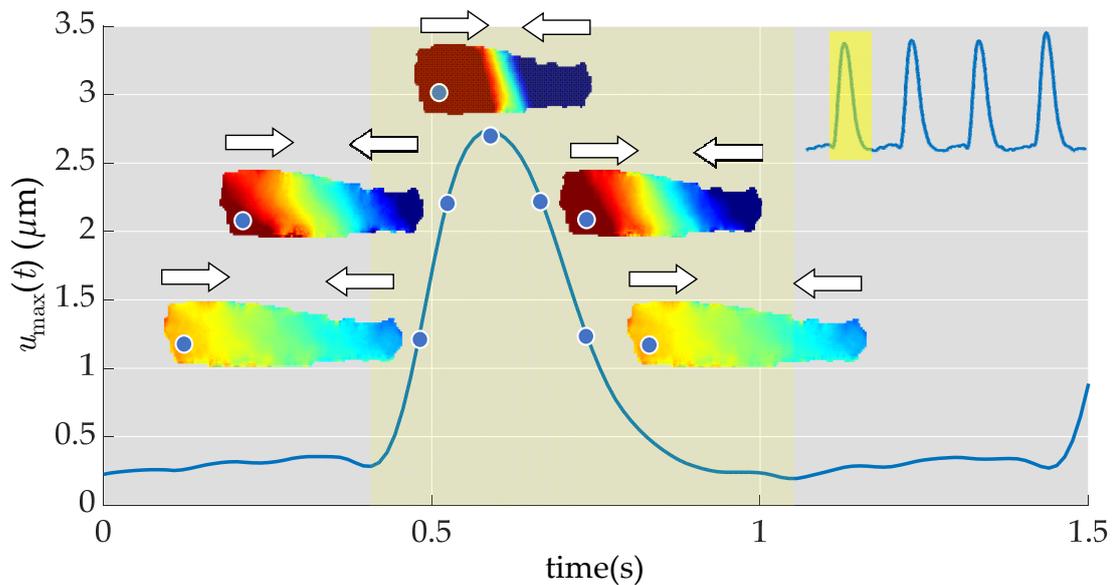


Figura 3.32. Evolució temporal del desplaçament horitzontal màxim, $u_{\max}(t)$, durant el procés de contracció i posterior relaxació del cardiomiòcit.

També la mateixa figura mostra el camp de desplaçaments $u(t)$ global en 5 instants de temps. Es confirma la descripció realitzada anteriorment. Així, al principi de la contracció, els extrems de la cèl·lula s'aproximen a la zona central i posteriorment durant la relaxació s'allunyen de la mateixa. Els moviments de desplaçament horitzontal, $u(t)$, són pràcticament simètrics respecte l'eix vertical hipotètic del cardiomiòcit.

3.6.2.2 Deformacions E_{xx} , E_{yy} i E_{xy}

La Fig. 3.33 mostra el camp de deformacions en el mateix temps $t = 0,564 s$, que correspon aproximadament a la contracció màxima del cardiomiòcit. Es pot observar que la deformació longitudinal E_{xx} és molt uniforme i presenta sempre un valor negatiu, és a dir, es tracta d'un escurçament generalitzat compatible amb l'evident contracció cel·lular. Els valors, expressats en percentatge de deformació, oscil·len aproximadament entre $-2,5\%$ i -5% , amb una gran majoria de punts al voltant del -4% . De fet, la mitjana màxima és precisament aquest valor -4% , com es mostra en la Fig. 3.34, on es representa gràficament la seva evolució temporal durant tot el període de la contracció des de $t = 0 s$ fins a $t = 1.6 s$. Els resultats han estat obtinguts seleccionant els paràmetres DIC de radi del subconjunt $r = 22 \text{ píxel}$ i un espaiat entre subconjunts $d = 3 \text{ píxel}$.

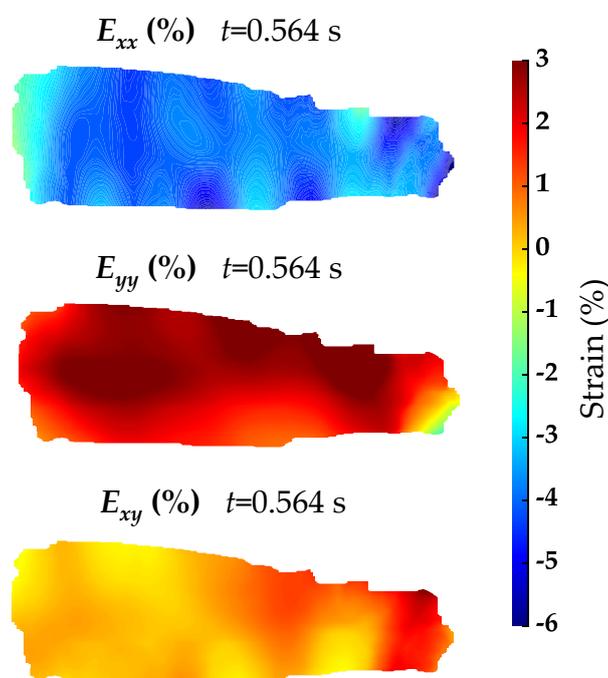


Figura 3.33. Camp de deformació $E_{xx}(t)$, $E_{yy}(t)$ i $E_{xy}(t)$ en el temps $t = 0.564 s$ corresponent al final de la fase de contracció.

Els valors obtinguts per a la deformació transversal, E_{yy} , també són força uniformes en el temps estudiat de $t = 0.564 s$ i sempre tenen signe positiu, és a dir, són dilatacions transversals. El valor mitjà màxim és d'aproximadament $E_{yy} = + 2\%$ (en percentatge), veure Fig. 3.34. Si calculem la relació entre les dues deformacions, E_{yy} i E_{xx} , és d'aproximadament 0.5, com podem verificar a continuació:

$$ratio = \frac{|E_{yy}|}{|E_{xx}|} \approx \frac{|+2\%|}{|-4\%|} = 0.5 \quad (3.39)$$

Aquesta ràtio entre deformacions correspon a l'anomenat coeficient de Poisson en la mecànica dels medis continus. El seu valor 0.5 és freqüent en els materials biològics que segueixen el model teòric de comportament d'un material incompressible, per exemple segons les medicacions efectuades per Radmacher amb AFM (Radmacher. 1997). És interessant de remarcar l'article de Emig (Emig et al. 2021), on trobem una revisió completa de tots els mètodes per obtenir constants mecàniques, especialment cardiomiòcits. En la mateixa Fig. 3.33, s'observa que la deformació angular màxima E_{xy} és relativament menor en comparació amb els valors obtinguts per a les deformacions lineals E_{xx} i E_{yy} . En conclusió, el cardiomiòcit mostra bàsicament una contracció longitudinal al llarg de l'eix x .

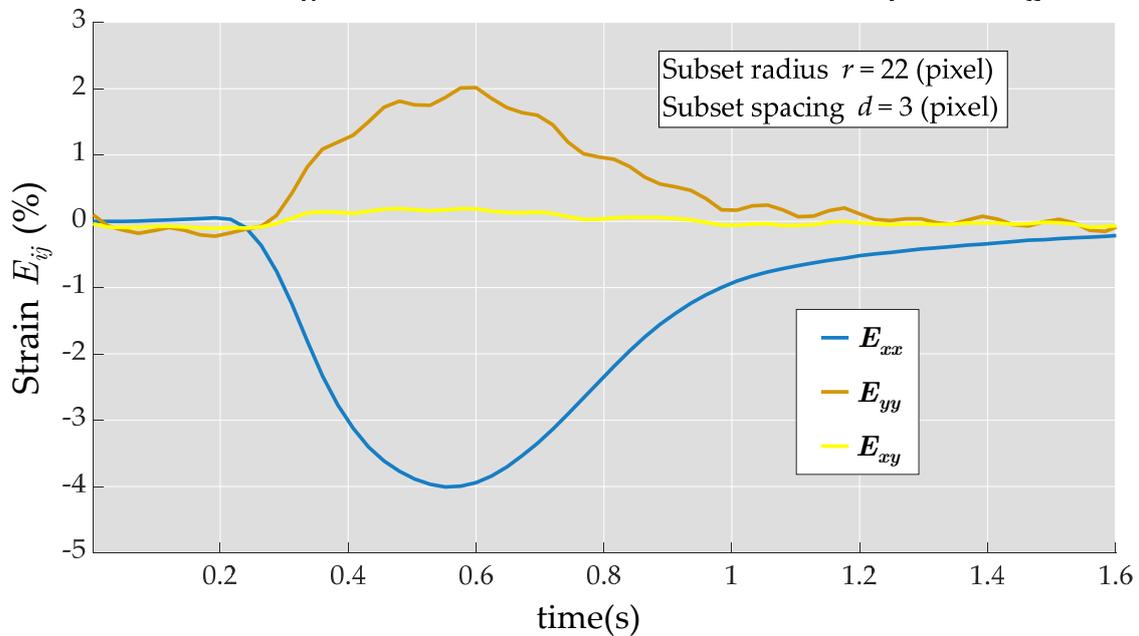


Figura 3.34. Evolució temporal dels valors mitjans de les deformacions en E_{xx} i E_{yy} durant tot el període d'una contracció experimental. Radi de subconjunt $r = 22$ píxels i espaiat de subconjunt $d = 3$ píxels.

A més, es pot concloure que la distorsió angular i les deformacions per flexió (*bending*) (veure Fig. 3.15.D i Fig. 3.15.E), no són rellevants per a aquest cas estudiat. No s'exclou que els cardiomiòcits amb certes patologies o sota els efectes d'uns fàrmacs puguin presentar altres comportaments diferents. En definitiva, aquesta mateixa metodologia desenvolupada en aquesta tesi seria extensible a altres estudis sobre cardiomiòcits singulars. Finalment, cal precisar que en primera aproximació es podria considerar que les deformacions són força uniformes en un instant determinat, per exemple, són del mateix ordre de

magnitud i no s'observa inversió de signe. Ara bé, això no és exactament així, especialment a les fases preliminars i finals de la contracció. La Fig. 3.35 mostra de forma molt magnificada la variació dels valors de E_{xx} , E_{yy} i E_{xy} durant un determinat instant que està ubicat dins la fase intermèdia de relaxació del cardiomiòcit. Es tracta d'un cas escollit que mostra una significativa variabilitat relativa. Així, pel cas de la deformació longitudinal E_{xx} la mitjana és de -1.44% , amb uns valors extrems entre -1.15% i -1.65% . La deformació longitudinal E_{yy} té una mitjana de $+0.87\%$, amb uns valors extrems entre $+0.51\%$ i $+1.16\%$. Finalment, la deformació angular E_{xy} presenta valors inferiors però amb alta variabilitat i inclosa una inversió de signe. Així la mitjana és $+0.13\%$, amb valors extrems entre -0.10% i $+0.65\%$.

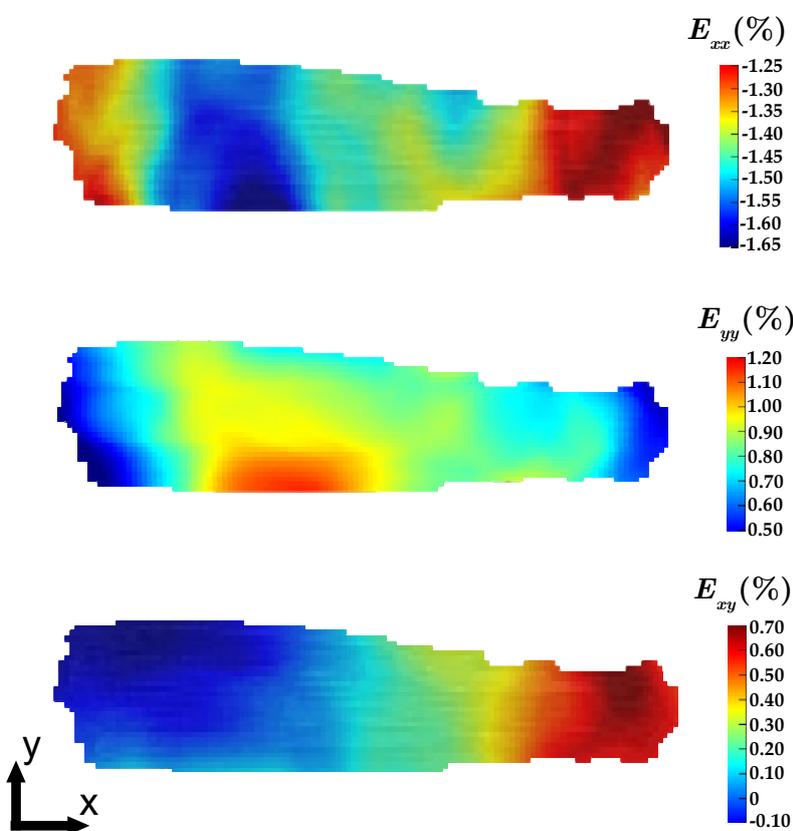


Figura 3.35 Magnificació de les escales per a visualitzar la variació dels valors de: E_{xx} , E_{yy} i E_{xy} durant un instant corresponent a la fase intermèdia de la relaxació.

Finalment, cal comentar que les direccions corresponents als eixos de referència, x - y , han estat suficientment adequades per a treballar en aquest cas concret, ja els cardiomiòcits han estat orientats correctament en el microscopi. Ara bé, en general, ens podríem trobar que la cèl·lula tingués una inclinació inicial incorrecta o que durant el procés de contracció la cèl·lula experimentés

moviments i rotacions importants. Així, és recomanable treballar amb les deformacions principals, el valors propis (*eigenvalues*) E_1 i E_2 , i les direccions principals o vectors propis (*eigenvectors*) 1-2, obtingudes mitjançant la diagonalització del tensor deformació:

$$E(\vec{x}, t) = \begin{bmatrix} E_{xx} & E_{xy} \\ E_{xy} & E_{yy} \end{bmatrix}_{x,y} \xrightarrow{\text{diag}} \begin{bmatrix} E_1 & 0 \\ 0 & E_2 \end{bmatrix}_{1,2} \quad (3.40)$$

Així, els valors propis (*eigenvalues*) E_1 i E_2 vindran donats per la següent expressió:

$$E_1 = \frac{E_{xx} + E_{yy}}{2} + \sqrt{\left(\frac{E_{xx} - E_{yy}}{2}\right)^2 + E_{xy}^2}$$

$$E_2 = \frac{E_{xx} + E_{yy}}{2} - \sqrt{\left(\frac{E_{xx} - E_{yy}}{2}\right)^2 + E_{xy}^2} \quad (3.41)$$

D'aquesta manera, la deformació principal màxima, E_2 (negativa), seria més representativa de la deformació dominant per contracció del cardiomiòcit, ja que les dues orientacions: l'eix fisiològic del cardiomiòcit i la direcció principal, E_2 , són pràcticament coincidents, com s'està deduint en el present estudi.

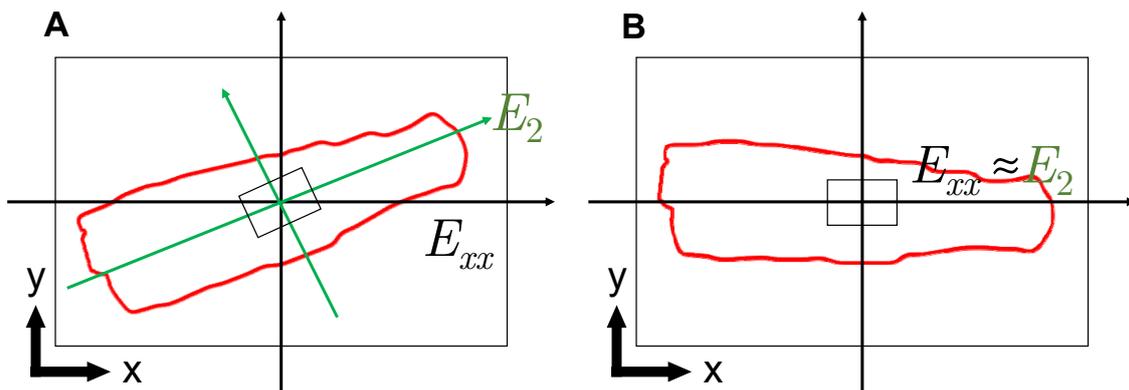


Fig. 3.36. Transformació a coordenades a direccions principals. **A.** L'orientació és arbitrària, E_2 correspondria a la contracció dominant de la cèl·lula. **B.** L'eix fisiològic del cardiomiòcit coincideix amb l'eix x , $E_{xx} \approx E_2$.

Ara bé, si inicialment l'eix fisiològic del cardiomiòcit coincideix amb l'eix x , conseqüència d'una bona alineació per part de l'operador del microscopi i, a

més, això es manté durant els moviments de la cèl·lula, resulta que les diferències entre E_{xx} i E_2 són mínimes i es compleix que $E_{xx} \approx E_2$, com mostra la Fig. 3.36. De forma alternativa, en el present estudi es proposa treballar amb una deformació equivalent en el pla $x-y$, anomenada E_{equiv}^{x-y} , on els valors han estat promitjats en tota la cèl·lula. Així el resultat serà indiferent respecte als eixos de treball escollits en el posicionament de la cèl·lula respecte al CCD de la càmera del microscopi. La tensió equivalent, en el pla $x-y$, s'ha definit de la manera següent:

$$E_{equiv}^{x-y} = \sqrt{E_{xx}^2 + E_{yy}^2 - (E_{xx} \cdot E_{yy}) + 3 \cdot E_{xy}^2} = \sqrt{E_1^2 + E_2^2 - (E_1 \cdot E_2)} \quad (3.42)$$

Aquesta deformació promig engloba les dues deformacions longitudinals, E_{xx} i E_{yy} , i magnifica per el factor x 3 la component corresponent a la distorsió angular, E_{xy} . La fórmula està inspirada en el criteri de falla tensional de von Mises. Té avantatjosament un format de tipus escalar, de valor sempre positiu, i és de fàcil manipulació respecte al format tensorial de les components del tensor deformació, això és especialment adequat per efectuar correlacions directes amb altres paràmetres fisiològics. La Fig. 3.37 mostra l'evolució temporal de deformació equivalent, E_{equiv}^{x-y} , durant un recull de cicles de contracció representatius.

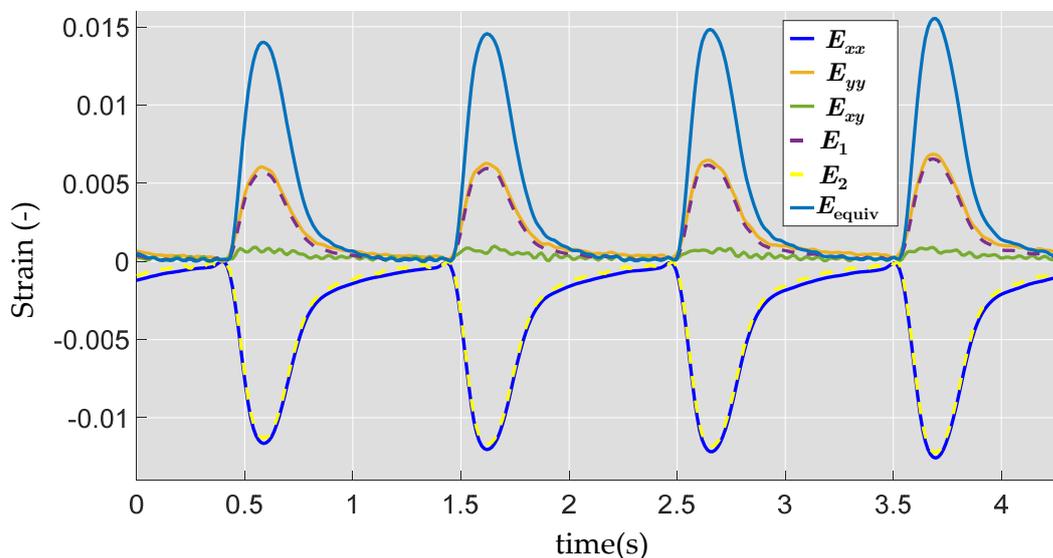


Fig. 3.37 Valors de les deformacions durant un cicle de contracció complet. S'observa que les diferències entre E_{xx} i E_2 són mínimes, ja que l'orientació inicial del cardiomiòcit al microscopi era la correcta.

Els sistemes disponibles actualment per a mesurar la contractilitat en cèl·lules cardíques pressuposen que els cardiomiòcits es troben alineats amb del sistema d'obtenció d'imatges del microscopi també i que la seva contracció sigui axial

(Tang et al. 2019). La metodologia proposada de treballar amb la deformació principal, E_1 , la deformació secundària, E_2 , i les deformació equivalent, E_{equiv}^{x-y} , suprimeix el problema de procurar alinear el cardiomiòcit manualment amb l'eix del sistema de gravació del microscopi.

3.6.2.3 Avaluació de la longitud del sarcolemma

Avaluar el canvi de longitud del sarcolemma en un cardiomiòcit és crucial per comprendre la contracció cardíaca, la força generada i els mecanismes de regulació ja que proporciona informació sobre la funció contràctil del cor, la seva capacitat de bombeig i la detecció precoç de malalties cardíacques. Varis autors (Tang et al. 2019, Cheuck et al. 2021), evaluen el canvi de la longitud del sarcolemma. En concret (Tang et al. 2019), valida el canvi de la la longitud del sarcolemma amb rotacions sintètiques i obté un error mínim inferior al 0,012% per a un angle 90° . L'avaluació de la variació de la longitud del cardiomiòcit durant el procés de contracció hauria de considerar que la cèl·lula podria no estar alineada correctament sobre l'eix x de referència i que durant el procés es poden produir moviments importants de sòlid rígid, especialment la rotació del cardiomiòcit. L'ús de la metodologia DIC permet donar una solució pràctica i robusta a les dues problemàtiques anteriors. El principi de mesura es basa en el seguiment de dos marcadors virtuals ubicats en els extrems de la cèl·lula.

La Fig. 3.38 mostra un plantejament general del problema. El marcador virtual 1 té la posició inicial (x_1, y_1) i el marcador virtual 2 té la posició inicial (x_2, y_2) . L'orientació inicial del cardiomiòcit és totalment arbitrària i la seva longitud inicial és L_0 .

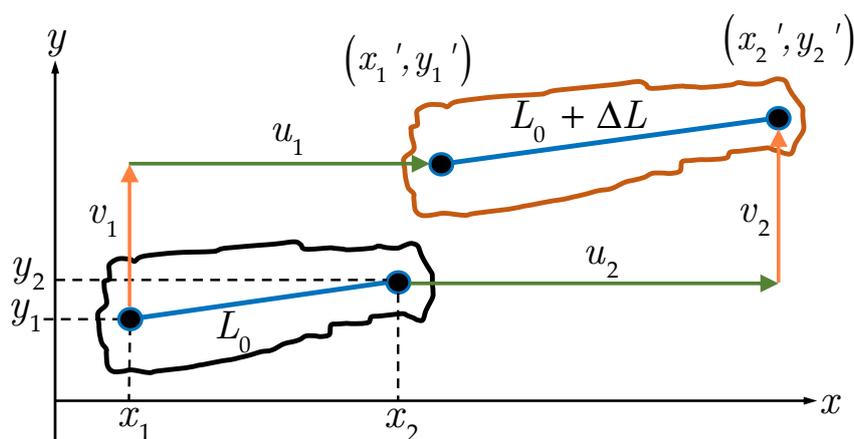


Fig. 3.38 Càlcul de la longitud del sarcolemma mitjançant els marcadors virtuals.

Un cop produïda la deformació i el possible moviment de sòlid rígid de la línia de referència, els marcadors ocupen unes noves posicions (x_1', y_1') i (x_2', y_2') respectivament.

La metodologia DIC identifica les noves posicions dels marcadors amb l'ajut de la textura natural del cardiomiòcit. Els moviments obtinguts són (u_1, v_1) i (u_2, v_2) respectivament.

Una senzilla aplicació del teorema de Pitàgores permet trobar la longitud inicial L_0 i la longitud final $L_0 + \Delta L$, de la manera següent:

$$\begin{aligned} L_0 &= \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2} \\ L_0 + \Delta L &= \sqrt{[(x_2 + u_2) - (x_1 + u_1)]^2 + [(y_2 + v_2) - (y_1 + v_1)]^2} \end{aligned} \quad (3.43)$$

La Fig. 3.39 mostra el resultat obtingut per l'aplicació sistemàtica d'aquest procediment al procés de contracció i relaxació durant un total de 4 períodes. L'escurçament de la longitud és funció del temps i s'observa clarament que la contracció és més ràpida que la relaxació posterior.

A continuació, a l'apartat següent, es procedirà a la correlació temporal entre la longitud del sarcolemma i el senyal de calci. Recentment, l'equip de Cheuck de Auckland (Nova Zelanda) compara las variacions de la longitud del sarcolemma i la deformació Exx (en un determinat punt) durant el procés de contracció (Cheuck et al. 2021). La comparació es descriptiva, no utilitza cap mesura de correlació. Tampoc compara el canvi de longitud del sarcolemma amb el senyal de calci, ja que no disposa d'aquestes imatges.

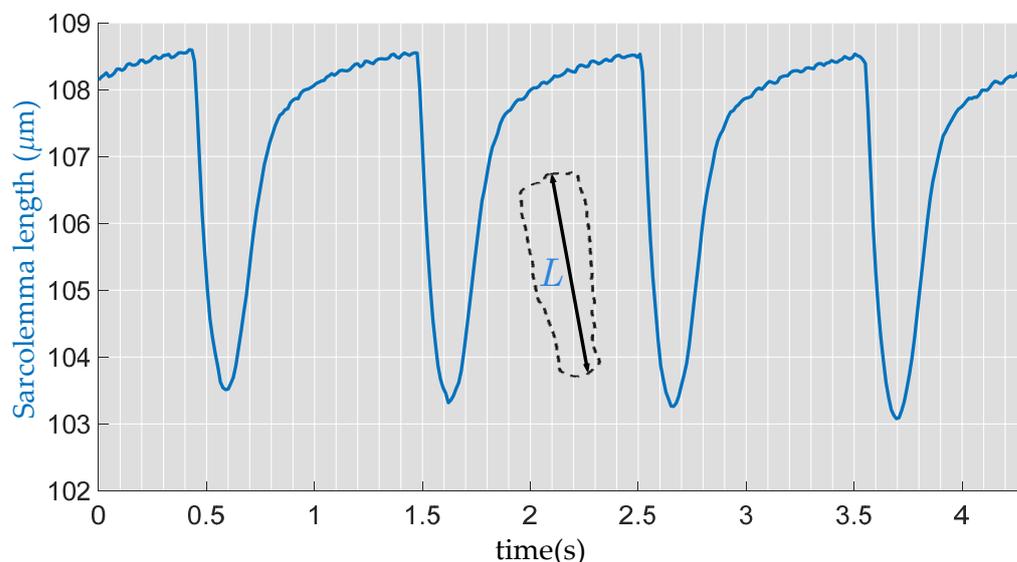


Fig. 3.39 Càlcul de l'evolució de la longitud del sarcolemma durant diverses contraccions experimentals d'un cardiomiocit aïllat.

3.6.2.4 Correlació de la deformació amb el senyal de calci

En aquest apartat s'estudia la correlació entre les deformacions del cardiomiòcit i l'alliberament de calci en les diferents fases de la contracció i relaxació. En primer lloc, la Fig. 3.40 mostra un clar seguiment temporal entre la variació de la longitud del sarcolemma i el senyal de calci Ca^{2+} ponderat a la totalitat de la cel·lula.

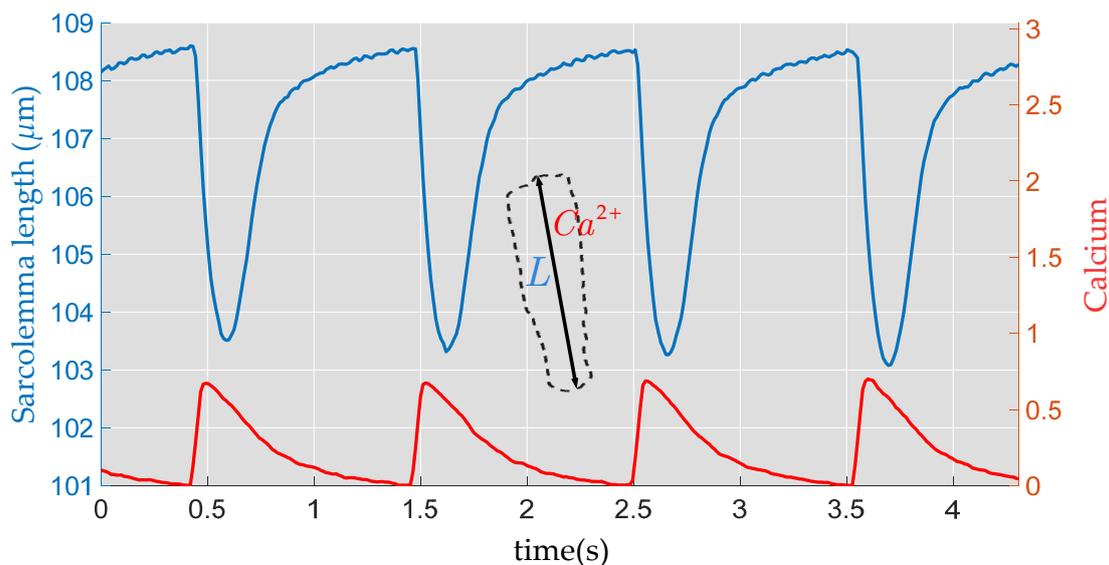


Fig. 3.40 Comparació entre la longitud del sarcolemma (blau) i el senyal de calci (vermell) durant diverses contraccions experimentals d'un cardiomiòcit aïllat.

Aquesta correspondència es confirma també fent intervenir a la comparativa el senyal de la deformació equivalent, E_{equiv}^{x-y} , que és la ponderada a la globalitat de la cel·lula. En el gràfic de la Fig. 3.41.A on es solapen ambdues senyals, hom pot observar millor aquesta correspondència, però un estudi de la correlació creuada normalitzada entre els dos senyals ho corrobora i proporciona un retard temporal general (*lag*) de 0.035 s (veure Fig. 3.41.B).

Així, un desfasament (*lag*) entre el senyal de calci i el senyal de la deformació equivalent, E_{equiv}^{x-y} , indica que la resposta de la deformació segueix amb un retard general a l'esdeveniment de calci, hi ha un retard temporal (*lag*) de 0.035 s del senyal de deformació equivalent respecte al senyal de calci. En altres paraules, hi ha un desfasament temporal entre els dos senyals i els canvis en la deformació es produeixen després del calci. Per tant, la resposta mecànica del cardiomiòcit és un efecte secundari a l'estimulació del calci i podria indicar que la resposta cel·lular triga un cert temps a alliberar el ions de calci necessaris per

la posterior unió a la proteïna contràctil troponina C (TnC) per provocar la contracció del múscul cardíac.

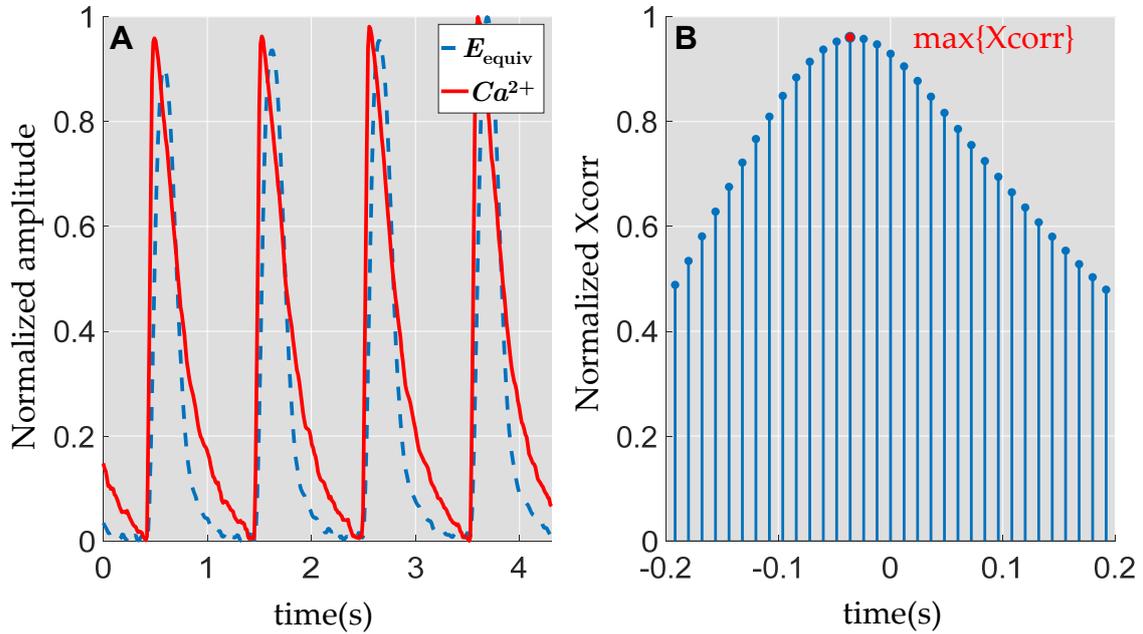


Fig. 3.41 A. Computació de la deformació equivalent, E_{equiv} , (blau) i el senyal de calci, Ca^{2+} , (vermell) durant les contraccions experimentals d'un cardiomiòcit aïllat.
B. Correlació creuada normalitzada entre la deformació equivalent, E_{equiv} , i el senyal de calci, Ca^{2+} .

Es defineix la velocitat de la deformació longitudinal, $\dot{E}_{\text{equiv}}^{x-y}$, com la derivada temporal de la deformació:

$$\dot{E}_{\text{equiv}}^{x-y} = \frac{\partial E_{\text{equiv}}^{x-y}}{\partial t} \quad (3.44)$$

De forma similar, es defineix la velocitat del senyal de calci, \dot{Ca}^{2+} , com la seva derivada temporal:

$$[Ca^{2+}] = \dot{Ca}^{2+} = \frac{\partial Ca^{2+}}{\partial t} \quad (3.45)$$

La derivada del senyal de calci representa la velocitat de canvi de la concentració de calci, $[Ca^{2+}]$ al llarg del temps. Els valors que caracteritzen la dinàmica dels senyals calci i deformació en mostren a la [Taula 3.4](#). La [Fig. 3.42](#) mostra l'evolució dels senyals de la deformació equivalent i d'alliberament de calci, i també les seves derivades temporals definides a les [equacions 3.44](#) i [3.45](#). Podem observar que hi ha un seguiment i sincronia a tots els registres.

criteri de correlació	Fase de contracció	Fase de relaxació
Retard absolut entre dos senyals E_{xx}^{x-y} versus Ca^{2+}	Pràcticament retard zero a l'inici de la contracció $\Delta t_C \approx 0 \text{ s}$	Retard de 0.10 s entre màxims a l'inici de la relaxació $\Delta t_R \approx 0.10 \text{ s}$
Velocitat del senyal, \dot{E}_{equiv}^{x-y} (al 50% $E_{equiv, \text{màx}}$)	$\dot{E}_{equiv}^{x-y} = \frac{\partial E_{equiv}^{x-y}}{\partial t} \approx 10.3$	$\dot{E}_{equiv}^{x-y} = \frac{\partial E_{equiv}^{x-y}}{\partial t} \approx -5.45$
Velocitat del senyal, \dot{Ca}^{2+} (al 50% $Ca^{2+}_{\text{màx}}$)	$\dot{Ca}^{2+} = \frac{\partial Ca^{2+}}{\partial t} \approx 20.1$	$\dot{Ca}^{2+} = \frac{\partial Ca^{2+}}{\partial t} \approx -1.83$

Taula 3.4. Correlació entre els senyals normalitzats de la deformació E_{equiv}^{x-y} i el senyal de calci Ca^{2+} durant un període de contracció.

L'inici del registre d'ambdós senyals, E_{xx}^{x-y} versus Ca^{2+} , és pràcticament simultani dins la fase inicial de la contracció, $\Delta t_C \approx 0 \text{ s}$. Per contra, l'evolució de les dos senyals no és la mateixa, com ara es quantificarà amb les velocitats normalitzades, i hi ha un retard de 0.10 s entre màxims a l'inici de la relaxació, de valor concret $\Delta t_R \approx 0.10 \text{ s}$ (veure [Taula 3.3](#)).

Respecte a la velocitat normalitzada de creixement a la fase de contracció, s'observa l'alliberament de calci creix més ràpidament que la deformació. La [Taula 3.4](#) indica que és quasi el doble $\dot{Ca}^{2+} \approx 20.1$ respecte de $\dot{E}_{equiv}^{x-y} \approx 10.3$. Per contra, durant la fase de relaxació succeeix el contrari, la deformació disminueix més ràpidament, $\dot{E}_{equiv}^{x-y} \approx -5.45$ respecte de $\dot{Ca}^{2+} \approx -1.83$.

Cal remarcar que aquest valors han estat determinats al 50% del valor màxim de les senyals, de fet la velocitat de disminució del calci encara s'alenteix més a les fases finals de la relaxació (veure [Fig. 3.42](#)). Les mesures no tenen unitats, donat que es tracta de senyals normalitzats.

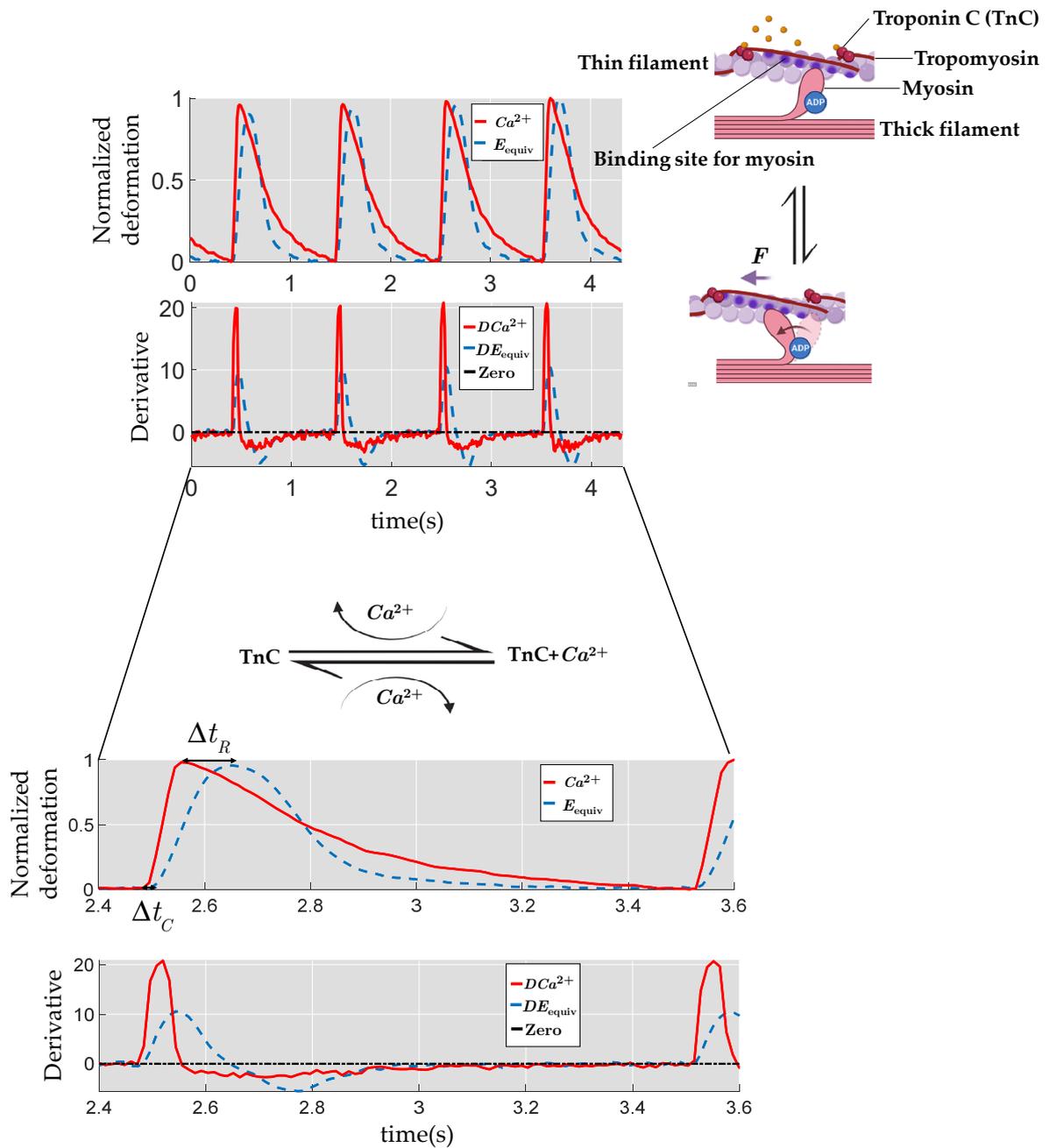


Fig. 3.42. Velocitat de deformació longitudinal \dot{E}_{xx} (vermell) i velocitat del senyal de calci \dot{Ca}^{2+} (blau) durant les contraccions experimentals del cardiomiòcit i mecanisme d'adhesió del calci a la proteïna contractil TnC .

Referències

- [1] Lloyd-Jones, D.; Adams, R.J.; Brown, T.M.; Carnethon, M.; Dai, S.; De Simone, G.; Ferguson, T.B.; Ford, E.; Furie, K.; Gillespie, C.; et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2010 Update. *Circulation* 2010, 121, 948–954, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192666.
- [2] McClellan, M.; Brown, N.; Califf, R.M.; Warner, J.J. Call to Action: Urgent Challenges in Cardiovascular Disease: A Presidential Advisory From the American Heart Association. *Circulation* 2019, 139, doi:10.1161/CIR.0000000000000652.
- [3] Roth, G.A.; Mensah, G.A.; Johnson, C.O.; Addolorato, G.; Ammirati, E.; Baddour, L.M.; Barengo, N.C.; Beaton, A.Z.; Benjamin, E.J.; Benziger, C.P.; et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. *J Am Coll Cardiol* 2020, 76, 2982–3021, doi:10.1016/j.jacc.2020.11.010.
- [4] Jessup, M.; Brozena, S. Heart Failure. *New England Journal of Medicine* 2003, 348, 2007–2018, doi:10.1056/NEJMra021498.
- [5] Patel, J.K.; Kobashigawa, J.A. Heart Transplantation. *Circulation* 2011, 124, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.017319.
- [6] Jara Avaca, M.; Gruh, I. Bioengineered Cardiac Tissue Based on Human Stem Cells for Clinical Application. In: 2017; pp. 117–146.
- [7] Chingale, M.; Zhu, D.; Cheng, K.; Huang, K. Bioengineering Technologies for Cardiac Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol* 2021, 9, doi:10.3389/fbioe.2021.681705.
- [8] Soonpaa, M.H.; Field, L.J. Survey of Studies Examining Mammalian Cardiomyocyte DNA Synthesis. *Circ Res* 1998, 83, 15–26, doi:10.1161/01.RES.83.1.15.
- [9] Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 2007, 131, 861–872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [10] Yu, J.; Vodyanik, M.A.; Smuga-Otto, K.; Antosiewicz-Bourget, J.; Frane, J.L.; Tian, S.; Nie, J.; Jonsdottir, G.A.; Ruotti, V.; Stewart, R.; et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* (1979) 2007, 318, 1917–1920, doi:10.1126/science.1151526.
- [11] Lian, X.; Zhang, J.; Azarin, S.M.; Zhu, K.; Hazeltine, L.B.; Bao, X.; Hsiao, C.; Kamp, T.J.; Palecek, S.P. Directed Cardiomyocyte Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells by Modulating Wnt/ β -Catenin Signaling under Fully Defined Conditions. *Nat Protoc* 2013, 8, 162–175, doi:10.1038/nprot.2012.150.
- [12] Zhang, J.; Klos, M.; Wilson, G.F.; Herman, A.M.; Lian, X.; Raval, K.K.; Barron, M.R.; Hou, L.; Soerens, A.G.; Yu, J.; et al. Extracellular Matrix Promotes Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Circ Res* 2012, 111, 1125–1136, doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.273144.
- [13] Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J.; Marshall, V.S.; Jones, J.M. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* (1979) 1998, 282, 1145–1147, doi:10.1126/science.282.5391.1145.

- [14] Zhang, J.; Wilson, G.F.; Soerens, A.G.; Koonce, C.H.; Yu, J.; Palecek, S.P.; Thomson, J.A.; Kamp, T.J. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circ Res* 2009, 104, doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.192237.
- [15] Kehat, I.; Kenyagin-Karsenti, D.; Snir, M.; Segev, H.; Amit, M.; Gepstein, A.; Livne, E.; Binah, O.; Itskovitz-Eldor, J.; Gepstein, L. Human Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Myocytes with Structural and Functional Properties of Cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation* 2001, 108, 407–414, doi:10.1172/JCI12131.
- [16] Mummery, C.L.; Zhang, J.; Ng, E.S.; Elliott, D.A.; Elefanty, A.G.; Kamp, T.J. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes. *Circ Res* 2012, 111, 344–358, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227512.
- [17] Burridge, P.W.; Matsa, E.; Shukla, P.; Lin, Z.C.; Churko, J.M.; Ebert, A.D.; Lan, F.; Diecke, S.; Huber, B.; Mordwinkin, N.M.; et al. Chemically Defined Generation of Human Cardiomyocytes. *Nat Methods* 2014, 11, 855–860, doi:10.1038/nmeth.2999.
- [18] Shimizu, T.; Shiohara, M.; Tai, T.; Nagao, K.; Nakajima, K.; Kobayashi, H. Derivation of Integration-Free iPSCs from a Klinefelter Syndrome Patient. *Reprod Med Biol* 2016, 15, 35–43, doi:10.1007/s12522-015-0213-9.
- [19] Hashimoto, A.; Naito, A.T.; Lee, J.-K.; Kitazume-Taneike, R.; Ito, M.; Yamaguchi, T.; Nakata, R.; Sumida, T.; Okada, K.; Nakagawa, A.; et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Patients With Duchenne Muscular Dystrophy and Their Induction to Cardiomyocytes. *Int Heart J* 2016, 57, 112–117, doi:10.1536/ihj.15-376.
- [20] Pollard, C.E.; Valentin, J.-P.; Hammond, T.G. Strategies to Reduce the Risk of Drug-Induced QT Interval Prolongation: A Pharmaceutical Company Perspective. *Br J Pharmacol* 2008, 154, 1538–1543, doi:10.1038/bjp.2008.203.
- [21] Blair, C.A.; Pruitt, B.L. Mechanobiology Assays with Applications in Cardiomyocyte Biology and Cardiotoxicity. *Adv Healthc Mater* 2020, 9, 1901656, doi:10.1002/adhm.201901656.
- [22] Laflamme, M.A.; Chen, K.Y.; Naumova, A. V; Muskheli, V.; Fugate, J.A.; Dupras, S.K.; Reinecke, H.; Xu, C.; Hassanipour, M.; Police, S.; et al. Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells in Pro-Survival Factors Enhance Function of Infarcted Rat Hearts. *Nat Biotechnol* 2007, 25, 1015–1024, doi:10.1038/nbt1327.
- [23] Parker, K.K.; Ingber, D.E. Extracellular Matrix, Mechanotransduction and Structural Hierarchies in Heart Tissue Engineering. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2007, 362, 1267–1279, doi:10.1098/rstb.2007.2114.
- [24] Chabiniok, R.; Wang, V.Y.; Hadjicharalambous, M.; Asner, L.; Lee, J.; Sermesant, M.; Kuhl, E.; Young, A.A.; Moireau, P.; Nash, M.P.; et al. Multiphysics and Multiscale Modelling, Data–Model Fusion and Integration of Organ Physiology in the Clinic: Ventricular Cardiac Mechanics. *Interface Focus* 2016, 6, 20150083, doi:10.1098/rsfs.2015.0083.
- [25] Glower, D.D.; Spratt, J.A.; Snow, N.D.; Kabas, J.S.; Davis, J.W.; Olsen, C.O.; Tyson, G.S.; Sabiston, D.C.; Rankin, J.S. Linearity of the Frank-Starling Relationship

- in the Intact Heart: The Concept of Preload Recrutable Stroke Work. *Circulation* 1985, 71, 994–1009, doi:10.1161/01.CIR.71.5.994.
- [26] Braunwald, E.; Ross, J. Applicability of Starling's Law of the Heart to Man. *Circ Res* 1964, 15, SUPPL 2:169-81.
- [27] Yelamarty, R. V.; Moore, R.L.; Yu, F.T.; Elensky, M.; Semanchick, A.M.; Cheung, J.Y. Relaxation Abnormalities in Single Cardiac Myocytes from Renovascular Hypertensive Rats. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 1992, 262, C980–C990, doi:10.1152/ajpcell.1992.262.4.C980.
- [28] Yin, S.; Zhang, X.; Zhan, C.; Wu, J.; Xu, J.; Cheung, J. Measuring Single Cardiac Myocyte Contractile Force via Moving a Magnetic Bead. *Biophys J* 2005, 88, 1489–1495, doi:10.1529/biophysj.104.048157.
- [29] Hazeltine, L.B.; Simmons, C.S.; Salick, M.R.; Lian, X.; Badur, M.G.; Han, W.; Delgado, S.M.; Wakatsuki, T.; Crone, W.C.; Pruitt, B.L.; et al. Effects of Substrate Mechanics on Contractility of Cardiomyocytes Generated from Human Pluripotent Stem Cells. *Int J Cell Biol* 2012, 2012, 1–13, doi:10.1155/2012/508294.
- [30] Bers, D.M. Cardiac Excitation–Contraction Coupling. *Nature* 2002, 415, 198–205, doi:10.1038/415198a.
- [31] Fabiato, A. Calcium-Induced Release of Calcium from the Sarcoplasmic Reticulum. *Cell Physiology* 1983, 245, 275–285.
- [32] Scoote, M. The Cardiac Ryanodine Receptor (Calcium Release Channel) Emerging Role in Heart Failure and Arrhythmia Pathogenesis. *Cardiovasc Res* 2002, 56, 359–372, doi:10.1016/S0008-6363(02)00574-6.
- [33] Roderick, H.L.; Berridge, M.J.; Bootman, M.D. Calcium-Induced Calcium Release. *Current Biology* 2003, 13, R425, doi:10.1016/S0960-9822(03)00358-0.
- [34] Peng, W.; Shen, H.; Wu, J.; Guo, W.; Pan, X.; Wang, R.; Chen, S.R.W.; Yan, N. Structural Basis for the Gating Mechanism of the Type 2 Ryanodine Receptor RyR2. *Science* (1979) 2016, 354, aah5324, doi:10.1126/science.aah5324.
- [35] Mulieri, L.A.; Hasenfuss, G.; Leavitt, B.; Allen, P.D.; Alpert, N.R. Altered Myocardial Force-Frequency Relation in Human Heart Failure. *Circulation* 1992, 85, 1743–1750, doi:10.1161/01.CIR.85.5.1743.
- [36] Witjas-Paalberends, E.R.; Piroddi, N.; Stam, K.; van Dijk, S.J.; Oliviera, V.S.; Ferrara, C.; Scellini, B.; Hazebroek, M.; ten Cate, F.J.; van Slegtenhorst, M.; et al. Mutations in MYH7 Reduce the Force Generating Capacity of Sarcomeres in Human Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2013, 99, 432–441, doi:10.1093/cvr/cvt119.
- [37] Vikhorev, P.; Vikhoreva, N. Cardiomyopathies and Related Changes in Contractility of Human Heart Muscle. *Int J Mol Sci* 2018, 19, 2234, doi:10.3390/ijms19082234.
- [38] Ujfalusi, Z.; Vera, C.D.; Mijailovich, S.M.; Svicevic, M.; Yu, E.C.; Kawana, M.; Ruppel, K.M.; Spudich, J.A.; Geves, M.A.; Leinwand, L.A. Dilated Cardiomyopathy Myosin Mutants Have Reduced Force-Generating Capacity. *Journal of Biological Chemistry* 2018, 293, 9017–9029, doi:10.1074/jbc.RA118.001938.
- [39] Cuomo, A.; Rodolico, A.; Galdieri, A.; Russo, M.; Campi, G.; Franco, R.; Bruno, D.; Aran, L.; Carannante, A.; Attanasio, U.; et al. Heart Failure and Cancer:

Mechanisms of Old and New Cardiotoxic Drugs in Cancer Patients. *Card Fail Rev* 2019, 5, 112–118, doi:10.15420/cfr.2018.32.2.

[40] Harris, A.K.; Wild, P.; Stopak, D. Silicone Rubber Substrata: A New Wrinkle in the Study of Cell Locomotion. *Science* (1979) 1980, 208, 177–179, doi:10.1126/science.6987736.

[41] Wang, J.H.-C.; Lin, J.-S. Cell Traction Force and Measurement Methods. *Biomech Model Mechanobiol* 2007, 6, 361–371, doi:10.1007/s10237-006-0068-4.

[42] Neu, C.P.; Genin, G.M. *Handbook of Imaging in Biological Mechanics*; Neu, C.P., Genin, G.M., Eds.; CRC Press, 2014; ISBN 9780429073670.

[43] Wei, X.; Zhuang, L.; Li, H.; He, C.; Wan, H.; Hu, N.; Wang, P. Advances in Multidimensional Cardiac Biosensing Technologies: From Electrophysiology to Mechanical Motion and Contractile Force. *Small* 2020, 16.

[44] Hersch, N.; Wolters, B.; Dreissen, G.; Springer, R.; Kirchgeßner, N.; Merkel, R.; Hoffmann, B. The Constant Beat: Cardiomyocytes Adapt Their Forces by Equal Contraction upon Environmental Stiffening. *Biol Open* 2013, 2, 351–361, doi:10.1242/bio.20133830.

[45] Pasqualini, F.S.; Agarwal, A.; O'Connor, B.B.; Liu, Q.; Sheehy, S.P.; Parker, K.K. Traction Force Microscopy of Engineered Cardiac Tissues. *PLoS One* 2018, 13, doi:10.1371/journal.pone.0194706.

[46] Wheelwright, M.; Win, Z.; Mikkila, J.L.; Amen, K.Y.; Alford, P.W.; Metzger, J.M. Investigation of Human iPSC-Derived Cardiac Myocyte Functional Maturation by Single Cell Traction Force Microscopy. *PLoS One* 2018, 13, e0194909, doi:10.1371/journal.pone.0194909.

[47] Tseng, Q.; Duchemin-Pelletier, E.; Deshiere, A.; Balland, M.; Guillou, H.; Filhol, O.; Théry, M. Spatial Organization of the Extracellular Matrix Regulates Cell–Cell Junction Positioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, 109, 1506–1511, doi:10.1073/pnas.1106377109.

[48] Butler, J.P.; Tolić-Nørrelykke, I.M.; Fabry, B.; Fredberg, J.J. Traction Fields, Moments, and Strain Energy That Cells Exert on Their Surroundings. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2002, 282, C595–C605, doi:10.1152/ajpcell.00270.2001.

[49] Bhana, B.; Iyer, R.K.; Chen, W.L.K.; Zhao, R.; Sider, K.L.; Likhitpanichkul, M.; Simmons, C.A.; Radisic, M. Influence of Substrate Stiffness on the Phenotype of Heart Cells. *Biotechnol Bioeng* 2010, n/a-n/a, doi:10.1002/bit.22647.

[50] Dou, W.; Malhi, M.; Zhao, Q.; Wang, L.; Huang, Z.; Law, J.; Liu, N.; Simmons, C.A.; Maynes, J.T.; Sun, Y. Microengineered Platforms for Characterizing the Contractile Function of in Vitro Cardiac Models. *Microsyst Nanoeng* 2022, 8.

[51] Ribeiro, A.J.S.; Ang, Y.-S.; Fu, J.-D.; Rivas, R.N.; Mohamed, T.M.A.; Higgs, G.C.; Srivastava, D.; Pruitt, B.L. Contractility of Single Cardiomyocytes Differentiated from Pluripotent Stem Cells Depends on Physiological Shape and Substrate Stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015, 112, 12705–12710, doi:10.1073/pnas.1508073112.

- [52] Clifford, C.A.; Seah, M.P. The Determination of Atomic Force Microscope Cantilever Spring Constants via Dimensional Methods for Nanomechanical Analysis. *Nanotechnology* 2005, 16, 1666–1680, doi:10.1088/0957-4484/16/9/044.
- [53] ISO 11775:2015. International Organization for Standardization 2015.
- [54] Sun, N.; Yazawa, M.; Liu, J.; Han, L.; Sanchez-Freire, V.; Abilez, O.J.; Navarrete, E.G.; Hu, S.; Wang, L.; Lee, A.; et al. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy. *Sci Transl Med* 2012, 4, doi:10.1126/scitranslmed.3003552.
- [55] Sumita Yoshikawa, W.; Nakamura, K.; Miura, D.; Shimizu, J.; Hashimoto, K.; Kataoka, N.; Toyota, H.; Okuyama, H.; Miyoshi, T.; Morita, H.; et al. Increased Passive Stiffness of Cardiomyocytes in the Transverse Direction and Residual Actin and Myosin Cross-Bridge Formation in Hypertrophied Rat Hearts Induced by Chronic β -Adrenergic Stimulation. *Circulation Journal* 2013, 77, 741–748, doi:10.1253/circj.CJ-12-0779.
- [56] Chen, A.T.; Zou, S. Evaluation of Drug-Mediated Arrhythmic Changes in Spontaneous Beating Cardiomyocytes by AFM. *Analyst* 2016, 141, 6303–6313, doi:10.1039/C6AN01577H.
- [57] Liu, J.; Sun, N.; Bruce, M.A.; Wu, J.C.; Butte, M.J. Atomic Force Mechanobiology of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *PLoS One* 2012, 7, doi:10.1371/journal.pone.0037559.
- [58] Domke, J.; Parak, W.J.; George, M.; Gaub, H.E.; Radmacher, M. Mapping the Mechanical Pulse of Single Cardiomyocytes with the Atomic Force Microscope. *European Biophysics Journal* 1999, 28, 179–186, doi:10.1007/s002490050198.
- [59] Nishimura, S.; Yasuda, S.; Katoh, M.; Yamada, K.P.; Yamashita, H.; Saeki, Y.; Sunagawa, K.; Nagai, R.; Hisada, T.; Sugiura, S. Single Cell Mechanics of Rat Cardiomyocytes under Isometric, Unloaded, and Physiologically Loaded Conditions. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2004, 287, H196–H202, doi:10.1152/ajpheart.00948.2003.
- [60] Gaitas, A.; Malhotra, R.; Li, T.; Herron, T.; Jalife, J. A Device for Rapid and Quantitative Measurement of Cardiac Myocyte Contractility. *Review of Scientific Instruments* 2015, 86, 034302, doi:10.1063/1.4915500.
- [61] Ahola, A.; Kiviaho, A.L.; Larsson, K.; Honkanen, M.; Aalto-Setälä, K.; Hyttinen, J. Video Image-Based Analysis of Single Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocyte Beating Dynamics Using Digital Image Correlation. *Biomed Eng Online* 2014, 13, 39, doi:10.1186/1475-925X-13-39.
- [62] Basoli, F.; Giannitelli, S.M.; Gori, M.; Mozetic, P.; Bonfanti, A.; Trombetta, M.; Rainer, A. Biomechanical Characterization at the Cell Scale: Present and Prospects. *Front Physiol* 2018, 9.
- [63] Hutter, J.L.; Bechhoefer, J. Calibration of Atomic-force Microscope Tips. *Review of Scientific Instruments* 1993, 64, 1868–1873, doi:10.1063/1.1143970.
- [64] Yadav, S.; Ta, H.T.; Nguyen, N. Mechanobiology in Cardiology: Micro- and Nanotechnologies to Probe Mechanosignaling. *View* 2021, 2, 20200080, doi:10.1002/VIW.20200080.

- [65] Tan, J.L.; Tien, J.; Pirone, D.M.; Gray, D.S.; Bhadriraju, K.; Chen, C.S. Cells Lying on a Bed of Microneedles: An Approach to Isolate Mechanical Force. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, 100, 1484–1489, doi:10.1073/pnas.0235407100.
- [66] Zhao, Y.; Zhang, X. Cellular Mechanics Study in Cardiac Myocytes Using PDMS Pillars Array. *Sens Actuators A Phys* 2006, 125, 398–404, doi:10.1016/j.sna.2005.08.032.
- [67] Fu, J.; Wang, Y.-K.; Yang, M.T.; Desai, R.A.; Yu, X.; Liu, Z.; Chen, C.S. Mechanical Regulation of Cell Function with Geometrically Modulated Elastomeric Substrates. *Nat Methods* 2010, 7, 733–736, doi:10.1038/nmeth.1487.
- [68] Kim, K.; Taylor, R.; Sim, J.Y.; Park, S.-J.; Norman, J.; Fajardo, G.; Bernstein, D.; Pruitt, B.L. Calibrated Micropost Arrays for Biomechanical Characterisation of Cardiomyocytes. *Micro Nano Lett* 2011, 6, 317, doi:10.1049/mnl.2011.0031.
- [69] Tanaka, Y.; Morishima, K.; Shimizu, T.; Kikuchi, A.; Yamato, M.; Okano, T.; Kitamori, T. Demonstration of a PDMS-Based Bio-Microactuator Using Cultured Cardiomyocytes to Drive Polymer Micropillars. *Lab Chip* 2006, 6, 230, doi:10.1039/b512099c.
- [70] Taylor, R.E.; Kim, K.; Sun, N.; Park, S.-J.; Sim, J.Y.; Fajardo, G.; Bernstein, D.; Wu, J.C.; Pruitt, B.L. Sacrificial Layer Technique for Axial Force Post Assay of Immature Cardiomyocytes. *Biomed Microdevices* 2013, 15, 171–181, doi:10.1007/s10544-012-9710-3.
- [71] Rodriguez, M.L.; Graham, B.T.; Pabon, L.M.; Han, S.J.; Murry, C.E.; Sniadecki, N.J. Measuring the Contractile Forces of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes With Arrays of Microposts. *J Biomech Eng* 2014, 136, doi:10.1115/1.4027145.
- [72] Beussman, K.M.; Rodriguez, M.L.; Leonard, A.; Taparia, N.; Thompson, C.R.; Sniadecki, N.J. Micropost Arrays for Measuring Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Contractility. *Methods* 2016, 94, 43–50, doi:10.1016/j.ymeth.2015.09.005.
- [73] Zhang, C.; Wang, W.; He, W.; Xi, N.; Wang, Y.; Liu, L. Dynamic Model for Characterizing Contractile Behaviors and Mechanical Properties of a Cardiomyocyte. *Biophys J* 2018, 114, 188–200, doi:10.1016/j.bpj.2017.11.002.
- [74] McCain, M.L.; Agarwal, A.; Nesmith, H.W.; Nesmith, A.P.; Parker, K.K. Micromolded Gelatin Hydrogels for Extended Culture of Engineered Cardiac Tissues. *Biomaterials* 2014, 35, 5462–5471, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.052.
- [75] van Delft, F.C.M.J.M.; van den Heuvel, F.C.; Loesberg, W.A.; te Riet, J.; Schön, P.; Figdor, C.G.; Speller, S.; van Loon, J.J.W.A.; Walboomers, X.F.; Jansen, J.A. Manufacturing Substrate Nano-Grooves for Studying Cell Alignment and Adhesion. *Microelectron Eng* 2008, 85, 1362–1366, doi:10.1016/j.mee.2008.01.028.
- [76] You, J.; Moon, H.; Lee, B.Y.; Jin, J.Y.; Chang, Z.E.; Kim, S.Y.; Park, J.; Hwang, Y.-S.; Kim, J. Cardiomyocyte Sensor Responsive to Changes in Physical and Chemical Environments. *J Biomech* 2014, 47, 400–409, doi:10.1016/j.jbiomech.2013.11.013.

- [77] Oyunbaatar, N.E.; Lee, D.H.; Patil, S.J.; Kim, E.S.; Lee, D.W. Biomechanical Characterization of Cardiomyocyte Using PDMS Pillar with Microgrooves. *Sensors* (Switzerland) 2016, 16, doi:10.3390/s16081258.
- [78] Denisin, A.K.; Pruitt, B.L. Tuning the Range of Polyacrylamide Gel Stiffness for Mechanobiology Applications. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016, 8, 21893–21902, doi:10.1021/acsami.5b09344.
- [79] Chandurkar, M.K.; Han, S.J. Subcellular Force Quantification of Endothelial Cells Using Silicone Pillar Arrays. In; 2022; pp. 229–245.
- [80] Roca-Cusachs, P.; Conte, V.; Trepats, X. Quantifying Forces in Cell Biology. *Nat Cell Biol* 2017, 19, 742–751, doi:10.1038/ncb3564.
- [81] Ashkin, A. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Phys Rev Lett* 1970, 24, 156–159, doi:10.1103/PhysRevLett.24.156.
- [82] Ashkin, A.; Dziedzic, J.M.; Bjorkholm, J.E.; Chu, S. Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles. *Opt Lett* 1986, 11, 288, doi:10.1364/OL.11.000288.
- [83] Ashkin, A.; Dziedzic, J.M.; Yamane, T. Optical Trapping and Manipulation of Single Cells Using Infrared Laser Beams. *Nature* 1987, 330, 769–771.
- [84] Peterman, E.J.G.; Gittes, F.; Schmidt, C.F. Laser-Induced Heating in Optical Traps. *Biophys J* 2003, 84, 1308–1316, doi:10.1016/S0006-3495(03)74946-7.
- [85] Bustamante, C.J.; Chemla, Y.R.; Liu, S.; Wang, M.D. Optical Tweezers in Single-Molecule Biophysics. *Nature Reviews Methods Primers* 2021, 1, 25, doi:10.1038/s43586-021-00021-6.
- [86] Ribezzi-Crivellari, M.; Huguet, J.M.; Ritort, F. Counter-Propagating Dual-Trap Optical Tweezers Based on Linear Momentum Conservation. *Review of Scientific Instruments* 2013, 84, 043104, doi:10.1063/1.4799289.
- [87] Manneville, J.-B.; Leduc, C.; Sorre, B.; Drin, G. Studying In Vitro Membrane Curvature Recognition by Proteins and Its Role in Vesicular Trafficking. In; 2012; pp. 47–71.
- [88] Astumian, R.D. Equilibrium Theory for a Particle Pulled by a Moving Optical Trap. *J Chem Phys* 2007, 126, 111102, doi:10.1063/1.2711174.
- [89] Pesce, G.; Jones, P.H.; Maragò, O.M.; Volpe, G. Optical Tweezers: Theory and Practice. *The European Physical Journal Plus* 2020, 135, 949, doi:10.1140/epjp/s13360-020-00843-5.
- [90] Neuman, K.C.; Block, S.M. Optical Trapping. *Review of Scientific Instruments* 2004, 75, 2787–2809, doi:10.1063/1.1785844.
- [91] Berg-Sørensen, K.; Flyvbjerg, H. Power Spectrum Analysis for Optical Tweezers. *Review of Scientific Instruments* 2004, 75, 594–612, doi:10.1063/1.1645654.
- [92] Yang, Y.; Fu, Z.; Zhu, W.; Hu, H.; Wang, J. Application of Optical Tweezers in Cardiovascular Research: More than Just a Measuring Tool. *Front Bioeng Biotechnol* 2022, 10.
- [93] Schreier, H.; Orteu, J.-J.; Sutton, M.A. *Image Correlation for Shape, Motion and Deformation Measurements*; Springer US: Boston, MA, 2009; ISBN 978-0-387-78746-6.

- [94] Yaniv, Y.; Juhaszova, M.; Wang, S.; Fishbein, K.W.; Zorov, D.B.; Sollott, S.J. Analysis of Mitochondrial 3D-Deformation in Cardiomyocytes during Active Contraction Reveals Passive Structural Anisotropy of Orthogonal Short Axes. *PLoS One* 2011, 6, e21985, doi:10.1371/journal.pone.0021985.
- [95] Zhang, D.; Arola, D.D. Applications of Digital Image Correlation to Biological Tissues. *J Biomed Opt* 2004, 9, 691, doi:10.1117/1.1753270.
- [96] Steadman, B.W.; Moore, K.B.; Spitzer, K.W.; Bridge, J.H.B. A Video System for Measuring Motion in Contracting Heart Cells. *IEEE Trans Biomed Eng* 1988, 35, 264–272, doi:10.1109/10.1375.
- [97] Kijlstra, J.D.; Hu, D.; Mittal, N.; Kausel, E.; van der Meer, P.; Garakani, A.; Domian, I.J. Integrated Analysis of Contractile Kinetics, Force Generation, and Electrical Activity in Single Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell Reports* 2015, 5, 1226–1238, doi:10.1016/j.stemcr.2015.10.017.
- [98] Ribeiro, A.J.S.; Schwab, O.; Mandegar, M.A.; Ang, Y.-S.; Conklin, B.R.; Srivastava, D.; Pruitt, B.L. Multi-Imaging Method to Assay the Contractile Mechanical Output of Micropatterned Human iPSC-Derived Cardiac Myocytes. *Circ Res* 2017, 120, 1572–1583, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.310363.
- [99] Sala, L.; van Meer, B.J.; Tertoolen, L.G.J.; Bakkers, J.; Bellin, M.; Davis, R.P.; Denning, C.; Dieben, M.A.E.; Eschenhagen, T.; Giacomelli, E.; et al. MUSCLEMOTION. *Circ Res* 2018, 122, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312067.
- [100] Shradhanjali, A.; Riehl, B.D.; Duan, B.; Yang, R.; Lim, J.Y. Spatiotemporal Characterizations of Spontaneously Beating Cardiomyocytes with Adaptive Reference Digital Image Correlation. *Sci Rep* 2019, 9, 18382, doi:10.1038/s41598-019-54768-w.
- [101] Cheuk, M.L.; Lam Po Tang, E.J.; HajiRassouliha, A.; Han, J.-C.; Nielsen, P.M.F.; Taberner, A.J. A Method for Markerless Tracking of the Strain Distribution of Actively Contracting Cardiac Muscle Preparations. *Exp Mech* 2021, 61, 95–106, doi:10.1007/s11340-020-00646-w.
- [102] Estruch-Samper, D. Particle Image Velocimetry, R. J. Adrian and J. Westerweel, Cambridge University Press, The Edinburgh Building, Shaftesbury Road, Cambridge, CB2 2RU, UK. 2011. 558pp. £75. ISBN 978-0-521-44008-0. The Aeronautical Journal 2012, 116, 219–220, doi:10.1017/S0001924000006734.
- [103] Rajasingh, S.; Isai, D.G.; Samanta, S.; Zhou, Z.; Dawn, B.; Kinsey, W.H.; Czihak, A.; Rajasingh, J. Manipulation-Free Cultures of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes Offer a Novel Screening Method for Cardiotoxicity. *Acta Pharmacol Sin* 2018, 39, 1590–1603, doi:10.1038/aps.2017.183.
- [104] Taylor, Z.J.; Gurka, R.; Kopp, G.A.; Liberzon, A. Long-Duration Time-Resolved PIV to Study Unsteady Aerodynamics. *IEEE Trans Instrum Meas* 2010, 59, 3262–3269, doi:10.1109/TIM.2010.2047149.
- [105] Kamgoué, a.; Ohayon, J.; Usson, Y.; Riou, L.; Tracqui, P. Quantification of Cardiomyocyte Contraction Based on Image Correlation Analysis. *Cytometry Part A* 2009, 75, 298–308, doi:10.1002/cyto.a.20700.
- [106] Huebsch, N.; Loskill, P.; Mandegar, M.A.; Marks, N.C.; Sheehan, A.S.; Ma, Z.; Mathur, A.; Nguyen, T.N.; Yoo, J.C.; Judge, L.M.; et al. Automated Video-Based Analysis of Contractility and Calcium Flux in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-

- Derived Cardiomyocytes Cultured over Different Spatial Scales. *Tissue Eng Part C Methods* 2015, 21, 467–479, doi:10.1089/ten.tec.2014.0283.
- [107] Tang, E.J.L.P.; Laven, R.C.; HajiRassouliha, A.; Nielsen, P.M.F.; Taberner, A.J. Measurement of Displacement in Isolated Heart Muscle Cells Using Markerless Subpixel Image Registration. In *Proceedings of the 2019 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC)*; 2019; pp. 1–6.
- [108] Otsu, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 1979, 9, 62–66, doi:10.1109/TSMC.1979.4310076.
- [109] Peters, W.H.; Ranson, W.F. *Digital Imaging Techniques In Experimental Stress Analysis*. *Optical Engineering* 1982, 21, doi:10.1117/12.7972925.
- [110] Mummery, C.L.; Sala, L.; Van Meer, B.J.; Tertoolen, L.G.J.; Bakkers, J.; Bellin, M.; Davis, R.P.; Denning, C.; Dieben, M.A.E.; Eschenhagen, T.; et al. New Methods in Cardiovascular Biology MUSCLEMOTION A Versatile Open Software Tool to Quantify Cardiomyocyte and Cardiac Muscle Contraction In Vitro and In Vivo. 2017, doi:10.1161/CIRCRESAHA.
- [111] Bazan, C.; Barba, D.T.; Blomgren, P.; Paolini, P. Image Processing Techniques for Assessing Contractility in Isolated Adult Cardiac Myocytes. *Int J Biomed Imaging* 2009, 2009, 1–11, doi:10.1155/2009/352954.
- [112] Bazan, C.; Torres Barba, D.; Blomgren, P.; Paolini, P. Image Processing Techniques for Assessing Contractility in Isolated Neonatal Cardiac Myocytes. *Int J Biomed Imaging* 2011, 2011, 1–9, doi:10.1155/2011/729732.
- [113] Dou, W.; Malhi, M.; Zhao, Q.; Wang, L.; Huang, Z.; Law, J.; Liu, N.; Simmons, C.A.; Maynes, J.T.; Sun, Y. Microengineered Platforms for Characterizing the Contractile Function of in Vitro Cardiac Models. *Microsyst Nanoeng* 2022, 8, 26, doi:10.1038/s41378-021-00344-0.
- [114] Lou, L.; Rubfiaro, A.S.; He, J.; Agarwal, A. Effect of Electrical Stimulation on Spontaneously Beating Dynamics of Cardiac Tissues: An Analysis Using Digital Image Correlation. *Adv Mater Technol* 2021, 6, 2100669, doi:10.1002/admt.202100669.
- [115] Bootman, M.D.; Higazi, D.R.; Coombes, S.; Roderick, H.L. Calcium Signalling during Excitation-Contraction Coupling in Mammalian Atrial Myocytes. *J Cell Sci* 2006, 119, 3915–3925, doi:10.1242/jcs.03223.
- [116] Chen-Izu, Y.; McCulle, S.L.; Ward, C.W.; Soeller, C.; Allen, B.M.; Rabang, C.; Cannell, M.B.; Balke, C.W.; Izu, L.T. Three-Dimensional Distribution of Ryanodine Receptor Clusters in Cardiac Myocytes. *Biophys J* 2006, 91, 1–13, doi:10.1529/biophysj.105.077180.
- [117] Yano, M.; Ikeda, Y.; Matsuzaki, M. Mechanisms of Disease: Ryanodine Receptor Defects in Heart Failure and Fatal Arrhythmia. *Nat. Rev. Cardiol* 2006, 3, 43–52.
- [118] Mase, G.T.; Smelser, R.E.; Rossmann, J.S. *Continuum Mechanics for Engineers*; CRC Press, 2020; ISBN 9780429174391.
- [119] Ayneto, X.; Ferrer, M. *Mecánica Del Medio Continuo En La Ingeniería. Teoría y Problemas Resueltos*; Edicions UPC, 2014;
- [120] Rudnicki J. W. *Fundamentals of Continuum Mechanics*. ; Northwestern University. Willey , 2014;

- [121] Cantó-Navés, O.; Marimon, X.; Ferrer, M.; Cabratosa-Termes, J. Comparison between Experimental Digital Image Processing and Numerical Methods for Stress Analysis in Dental Implants with Different Restorative Materials. *J Mech Behav Biomed Mater* 2021, 113, 104092, doi:10.1016/j.jmbbm.2020.104092.
- [122] Amzulescu, M.S.; De Craene, M.; Langet, H.; Pasquet, A.; Vancraeynest, D.; Pouleur, A.C.; Vanoverschelde, J.L.; Gerber, B.L. Myocardial Strain Imaging: Review of General Principles, Validation, and Sources of Discrepancies. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2019, 20, 605–619, doi:10.1093/ehjci/jez041.
- [123] MIRSKY, I.; PARMLEY, W.W. Assessment of Passive Elastic Stiffness for Isolated Heart Muscle and the Intact Heart. *Circ Res* 1973, 33, 233–243, doi:10.1161/01.RES.33.2.233.
- [124] Tracqui, P.; Ohayon, J. An Integrated Formulation of Anisotropic Force–Calcium Relations Driving Spatio-Temporal Contractions of Cardiac Myocytes. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2009, 367, 4887–4905, doi:10.1098/rsta.2009.0149.
- [125] Pan, B. Digital Image Correlation for Surface Deformation Measurement: Historical Developments, Recent Advances and Future Goals. *Meas Sci Technol* 2018, 29, 082001, doi:10.1088/1361-6501/aac55b.
- [126] Blaber, J.; Adair, B.; Antoniou, A. Ncorr: Open-Source 2D Digital Image Correlation Matlab Software. *Exp Mech* 2015, 55, 1105–1122, doi:10.1007/s11340-015-0009-1.
- [127] Zhang, D.; Arola, D.D. Applications of Digital Image Correlation to Biological Tissues. *J Biomed Opt* 2004, 9, 691–699, doi:10.1117/1.1753270.
- [128] Helm, J.D.; Deanner J.R. Off-Axis Two-Dimensional Digital Image Correlation. In *Proceedings of the Proc. 2004 SEM X Int. Congress & Exposition on Experimental and Applied Mechanics*; 2004.
- [129] Meng, L.; Jin, G.; Yao, X. Errors Caused by Misalignment of the Optical Camera Axis and the Object Surface in the DSCM. 2006, 46, 1930-1932+1936.
- [130] Sutton, M.A.; Yan, J.H.; Tiwari, V.; Schreier, H.W.; Orteu, J.J. The Effect of Out-of-Plane Motion on 2D and 3D Digital Image Correlation Measurements. *Opt Lasers Eng* 2008, 46, 746–757, doi:10.1016/j.optlaseng.2008.05.005.
- [131] Pan, B.; Qian, K.; Xie, H.; Asundi, A. Two-Dimensional Digital Image Correlation for in-Plane Displacement and Strain Measurement: A Review. *Meas Sci Technol* 2009, 20, 062001, doi:10.1088/0957-0233/20/6/062001.
- [132] Pan, B. Full-Field Strain Measurement Using a Two-Dimensional Savitzky-Golay Digital Differentiator in Digital Image Correlation. *Optical Engineering* 2007, 46, 033601, doi:10.1117/1.2714926.
- [133] Giachetti, A. Matching Techniques to Compute Image Motion. *Image Vis Comput* 2000, 18, 247–260, doi:10.1016/S0262-8856(99)00018-9.
- [134] Tong, W. An Evaluation of Digital Image Correlation Criteria for Strain Mapping Applications. *Strain* 2005, 41, 167–175, doi:10.1111/j.1475-1305.2005.00227.x.
- [135] HajiRassouliha, A.; Taberner, A.J.; Nash, M.P.; Nielsen, P.M.F. Subpixel Phase-Based Image Registration Using Savitzky–Golay Differentiators in Gradient-

- Correlation. *Computer Vision and Image Understanding* 2018, 170, 28–39, doi:10.1016/j.cviu.2017.11.003.
- [136] Reu, P.L.; Blaysat, B.; Andó, E.; Bhattacharya, K.; Couture, C.; Couty, V.; Deb, D.; Fayad, S.S.; Iadicola, M.A.; Jaminion, S.; et al. DIC Challenge 2.0: Developing Images and Guidelines for Evaluating Accuracy and Resolution of 2D Analyses. *Exp Mech* 2022, 62, 639–654, doi:10.1007/s11340-021-00806-6.
- [137] Remesan, H.; Ramji, M. Adaptation of Open Source 2D DIC Software Ncorr for Solid Mechanics Applications.; June 2014.
- [138] Atkinson, D.; Becker, T. A 117 Line 2D Digital Image Correlation Code Written in MATLAB. *Remote Sens (Basel)* 2020, 12, 2906, doi:10.3390/rs12182906.
- [139] Liu, M.; McCue, I.; Demkowicz, M.J. Quantifying Surface Deformation around Micrometer-Scale Indents by Digital Image Correlation. *J Mater Res* 2021, 36, 2277–2290, doi:10.1557/s43578-020-00019-y.
- [140] Di Giuseppe, M.; Zingales, M.; Pasta, S.; Avril, S. In Vitro Measurement of Strain Localization Preceding Dissection of the Aortic Wall Subjected to Radial Tension. *Exp Mech* 2021, 61, 119–130, doi:10.1007/s11340-020-00641-1.
- [141] Lu, H.; Cary, P.D. Deformation Measurements by Digital Image Correlation: Implementation of a Second-Order Displacement Gradient. *Exp Mech* 2000, 40, 393–400, doi:10.1007/BF02326485.
- [142] Schreier, H.W.; Sutton, M.A. Systematic Errors in Digital Image Correlation Due to Undermatched Subset Shape Functions. *Exp Mech* 2002, 42, 303–310, doi:10.1007/BF02410987.
- [143] Pan, B.; Xie, H.; Wang, Z.; Qian, K.; Wang, Z. Study on Subset Size Selection in Digital Image Correlation for Speckle Patterns. *Opt Express* 2008, 16, 7037, doi:10.1364/OE.16.007037.
- [144] Schreier, H.W.; Braasch, J.R.; Sutton, M.A. Systematic Errors in Digital Image Correlation Caused by Intensity Interpolation. *Optical Engineering* 2000, 39, 2915, doi:10.1117/1.1314593.
- [145] He, H.; Zhou, R.; Zou, Y.; Huang, X.; Li, J. A Comprehensive Method for Accurate Strain Distribution Measurement of Cell Substrate Subjected to Large Deformation. *J Healthc Eng* 2018, 2018, 1–10, doi:10.1155/2018/8504273.
- [146] Radmacher, M. Measuring the Elastic Properties of Biological Samples with the AFM. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 1997, 16, 47–57, doi:10.1109/51.582176.
- [147] Emig, R.; Zgierski-Johnston, C.M.; Timmermann, V.; Taberner, A.J.; Nash, M.P.; Kohl, P.; Peyronnet, R. Passive Myocardial Mechanical Properties: Meaning, Measurement, Models. *Biophys Rev* 2021, 13, 587–610, doi:10.1007/s12551-021-00838-1.

Capítol 4.

Escala teixit.

Capítol 4. Escala teixit

4.1 Introducció

Aquest capítol es centra en el desenvolupament d'un mètode computacional per l'avaluació de l'activitat contràctil mecànica en teixit cardíac de ratolí. En primer lloc, es presenten mesures temporals per estudiar l'efecte de freqüència de l'estimulació elèctrica sobre la contracció auricular. En la majoria de les espècies un augment de la freqüència provoca un augment de la força de contracció (Layland and Kentish. 1999, Georgakopoulos and Kass. 2001). En la literatura la relació de la freqüència d'estimulació amb la força de contracció es coneix com a relació de força-freqüència positiva (*Force-Frequency Relationship*, FFR) (Bouchard and Bose. 1989, Frampton et al. 1991).

La relació de força-freqüència positiva sembla intuïtiva atès que en situacions de resposta a l'estrès agut, la manera més eficient d'augmentar la producció cardíaca és mitjançant un augment combinat de la freqüència i la força de contracció (Puglisi et al. 2013). La relació de força-freqüència positiva a nivell cel·lular, és causada per un augment net del calci del citosol, ja sigui per un augment de l'entrada de calci o per una disminució de la sortida de calci. Els augments de de l'entrada de calci s'atribueixen principalment a una major activació dels canals de calci tipus L. Mentre que la disminució de de la sortida de calci es deu als intervals diastòlics curts aconseguits durant les freqüències elevades de contracció, la qual cosa redueix el temps disponible perquè el calci sigui extret a través de l'intercanviador de NCX (Endoh. 2004). A més, les despolaritzacions d'alta freqüència de les membranes plasmàtiques dels miòcits provoquen un augment de l'entrada de sodi a través de l'intercanviador de NCX. Com que els intercanviadors de NCX són reversibles en funció de les concentracions citoplasmàtiques de sodi o calci, una entrada neta positiva de sodi fa que la majoria dels NCX siguin permeables a la sortida de sodi i a l'entrada de calci (Antoons et al. 2002).

D'altra banda, una sèrie d'experiments han demostrat que teixits cardíacs de ratolins responen a una relació força-freqüència negativa (Endoh. 2004). Janssen i Periasamy argumenten que aquesta relació s'observa a causa de que les condicions experimentals no són fisiològiques, ja que no són experiments realitzats in vivo (Janssen and Periasamy 2007). Tanmateix, altres investigadors argumenten que la FFR negativa pot ser fisiològica (Endoh 2004, Cens et al. 2006). Aquesta relació s'atribueix principalment a la cinètica del calci en reticle

sarcoplasmàtic (SR) modulada pel transportador SERCA. És a dir, si la velocitat d'estimulació és elevada no hi ha prou temps entre contraccions per a la restauració dels nivells de calci en reticle sarcoplasmàtic (SR) abans del següent batec. Layland i Kentish van comprovar que fins i tot la sobreexpressió dels canals SERCA no produïa cap augment en la força de contracció a freqüències més altes ([Layland and Kentish. 1999](#)). Això vol dir que el reticle sarcoplasmàtic (SR) té una capacitat màxima de retenció de calci. De fet, el contingut de calci en el reticle sarcoplasmàtic (SR) de rates i ratolins és relativament alt a freqüències baixes, el que pot significar que l'entrada de calci al reticle sarcoplasmàtic (SR) arriba al màxim a freqüències baixes ([Endoh. 2004](#)). L'augment de la freqüència d'estimulació també redueix el temps disponible perquè el calci citoplasmàtic activi la maquinària contràctil de la cèl·lula, fet que pot donar lloc a una FFR negativa ([Layland and Kentish. 1999](#)).

En qualsevol cas, pot ser que no sigui cert que la FFR només sigui positiva o negativa. De fet, altres investigadors obren la possibilitat de l'existència d'una FFR dual, Koch-Weser i Blink van argumentar que es podria esperar que una FFR positiu predominés a freqüències baixes de contracció, on les condicions són favorables per a la producció de força, i una FFR negatiu que predominés a freqüències altes de contracció, on les condicions són desfavorables per a la producció de força ([Koch-Weser and Blinks. 1961](#)). En els experiments realitzats per Layland i Kentish en ventricles de rates es va observar aquesta relació dual ([Layland and Kentish. 1999](#)).

Finalment es presenta un mètode computacional per la classificació i detecció d'anomalies en el teixit cardíac.

4.2 Obtenció de les mostres de teixit cardíac auricular

Per l'experimentació s'han utilitzat mostres obtingudes de les aurícules dreta i esquerra de ratolins OF1 (Oncins France 1) de entre 15 i 18 setmanes d'edat, criats a l'estabulari de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Aquests ratolins són ideals per a models animals de fisiologia, toxicologia i farmacologia.

El protocol ha estat aprovat pel comitè ètic de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) i compleix la Declaració de Helsinki de principis ètics de l'Associació Medica Mundial (*The World Medical Association*, WMA).

4.2.1 Mètode de preparació del ratolí

Es selecciona un ratolí OF1 que tingui una edat compresa entre 15 i 18 setmanes i un pes entre 20 i 40 g. To seguit s'anestesia el ratolí amb injeccions intra-peritoneals de les preparacions d'anestèsia indicades a la [Taula 4.1](#).

Injecció	Composició	via
Primera	0,03 ml heparina sòdica 5% 0,3 ml clorur de sodi 0,9%	intra-peritoneal
Segona	1 mg/kg medetomidina 75 mg/kg ketamina	intra-peritoneal

Taula 4.1. Composició de les preparacions d'anestèsia.

Després de les injeccions al ratolí, es valida el correcte efecte de l'anestèsia per validació dels reflexos palpebrals i d'abstinència. Tot seguit, es sacrifica l'animal per luxació atlanto-occipital.

4.2.2 Mètode d'aïllament de les aurícules

Els ratolins es col·loquen en posició de decúbit esternal i es fan dues incisions al tòrax per tal de deixar exposats el cor i els pulmons. Després, s'extreu el cor de la cavitat toràcica i es col·loca en una placa de Petri recoberta de Sylgard ([Dow Inc, Michigan, Estats Units](#)) que conté una solució de Krebs carbogenada (veure [Taula 4.2](#)).

Tot seguit, amb un microscopi s'identifiquen les aurícules dreta i esquerra i es van separant amb compte de la resta de teixit cardíac. Finalment les aurícules aïllades, abans d'introduir-les al bany d'òrgans automàtic es lliguen al transductor de força de forma individual amb unes sutures de seda 3/0.

Solució	Composició de la solució	Bombolles	pH	Temperatura
Krebs carbogenada	115,48 mM NaCl			
	4,61 mM KCl			
	1,16 mM MgSO ₄	5% CO ₂		
	21,90 mM NaHCO ₃	95% O ₂	7,4	37,5 °C
	1,14 mM NaH ₂ PO ₄			
	2,50 mM CaCl ₂			
	10.10 mM glucosa			

Taula 4.2. Composició de la solució de Krebs carbogenada.

4.2.3 Mètode d'electrofisiologia

L'activitat mecànica de les aurícules del cor de ratolí OF1 s'estudia mitjançant un bany d'òrgans automàtic LSI Letica ([Letica Scientific Instruments, Barcelona, Espanya](#)) (Veure Fig. 4.1). Aquest sistema de bany d'òrgans automàtic disposa quatre cambres independents de 20 ml plenes de solució de Krebs carbogenada (5% de CO₂ i 95% O₂) (Veure Fig. 4.2).

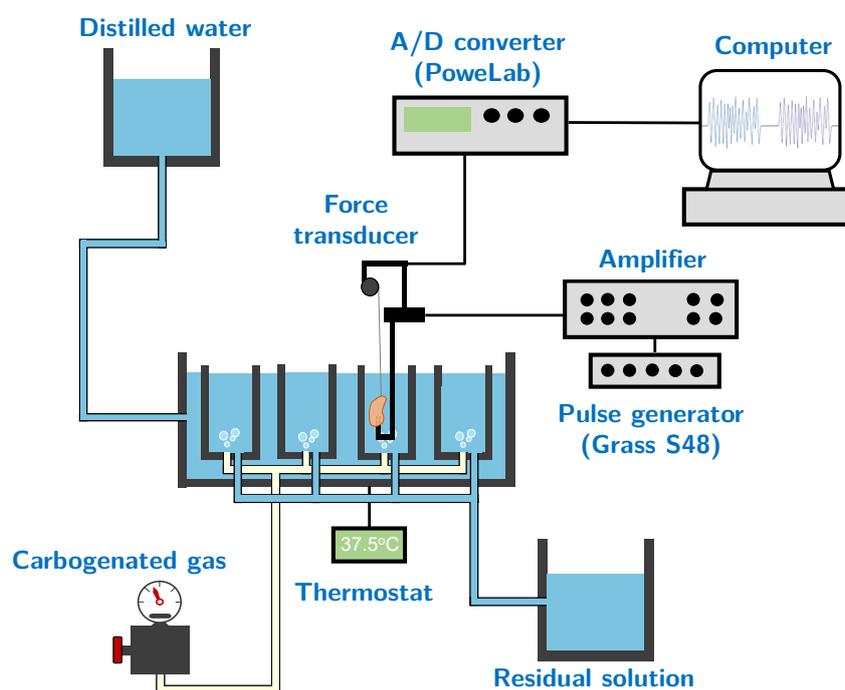


Fig. 4.1. Muntatge experimental pel registre de la contracció mecànica.

Per a la regulació de la temperatura, s'utilitza el termòstat Letica 13206 ([Letica Scientific Instruments, Barcelona, Espanya](#)), per mantenir una temperatura constant de 37,5 °C. Cada aurícula, esquerra o dreta, es col·loca individualment dins d'una cambra i es lliga amb una sutura al transductor de força isomètrica.

El transductor de força s'ajusta a una massa de 0,2 g i es deixa que s'estabilitzi durant 15 min abans de començar l'experiment.



Fig. 4.2. Bany automàtic d'òrgans LSI Letica.

Per registrar les dades s'utilitza un conversor analògic digital (ADC) model PowerLab 800 (AD Instruments, Dunedin, Nova Zelanda) amb una freqüència de mostreig de $F_s=1000$ Hz. Per realitzar l'estimulació s'utilitza un estimulador analògic Grass S48 (Astro-Med. Inc, Rhode Island, Estats Units).

4.2.4 Protocol d'estimulació

A continuació es descriuen els protocols d'estimulació elèctrica i farmacològica utilitzats en l'experimentació.

4.2.4.1 Protocol d'estimulació elèctrica

Les aurícules cardíques s'estimulen amb un pols de corrent de 40 mA durant 0,4 ms, amb diferents freqüències d'estimulació de 1 Hz, 2 Hz, 3 Hz, 5 Hz i 10 Hz durant 3 min cadascun. Només s'estimulen les mostres d'aurícula esquerra, en canvi l'aurícula dreta es manté sense estimular, atès que aquesta disposa d'un marcapàs fisiològic natural. La freqüència d'estimulació elèctrica va relacionada amb la freqüència en què es contraurà el teixit cardíac.

4.2.4.2 Protocol d'estimulació farmacològica

Es realitza una estimulació dels receptors muscarínics amb diferents concentracions ascendents de carbacol ($C_6H_{15}N_2O_2$) a $10^{-9} M$, $10^{-8} M$, $10^{-7} M$, $10^{-6} M$, $10^{-5} M$, $10^{-4} M$ i finalment $10^{-4} M$ d'atropina. Les concentracions s'administren durant 3 *min* a l'aurícula esquerra estimulada i l'aurícula dreta no estimulada. Així, l'aurícula esquerra s'estimula 5 *Hz* (300 BPM), de la mateixa forma que el protocol d'estimulació elèctrica, l'aurícula dreta es manté sense estimular, atès que aquesta disposa d'un marcapàs fisiològic natural.

4.3 Mètode computacional per l'anàlisi de la contracció mecànica.

4.3.1 Descripció del sistema computacional

Per l'extracció correcta dels paràmetres s'ha de fer un processat previ del senyal de contracció. En el gràfic de la figura Fig. 4.3 es representen les diferents etapes de processat d'un registre experimental de contracció mecànica del teixit cardíac.

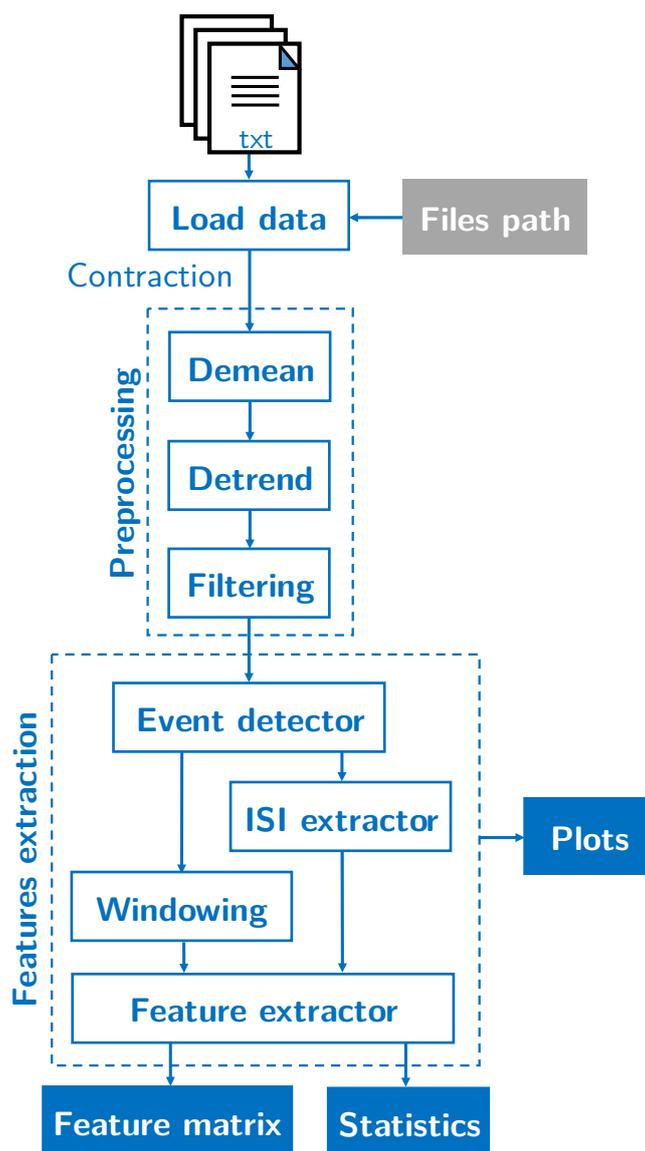


Fig. 4.3. Diagrama de blocs del sistema computacional de caracterització de senyals experimentals de contracció mecànica del teixit cardíac.

Els passos que s'han implementat en el sistema computacional es descriuen a continuació:

Càrrega del senyal (*Signal loading*).

Es carrega un fitxer *.txt* on hi ha emmagatzemat el senyal del transductor de força, el període de mostreig (*sampling period*, T_s), la data d'adquisició, el número del canal i les unitats. El senyal analògic ha estat adquirit amb un convertidor analògic digital (ADC) model PowerLab 800 ([AD Instruments, Dunedin, Nova Zelanda](#)), amb un període de mostreig $T_s=0.001$ [s].

Compensació del valor mitjà (*Demean*).

Es resta el valor mitjà (*demean*) del senyal de contracció de la manera següent:

$$\hat{x} = x - \text{mean}(x) \quad (4.1)$$

On

x és el senyal de contracció.

\hat{x} és el senyal de contracció amb valor mitjà igual a zero.

Filtrat del soroll (*Filtering*).

El filtrat del soroll es realitza amb una transformada Wavelet discreta de superposició màxima (*Maximal Overlap Discrete Wavelet Transform, MODWT*). L'algorisme estàndard per al MODWT implementa la convolució circular directament en el domini del temps. Aquesta implementació del MODWT realitza la convolució circular en el domini de Fourier ([Mesa. 2005](#)). En el nostre cas s'ha utilitzat la família de wavelets *coif* amb l'onadeta (*wavelet coif4* amb 4 moments de desaparició (vanishing moments) i amb manipulació periòdica de límits (*boundary handling*). El nivell de descomposició, N , s'ha definit a partir de l'expressió següent ([Percival et al. 1997](#), [Percival et al. 2000](#)):

$$N = \text{floor}\left(\log_2\left(\text{length}(\hat{x})\right)\right) \quad (4.2)$$

On

\hat{x} és el senyal de contracció amb mitja igual a zero.

A partir de la descomposició es reconstrueix el senyal amb l'onadeta (*wavelet*) pels N nivells utilitzant una anàlisi de multiresolució (*multiresolution analysis, MRA*). Després es suma al llarg dels senyals multiresolució, *MRA*, i es descarten els nivells $N=1$ i $N=2$, així s'obté el senyal filtrat, x_{filt} .

Eliminació tendència (*Detrend*).

Es compensa la tendència de la línia de base (*detrend*) amb un ajust lineal. Primer s'obté el polinomi lineal de grau n que millor s'ajusta al senyal, p_{fit} , i després es substraïu aquest polinomi al senyal original.

$$\tilde{x} = x_{filt} - p_{fit} \quad (4.3)$$

On

\tilde{x} és senyal amb la correcció de la tendència polinòmica.

x_{filt} és senyal filtrat.

p_{fit} és el polinomi d'ajust de grau n .

Detector d'esdeveniments (*Event detector*).

Els esdeveniments de contracció es detecten mitjançant un mètode de llinar estadístic basat en el rang d'interquartil (*interquartile range, IQR*). Quan el senyal de contracció supera el llinar, Thr , es defineix aquest punt com a un esdeveniment de contracció significatiu. El llinar es defineix com:

$$Thr = k \cdot IQR(x) \quad (4.4)$$

On

Thr és el llinar.

k és el factor de llinar.

Per defecte el factor de llinar pren un valor igual a $k=1.5$. Tot i així en la interfície d'usuari es pot ajustar el valor d'aquest factor de manera semisupervisada mitjançant una barra lliscant (*slider*).

Interval entre esdeveniments (*ISI*)

Es defineix l'interval entre esdeveniments com un vector on s'emmagatzemen els intervals de temps transcorregut entre dos esdeveniments successius o spikes (*Inter Spike Interval, ISI*). S'ha definit el període de *ISI*, T_{ISI} , com la mediana (*median*) de tots els valors de l' *ISI*.

Enfinestrament (*Windowing*).

Un cop detectat els esdeveniments de contracció es procedeix a l'enfinestrament (*windowing*) del senyal de contracció mecànica. La finestra queda centrada en la posició on s'ha detectat l'esdeveniment. La finestra és la composició de dues finestres: la finestra esquerra, W_L , i la finestra dreta, W_R , tal com segueix:

$$W = W_L + W_R \quad (4.5)$$

On

W és la finestra global.

W_L és la finestra esquerra.

W_R és la finestra dreta.

S'ha definit l'amplada de les finestres esquerra, W_L , i dreta, W_R , en funció del període d' ISI , T_{ISI} , de la següent manera:

$$\begin{aligned} W_L &= 30\% \cdot T_{ISI} \\ W_R &= 70\% \cdot T_{ISI} \end{aligned} \quad (4.6)$$

Aquestes proporcions desiguals entre ambdues finestres, són degudes al fet que la dinàmica de pujada d'un esdeveniment de contracció és molt més ràpida que la dinàmica de baixada.

Extracció de característiques (*Feature extractor*).

Per tal de caracteritzar la morfologia i la dinàmica del senyal de contracció mecànica es proposen una sèrie de paràmetres descrits a la [Taula 4.3](#). Totes les mesures es realitzen dins d'un esdeveniment de contracció en finestrat.

Paràmetre	Descripció	Unitats
Amplitud	Amplitud del senyal del senyal de contracció.	g
ttp	<i>Time to peak</i> . Temps fins al pic màxim de l'esdeveniment de contracció.	ms
Tau	<i>Fall time constant</i> . Constant de temps de baixada de l'esdeveniment de contracció.	ms
SR	<i>Slew rate or Slope rate</i> . Pendent de pujada de l'esdeveniment de contracció.	g/ms
Trise	<i>Rise period</i> . Temps transcorregut fins al pic màxim de l'esdeveniment de contracció.	ms
FWDM	Full Width at Distance-Maximum. Amplada del esdeveniment de contracció a diferents nivells del pic màxim de contracció: 10%, 25%, 50%, 90%.	ms
ISI	<i>Inter-spike Interval</i> . Interval temporal mitjà transcorregut entre spikes o esdeveniments consecutius.	ms
BPM	<i>Beats per minute</i> . Batecs o esdeveniments de contracció per minut.	bpm
STD	Desviació estàndard de l'ISI.	

Taula. 4.3. Paràmetres per la caracterització d'un esdeveniment de contracció.

Estadística

El programa disposa d'un mòdul dedicat a calcular l'estadística comparativa de tots els paràmetres entre les condicions d'uniforme i alternant. (veure apartat 4.3.1.1)

Gràfics

El mòdul gràfic s'encarrega de generar tots els gràfics del programa i d'emmagatzemar-los en imatges d'alta qualitat en format .png. Aquesta sortida gràfica del programa inclou la representació del senyal de contracció original i preprocessat, així com també els resultats estadístics.

Exportació de dades

Adicionalment, tots els senyals carregats i les característiques calculades s'emmagatzemen en un fitxer amb extensió .csv (*comma separated values*). Els fitxers tipus .csv es poden obrir perfectament amb programari específic per la lectura de llibres de text: Excel, LibreOffice Calc, Google Sheets, OpenOffice Calc.

4.3.1.1 Validació del mètode de detecció de característiques

Els resultats que presenten a continuació han estat sotmesos a una validació estadística. Els valors usats per a l'anàlisi estadística estan expressats amb la mitjana i l'error estàndard de la mitjana (Standard Error of the Mean, SEM) de la manera següent; $\text{mean} \pm \text{SEM}$. La notació emprada per la significància estadística és la següent: $p > 0,05$ (ns), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) i $p \leq 0,0001$ (****). Es consideren estadísticament significatius els p -valors que compleixen: $p \leq 0,05$ (*). S'ha utilitzat el test estadístic ANOVA bidireccional (*two-way ANOVA*).

La validació del mètode de detecció de la morfologia dels senyals de contracció s'ha dut a terme sota el protocol d'estimulació elèctrica (Veure apartat 2.4.1). S'ha comparat la resposta contràctil de teixit cardíac de l'aurícula esquerra amb una estimulació de freqüències de 1 Hz, 2 Hz, 3 Hz, 5 Hz i 10 Hz i s'ha mantingut l'aurícula dreta sense estimular, atès que aquesta aurícula és controlada per les cèl·lules marcapassos (veure Fig. 4.4). En els experiments que es presenten a continuació s'ha utilitzat $N = 6$ mostres de teixit cardíac de l'aurícula esquerra i $N = 6$ mostres de teixit cardíac de l'aurícula dreta de ratolins OF1.

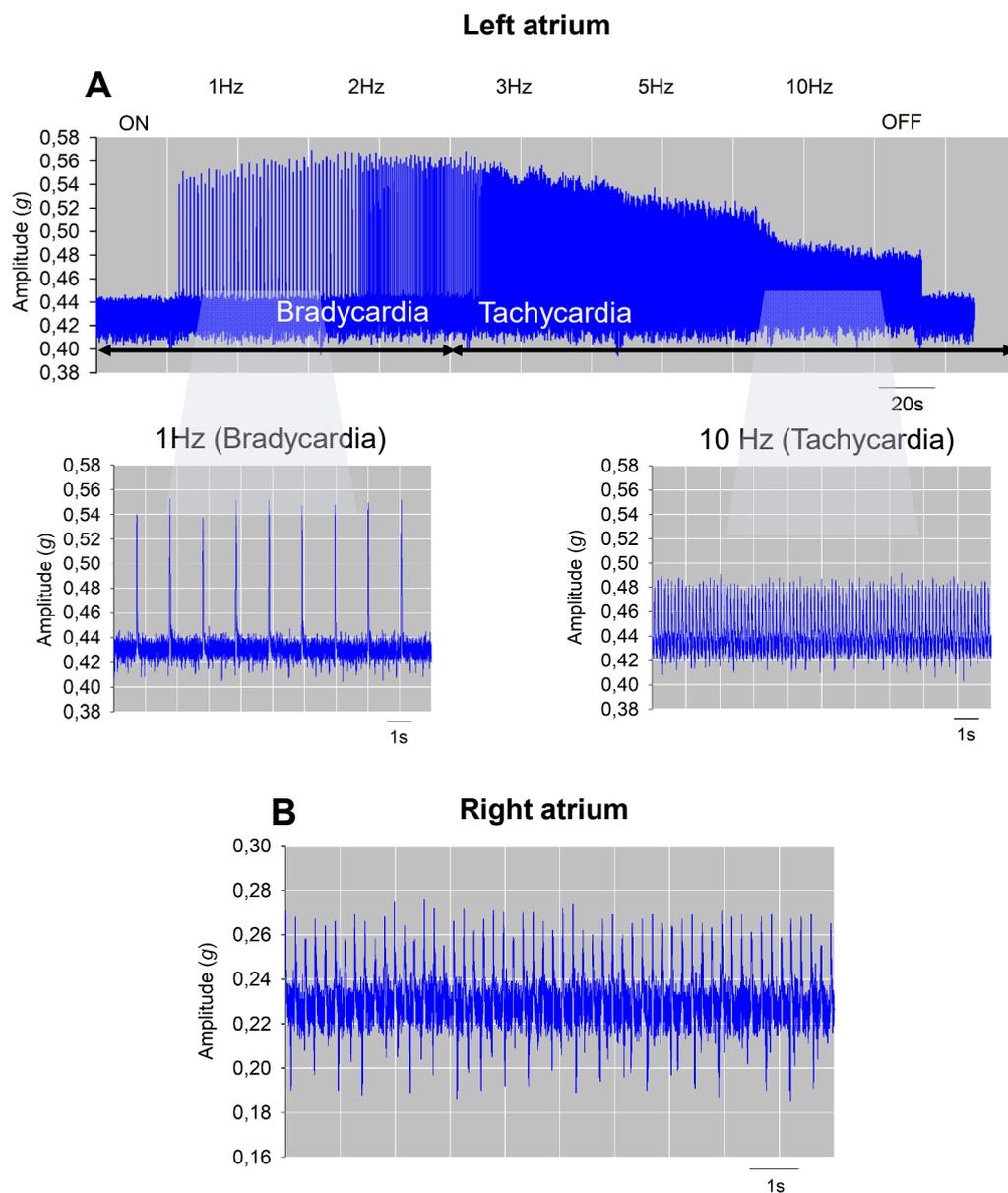


Fig. 4.4. **A.** Resposta contràctil del teixit cardíac de l'aurícula esquerra per diferents freqüències d'estimulació. **B.** Resposta contràctil natural del teixit cardíac de l'aurícula dreta sense cap tipus d'estimulació.

La Fig. 4.5 mostra la variabilitat entre l'aurícula esquerra dels ratolins per a diferents paràmetres de la morfologia del senyal contràctil. Cada punt en gràfic representa una contracció.

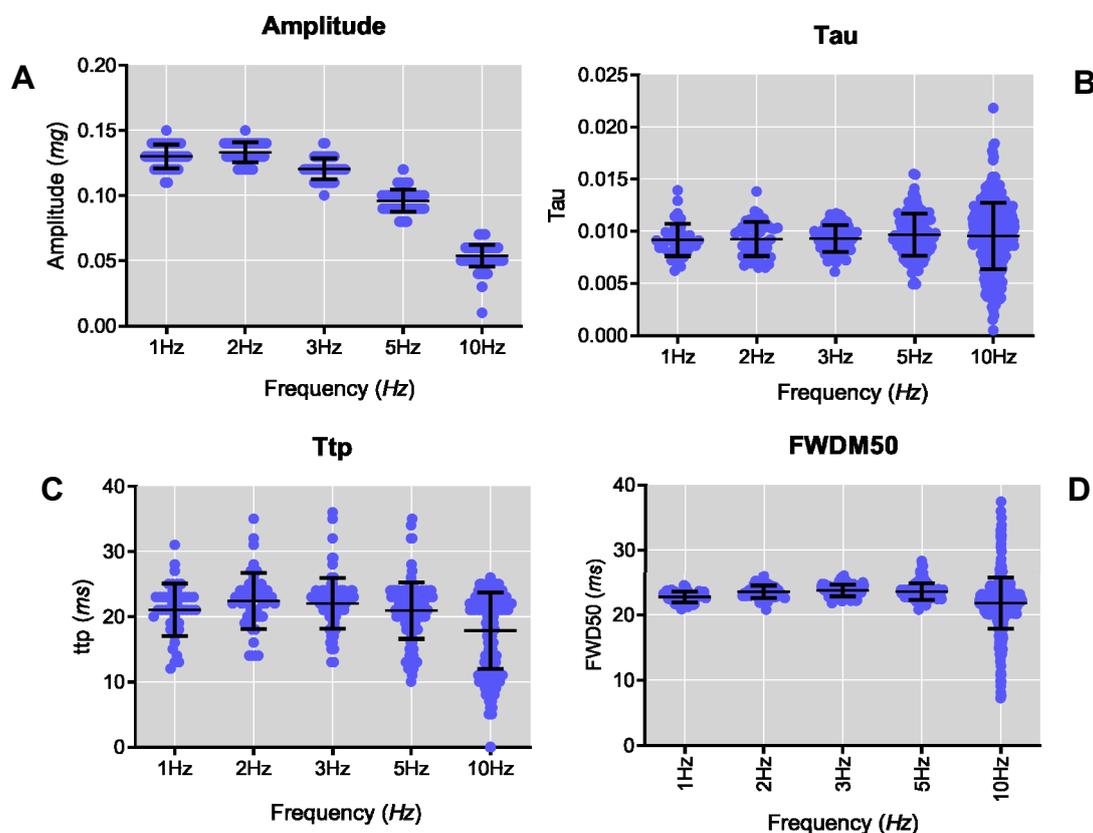


Fig. 4.5. Mesures a l'aurícula esquerra dels ratolins. **A.** Distribució de l'amplitud del senyal de contracció per a diferents freqüències d'estimulació. **B.** Distribució de la constant tau (τ) per a diferents freqüències d'estimulació. **C.** Distribució del temps fins al pic, *time to peak* (*ttp*), per a diferents freqüències d'estimulació. **D.** Distribució de la durada del senyal a la posició corresponent al 50% de valor de l'amplitud màxima, *full width half maximum* (*FWHM*), per a diferents freqüències d'estimulació.

En la Fig. 4.6 es mostra els batecs per minut, *Beats Per Minute* (BPM) i l'interval inter-contràctil, *Inter Contractil Interval* (ICI), per a diferents freqüències d'estimulació en el teixit cardíac de l'aurícula esquerra, com s'ha definit en el protocol d'estimulació elèctrica, l'aurícula dreta es manté sense estimular i s'utilitza com a control. Aquestes dades representen la qualitat de la detecció de cada contracció. Es pot observar com l'ICI correlaciona de forma inversament proporcional amb els BPM. Les contraccions espontànies en el teixit auricular esquerra es produeixen a uns 360 bpm que correspon a un ICI de 170 ms, que és equivalent a 6 Hz. S'observa diferència estadística entre els ICI i els BPM obtinguts per a cada freqüència d'estimulació.

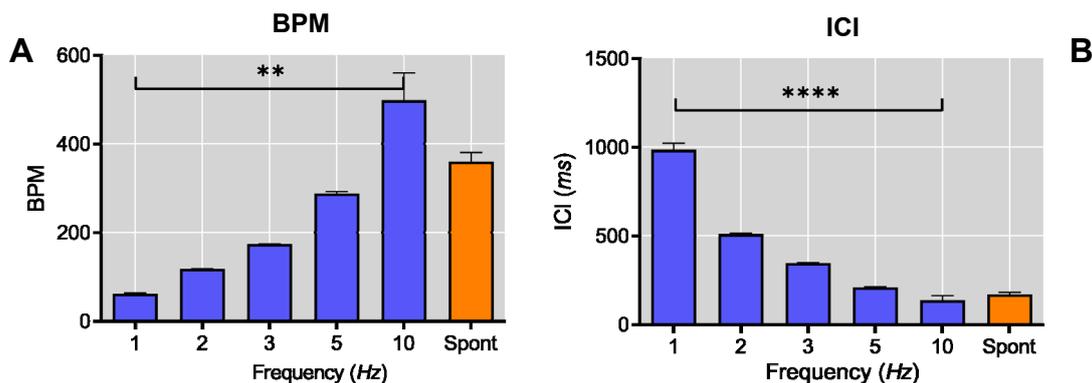


Fig. 4.6. A. Batecs per minut (BPM) per a diferents freqüències d'estimulació. B. Interval inter contràtil (ICI) per a diferents freqüències d'estimulació.

En la Fig. 4.7 es mostra l'amplitud associada a la força de la contracció. S'observa com l'amplitud de la contracció depèn de la freqüència, així que va augmentant amb les freqüències baixes d'estimulació i va decreixent amb les altes freqüències. Podem observar com l'amplitud de la contracció en el teixit cardíac de l'aurícula dreta, és similar a l'amplitud de contracció observada en el teixit cardíac de l'aurícula esquerra per a una freqüència d'estimulació de 5 Hz.

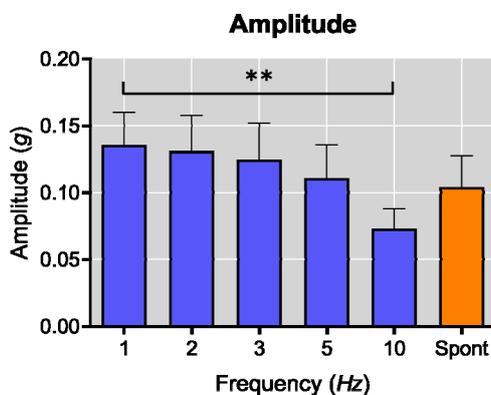


Figura. 4.7. Amplitud associada a la força de contracció per a diferents freqüències d'estimulació.

En la Fig. 4.8 es representen l'interval de temps fins el pic (*time-to-peak*, *ttp*), el temps de pujada (*Trise*) i la constant de temps (*tau*). Aquests paràmetres cinètics descriuen el temps necessari per arribar a la contracció i al patró de relaxació. Podem observar com el temps de pic (*time-to-peak*) disminueix a mesura que augmenta la freqüència, és a dir la freqüència de les contraccions del teixit cardíac (Fig. 4.8 A). En canvi el temps de pujada no canvia (Fig. 4.8 B). La constant temps (Tau) és constant per les diferents freqüències d'estimulació

(Fig. 4.8 C). També notar cal notar que el valor del temps fins el pic (*time-to-peak*, *ttp*) obtingut en el teixit auricular sense estimular (aurícula dreta), és a dir amb contraccions espontànies, és similar al valor obtingut en el teixit auricular estimulat (aurícula esquerra) per a una freqüència d'estimulació de 5 Hz.

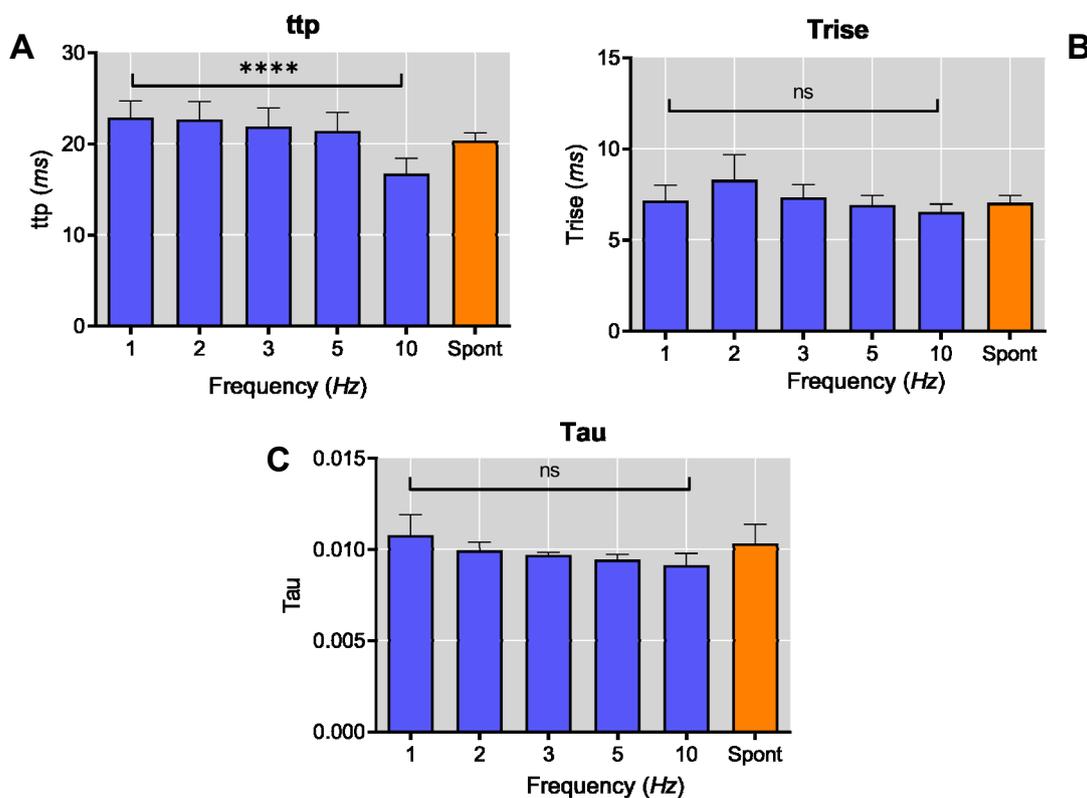


Fig. 4.8. **A.** Interval de temps fins el pic (*ttp*) per a diferents freqüències d'estimulació. **B.** Temps de pujada (*Trise*) per a diferents freqüències d'estimulació. **C.** Constant de temps (*Tau*) per a diferents freqüències d'estimulació.

La Fig. 4.9 representa les durades de cada contracció per a diferents nivells respecte al valor màxim de l'amplitud i agrupades per a diferents freqüències d'estimulació. Els nivells on s'estima la durada de la contracció són el 10 %, 25 %, 50 %, 75 % i 90% del valor màxim de l'amplitud. S'observa, com és lògic, que la durada és més alta a la base del senyal de contracció en comparació amb la part superior. També observem com la durada és una mica més gran a les freqüències baixes d'estimulació. En el teixit cardíac de l'aurícula dreta, que no es troba estimulat, té uns valors de durada als diferents nivells que s'assemblen al cas del teixit cardíac de l'aurícula esquerra estimulat a un freqüència de 5 Hz.

La literatura descriu que els augments de la velocitat de contracció produeixen un augment de la velocitat de relaxació (*Tau*). Això permet adquirir nivells normals de calci diastòlic abans de les contraccions posteriors (Puglisi et al.

2013). Els valors de Tau en aquest experiment, però, no es van reduir significativament (Fig. 4.8.C).

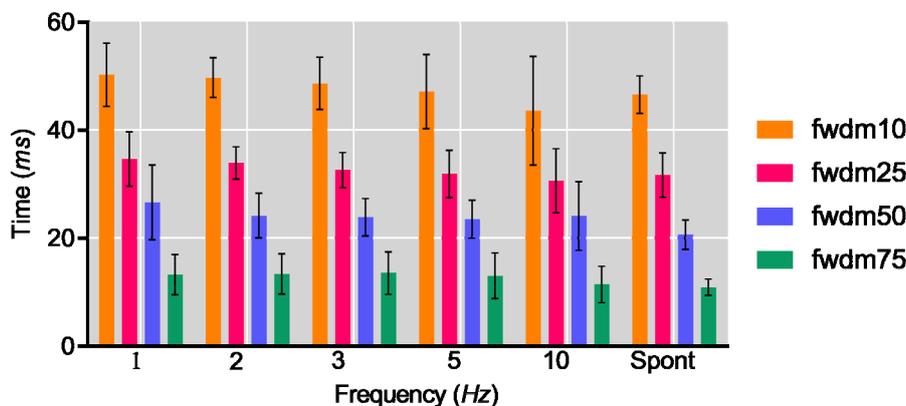


Figura. 4.9. Durada del senyal de contracció per als quatre nivells de mesura del paràmetre de duració i agrupats segons les diferents freqüències d'estimulació.

4.3.1.2 Aplicació del mètode computacional de caracterització

En els successius apartats es presenten dues aplicacions del mètode de software per a caracteritzar paràmetres morfològics del senyal de contracció del teixit cardíac de ratolí tipus OF1. En la primera aplicació es vol observar l'efecte farmacològic de l'activació del receptor muscarínic, i en la segona aplicació, es vol observar l'efecte patològic d'un episodi controlat d'hipòxia.

4.3.1.2.1 Efecte farmacològic: activació del receptor muscarínic

S'estudia els efectes dels fàrmacs carbacol (CCH) i l'atropina (Atr) sobre el teixit cardíac de l'aurícula dreta sense estimular i l'efecte dels fàrmacs sobre el teixit cardíac de l'aurícula esquerra amb una estimulació constant de 6 Hz. En els experiments farmacològics que es presenten a continuació s'ha utilitzat $N=6$ mostres de teixit cardíac de l'aurícula esquerra i $N=6$ mostres de teixit cardíac de l'aurícula dreta de ratolins OF1.

L'efecte dels neurotransmissors parasimpàtics sobre la contracció cardíaca s'ha estudiat i caracteritzat àmpliament (Lanzafame et al. 2003, Harvey. 2012). L'acetilcolina (Ach), com el carbacol (CCH) té un efecte inhibitori dependent de la concentració (*concentration-dependent*) sobre la força de contracció dels teixits auriculars i ventriculars (Zang et al. 2004).

En el mecanisme d'estimulació del sistema parasimpàtic a través del nervi vagal intervenen els canals de potassi activats per un lligand muscarínic. Els efectes

intracel·lulars de l'acetilcolina estan mediatos per 5 receptors muscarínics diferents. Els receptors M2 i M4, són els més rellevants per a la regulació de l'electrofisiologia cardíaca (Dhein et al. 2001). Per defecte, l'acetilcolina (ACh) provinent del nervi vagal (Tresguerres. 2005) s'uneix al receptor muscarínic al canal de potassi i activa els receptors M2 i M4 que es troben acoblats a una proteïna *G*, activa la cadena de fosforilacions que resulta en l'obertura del canal de potassi i comencen a sortir els ions potassi a fora de la cèl·lula cardíaca, llavors, la cèl·lula s'hiperpolaritza degut a la sortida dels ions de potassi, K^+ (Dhein et al. 2001). La sortida de ions potassi comporta la disminució de la freqüència cardíaca o braquicàrdia. Aquest canal de potassi forma part de la família de receptors acoblats a proteïna *G* i activats per lligands (*G protein-coupled receptors*, *GPCR*), en concret, s'anomena canal de potassi rectificador d'entrada acoblat a la proteïna *G* (*G protein-coupled Inwardly-Rectifying K*, *GIRK*).

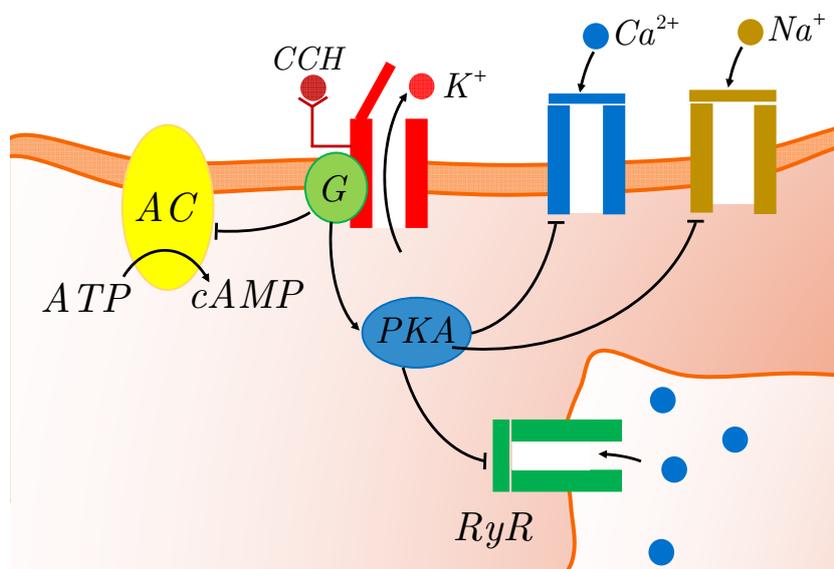


Fig. 4.10. Esquema de l'activació de receptor muscarínic.

A més en l'activació de la proteïna *G*, inhibeix la producció d'adenilil ciclasa (AC) encarregada de catalitzar la conversió de l'adenosina trifosfat (ATP) d'AMP cíclic (cAMP). Quan s'activa la generació de cAMP, llavors, s'activa també la proteïna Kinasa A (PKA), que en última instància activa l'obertura dels canals de calci tipus L, *L-type* Ca^{2+} , i els receptors de rianodina RyRss (Zaccolo. 2009) i l'obertura dels canals de sodi, Na^+ (Di Francesco and Tromba. 1988). (Veure figura 4.10). Per tant, amb la reducció d'AMP cíclic (cAMP), es bloqueja la cadena de fosforilacions, i no s'obriran els canals de calci ni els receptors de rianodina (RyRss) tot reduint-se el calci intracel·lular notablement (Harvey i Belevych 2003).

Les cèl·lules marcapassos i les no marcapassos es veuen afectades a través de diferents mecanismes pel carbacol (CCH). Les aurícules dretes aïllades contenen cèl·lules marcapassos com cèl·lules no marcapassos i, per tant, els resultats observats en el teixit aïllat reflectiran l'efecte del carbacol (CCH) en ambdós tipus de cèl·lules. El teixit auricular esquerra però, no conté cèl·lules marcapassos. Així en el teixit auricular dret (amb cèl·lules amb marcapassos), el carbacol (CCH) redueix la velocitat i la força de la contracció auricular mitjançant: a) Tancament de: canals de sodi, Na^+ (Di Francesco and Tromba. 1988), b) Obertura dels canals de potassi, K^+ (Dhein et al. 2001). I en el teixit esquerra (sense cèl·lules marcapassos), el carbacol (CCH) redueix la velocitat i la força de la contracció auricular mitjançant: a) Tancament de: canals calci, Ca^{2+} i el receptors de rianodina (RyRs) (Zaccolo. 2009, Di Francesco and Tromba. 1988), b) Obertura dels canals de potassi, K^+ (Dhein et al. 2001, McMorn et al. 1993). En la següent figura (Fig. 4.11) es mostra l'activitat contràctil del teixit de l'aurícula esquerra estimulada i dreta sense estimular sota l'efecte farmacològic del carbacol (CCH) i l'atropina (Atr).

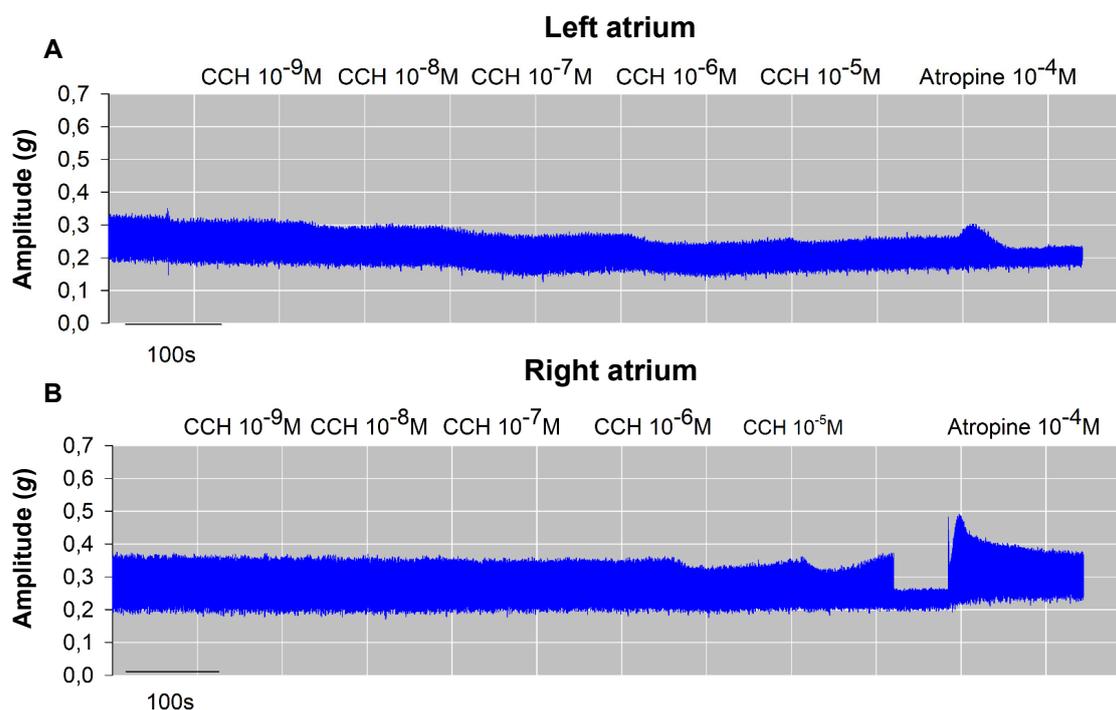


Fig. 4.11. A. Efecte farmacològic del carbacol (CCH) i l'atropina (Atr) sobre el teixit cardíac de l'aurícula esquerra amb freqüència d'estimulació constant de 6 Hz.

B. Efecte farmacològic del carbacol (CCH) i l'atropina (Atr) sobre el teixit cardíac de l'aurícula dreta amb activat espontània.

Alternativament per estudiar l'efecte farmacològic del receptor muscarínic, s'utilitza el fàrmac de carbacol (CCH) que actua com a agonista del receptor

muscarínic. En essència, el carbacol té el mateix efecte que l'acetilcolina (ACh), però és més selectiu, atès que no disposa de la capacitat d'unir-se a altres receptors. Per tant, el carbacol (CCH) només s'unirà als receptors dels canals de potassi, K^+ , activats per lligand. L'atropina (Atr) és un antagonista del receptor muscarínic competitiu i no selectiu que bloqueja l'efecte inhibitor que té el carbacol (CCH) sobre el teixit cardíac (Bucchi et al. 2007). Així, l'administració d'elevades concentracions d'atropina elimina l'efecte produït pel carbacol (CCH) i fins i tot la reversió completa d'una parada auricular.

La Fig. 4.12 mostra la dependència dels batecs per minut amb la concentració de carbacol (CCH).

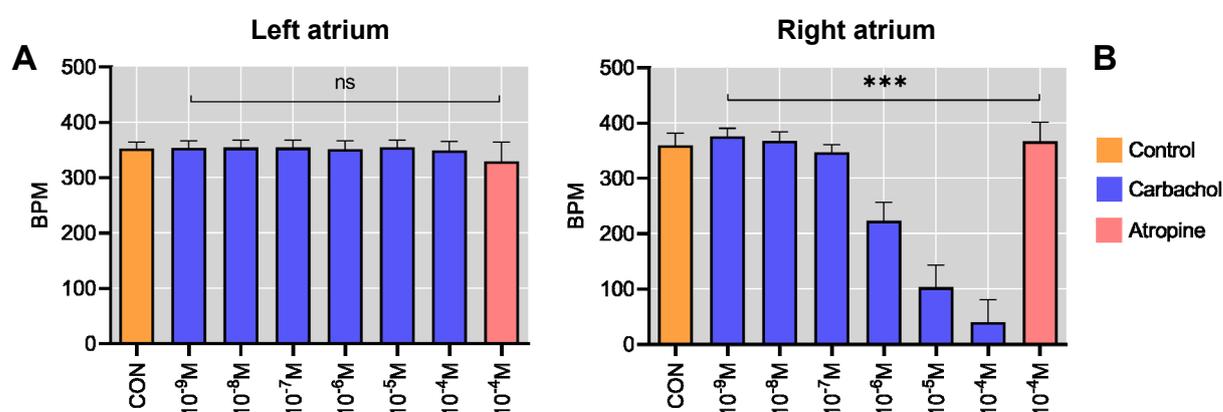


Fig. 4.12. A. Batecs per minut (BPM) per a diferents concentracions de carbacol (CCH) amb freqüència d'estimulació constant de 6 Hz. **B.** Batecs per minut (BPM) a l'aurícula esquerra contracció per a diferents concentracions de carbacol (CCH) sense cap tipus d'estimulació.

En el teixit cardíac no estimulat de les aurícules dretes dels ratolins a concentracions més baixes de carbacol (CCH) de $10^{-9}M$ a $10^{-7}M$, no s'observa un efecte significatiu sobre la freqüència de les contraccions, i no és fins a concentracions superiors a $10^{-7}M$ que es comença a observar una marcada disminució del batecs per minut (BPM). És després de l'administració de $10^{-4}M$ de carbacol (CCH), quan els batecs totals per minut tendeixen a ser de zero BPM (estancament auricular); en cinc de les sis aurícules provades van ser zero BPM. Després de l'administració de $10^{-4}M$ d'atropina (Atr) que actua com antagonista muscarínic competitiu, es restableix ràpidament la taxa de contracció original (CON). En canvi, en el teixit cardíac estimulat de l'aurícula esquerra, les concentracions ascendents de carbacol (CCH) i $10^{-4}M$ d'atropina (Atr) no produeixen un efecte estadísticament significatiu sobre la freqüència de les contraccions.

En la Fig. 4.13 es mostra l'efecte sobre l'amplitud de la contracció del teixit cardíac en funció de diferents concentracions d'estimulació muscarínica amb l'antagonista carbacol (CCH). En ambdues aurícules (Fig. 4.13 A i Fig. 4.13 B) s'observa una disminució de l'amplitud de contracció. A l'aurícula dreta l'efecte sobre les cèl·lules marcapassos es superposa amb l'efecte directe sobre les cèl·lules musculars tal com es mostra a l'aurícula esquerra. L'administració de $10^{-4}M$ d'atropina (Atr) fa recuperar l'amplitud de les contraccions en ambdues aurícules, mostrant un efecte muscarínic específic.

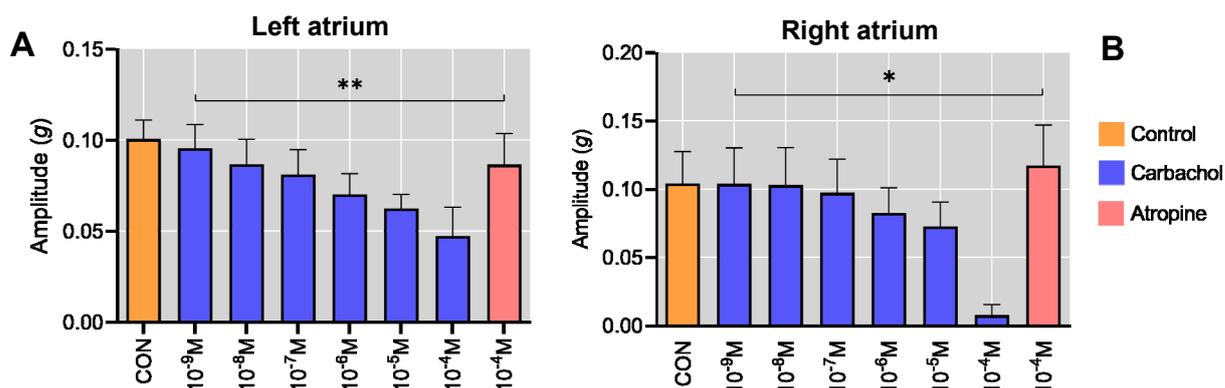


Fig. 4.13. A. Amplitud de la contracció per a diferents concentracions de carbacol (CCH) amb freqüència d'estimulació constant de 6 Hz. **B.** Amplitud de contracció a l'aurícula esquerra per a diferents concentracions de carbacol (CCH) sense cap tipus d'estimulació.

En les aurícules dretes s'observa com la disminució de l'amplitud de contracció és més acusada després de l'administració de $10^{-7}M$ de carbacol (CCH). S'ha de tenir en compte que per una concentració de $10^{-4}M$, cinc de cada sis aurícules dretes es van aturar per estancament auricular i, per tant, van tenir una força de contracció igual a zero.

La Fig. 4.14 representa l'efecte de la duració de la contracció del teixit cardíac en funció de diferents concentracions d'estimulació muscarínica amb l'antagonista carbacol (CCH). La duració de la contracció s'ha mesurat a diferents nivells del pic màxim. En aquesta figura es mostra la duració mesurada corresponent al 50% del valor màxim del pic de la contracció, és el que és coneix com *Full-Width-Half-Maximum* (FWHM); en la figura aquest valor s'indica com FW50.

En el teixit auricular dret estimulat, el carbacol ha reduït globalment la duració de la contracció mesurada al nivell del 50% (FW50). Però no és fins a partir d'una concentració de $10^{-6}M$ de carbacol (CCH) quan s'observa una marcada

disminució de duració de la contracció mesurada. A una concentració de $10^{-4}M$ de carbacol (CCH), cinc de cada sis teixits estaven aturats i, per tant, el FW50 era igual a zero. Aquest fet està relacionat amb l'efecte sobre les cèl·lules marcapassos de l'aurícula dreta. L'administració de $10^{-4}M$ d'atropina (Atr) a l'aurícula dreta restableix ràpidament la duració de la contracció original (CON).

En el teixit cardíac de l'aurícula esquerra s'observa un petit augment de la duració al nivell del 50% (FW50) en funció de la concentració de carbacol, però aquest augment no és estadísticament significatiu. En general, l'administració de concentracions successives de carbacol (CCH) i una concentració de $10^{-4}M$ d'atropina (Atr) no produeix un efecte significatiu en la duració de la contracció al nivell del 50% (FW50) a l'aurícula esquerra.

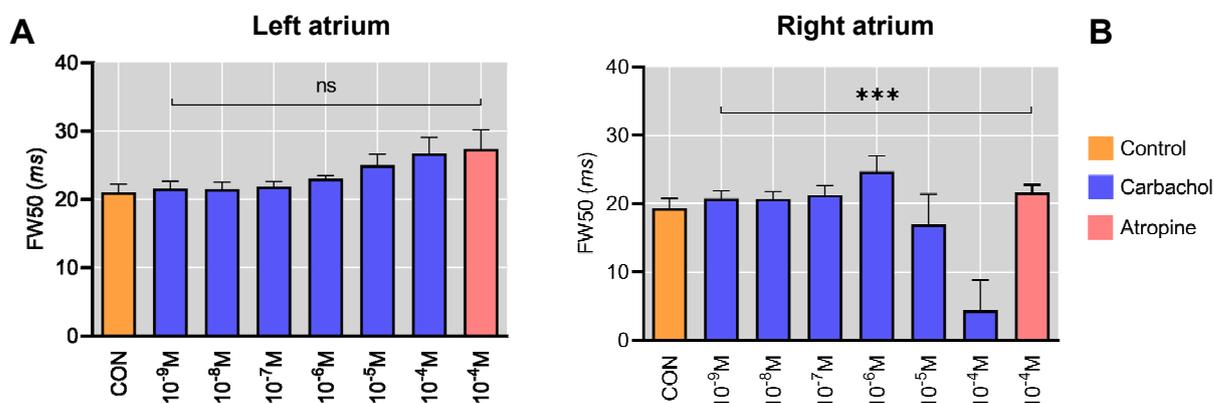


Fig. 4.14. **A.** Duració de la contracció per a diferents concentracions de carbacol (CCH) amb freqüència d'estimulació constant de 6 Hz. **B.** Duració de la contracció a l'aurícula esquerra per a diferents concentracions de carbacol (CCH) sense cap tipus d'estimulació.

Els resultats obtinguts en aquest apartat coincideixen amb els descrits a la literatura (Di Francesco. 2010, Puglisi et al. 2013). A l'aurícula dreta (que conté cèl·lules marcapassos i no marcapassos), la velocitat i l'amplitud de la contracció es redueixen considerablement fins a arribar a un estat d'asístole auricular. La reducció efectiva del nombre de contraccions per minut (BPM) i l'amplitud no s'observa de forma significativa fins a concentracions de carbacol (CCH) superiors a $10^{-7}M$, i té la seva explicació en el fet que a concentracions baixes només es tanquen els canals de sodi i no és fins a concentracions més altes que s'obren els canals de potassi GIRK (Di Francesco. 2010). Per tant, la ràpida reducció de la velocitat i la força de la contracció observada després de concentracions superiors a $10^{-7}M$ és el resultat de l'efecte acumulatiu dels canals de sodi i l'obertura dels canals potassi GIRK.

En les aurícules estimulades elèctricament, aurícules esquerres, el carbacol (CCH) només ha provocat una disminució significativa de l'amplitud, però no s'ha presentat cap variació ni en l'amplada del senyal (FWHM) ni en els batecs per minut (BPM). En altres paraules, l'administració del fàrmac parasimpàtic redueix la força de la contracció però no provoca una parada auricular. El manteniment de BPM estables mostra que l'estímul elèctric extern actua com un marcapassos artificial que manté constant la taxa de batecs malgrat l'ús de carbacol (CCH). La reducció de l'amplitud, però, demostra que tant les cèl·lules marcapassos com les no marcapassos tenen receptors muscarínics sensibles al carbacol. Aquestes observacions són coherents amb els experiments realitzats en ventricles de rata per McMorn ([McMorn et al. 1993](#)).

En canvi s'observa com en les aurícules no estimulades elèctricament, aurícules dretes, l'administració d'atropina (Atr) restableix l'aturada auricular induïda pel carbacol (CCH), així com un restabliment de l'amplitud de contracció, dels batecs per minut (BPM) i la duració de la contracció a valors pròxims al control. La duració de la contracció és regulada pels canals de calci de tipus L, per això en l'aurícula dreta observem com el carbacol tanca els canals de calci d'aquests tipus, i aquest fet produeix una disminució de la durada de la contracció, mentre que l'atropina en obrir una altra vegada aquests canals produeix una recuperació de la durada de la contracció. A les aurícules dretes, malgrat que els teixits auriculars no han arribat mai a l'aturada auricular, l'administració d'atropina (Atr) origina un petit pic en la força de contracció, que s'estabilitza ràpidament. Això demostra, a més, que els receptors muscarínics sensibles al carbacol (CCH) i a l'atropina (Atr) estan presents tant a les cèl·lules marcapassos com a les no marcapassos.

Les mesures de l'interval de temps fins el pic (t_{tp}), del temps de pujada (T_{rise}) i de la constant de temps (Tau), per a diferents concentracions de CCH i atropina han sortit no significatives per a l'aurícula esquerra i dreta.

4.3.1.2.2 *Efecte patològic: episodi d'hipòxia*

En els següents experiments es simula l'efecte d'hipòxia aturant l'oxigen subministrat al bany d'òrgans mitjançant la interrupció del subministrament de gas carboxigenat via bombolleig (*bubbling*). Cal recordar que, el teixit cardíac és un teixit altament depenent d'oxigen. Així, l'oxigen en arribar al mitocondri es transforma en ATP, que és l'energia necessària per: (1) la contracció cardíaca i (2) el funcionament de les bombes actives o bombes d'ATPasa (SERCA, NCX).

En la Fig. 4.14 es mostra el protocol que s'ha utilitzat per simular el fenomen d'hipòxia en l'aurícula dreta del teixit cardíac.

En primer lloc s'interromp l'oxigen, i transcorreguts aproximadament 200 s, es torna a activar el subministrament d'oxigen. Es pot observar clarament a la Fig. 4.14 que a partir de la fase d'interrupció d'oxigen es produeix una disminució progressiva de l'amplitud de l'activitat contràctil del teixit cardíac i, com a partir de l'activació altra vegada del subministrament d'oxigen es recupera de forma progressiva l'amplitud del senyal d'activitat contràctil fins arribar a valors d'amplitud similars a la fase prèvia a l'inici de la hipòxia, fase de control (CON). No s'han observat canvis en el pH del medi durant el transcurs de l'experiment d'hipòxia, s'ha mantingut el pH a 7,4.

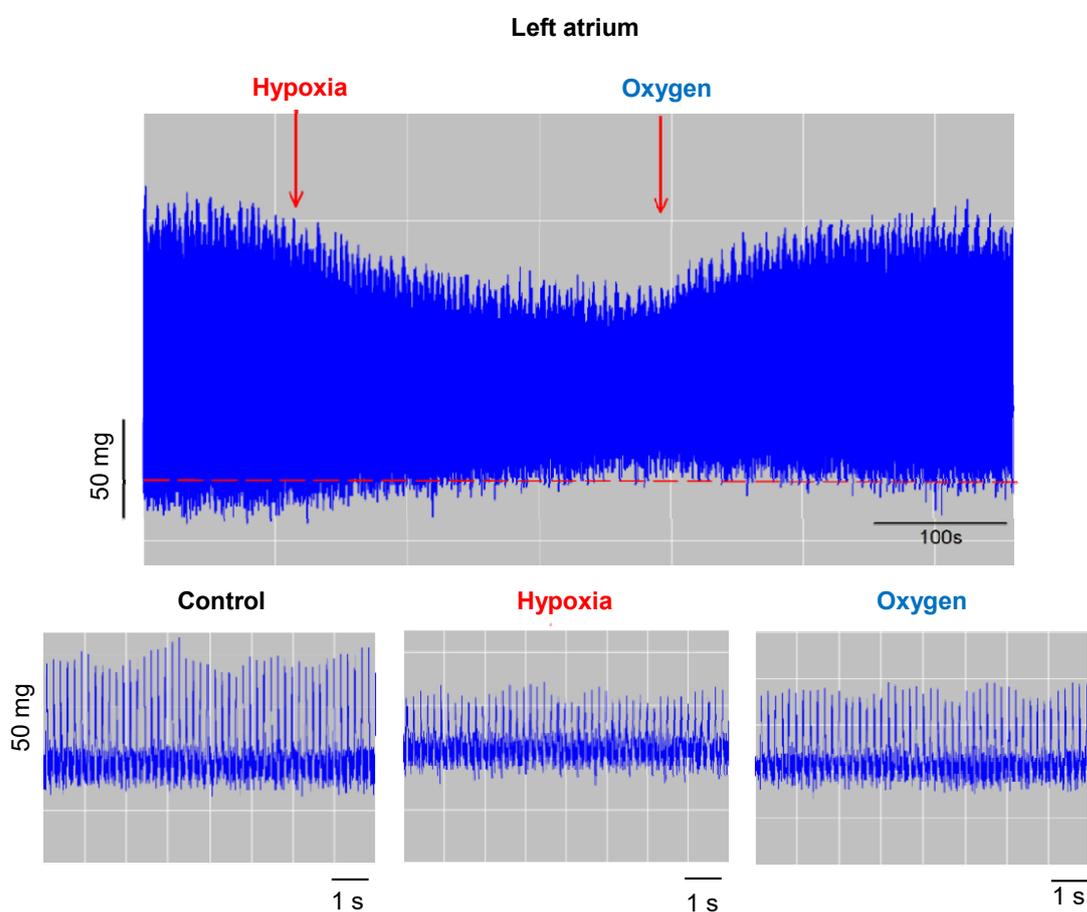


Fig. 4.15. Protocol d'hipòxia en l'aurícula esquerra del teixit cardíac (estimulada).

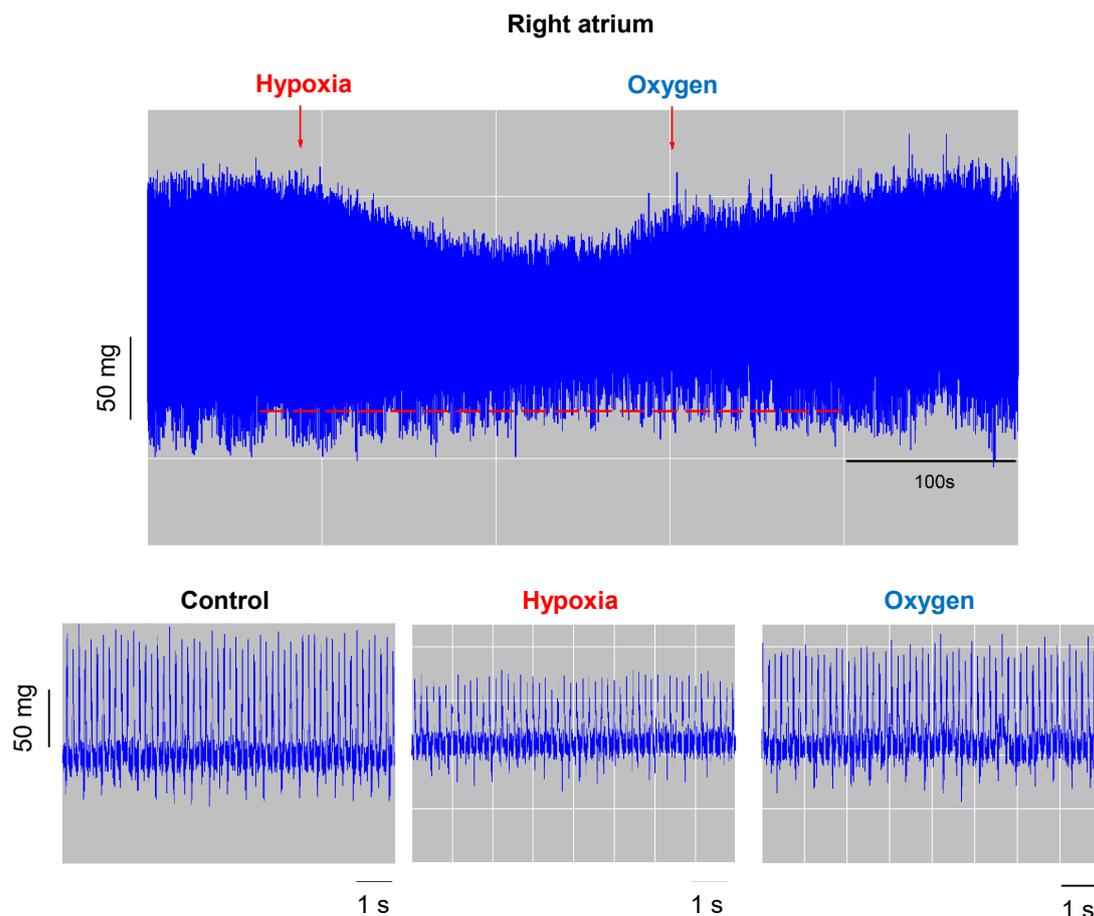


Fig. 4.16. Protocol d'hipòxia en l'aurícula dreta del teixit cardíac (no estimulada).

A la [Fig. 4.17](#) es mostra l'efecte sobre els batecs per minut (*BPM*) realitzats pel teixit cardíac en l'experiment d'hipòxia.

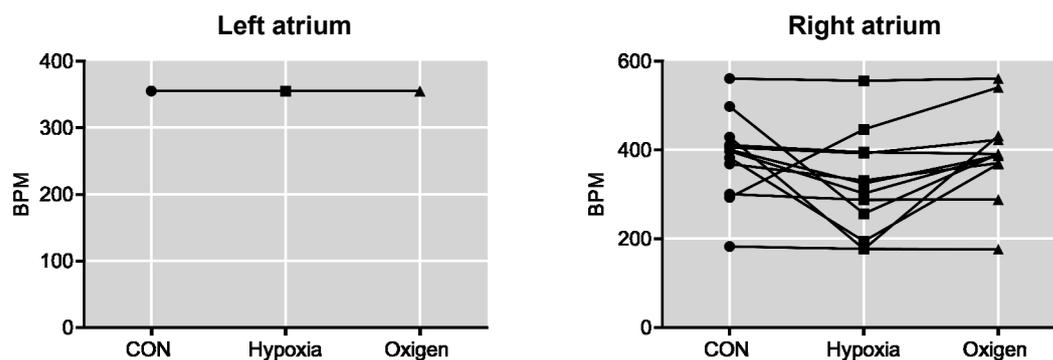


Fig. 4.17. A. Batecs per minut (*BPM*) durant l'experiment d'hipòxia en l'aurícula esquerra estimulada. **B.** Batecs per minut (*BPM*) durant l'experiment d'hipòxia en l'aurícula dreta sense cap tipus d'estimulació.

Durant l'experiment d'hipòxia no s'ha observat una variació estadísticament significativa dels batecs per minut (*BPM*) en cap de les dues aurícules, en el cas

de l'aurícula esquerra és on s'ha mantingut més constant, mentre que en l'aurícula dreta s'observa alguna petita variació dels batecs en la fase d'hipòxia, però aquesta variació no és significativa.

En la Fig. 4.18 es mostra l'efecte sobre l'amplitud de la contracció del teixit cardíac en l'experiment d'hipòxia.

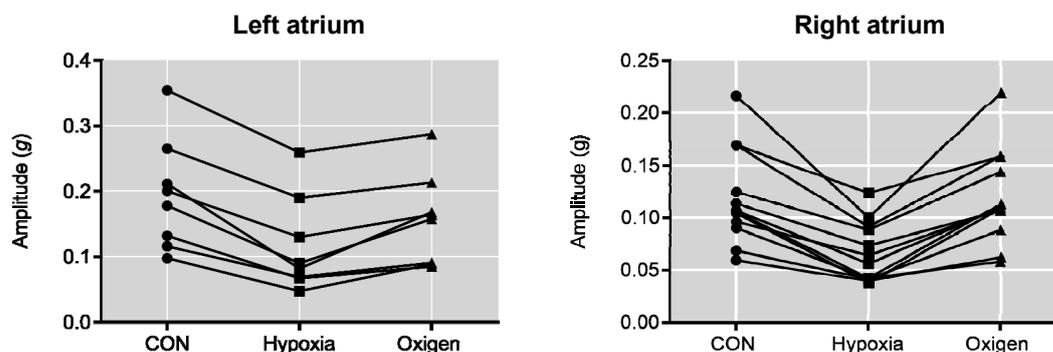


Fig. 4.18. **A.** Variació de l'amplitud del senyal de contracció durant l'experiment d'hipòxia en l'aurícula esquerra estimulada. **B.** Variació de l'amplitud del senyal de contracció durant l'experiment d'hipòxia en l'aurícula dreta sense cap tipus d'estimulació.

La variació de l'amplitud de la contracció del teixit cardíac deguda a l'efecte d'hipòxia és més forta en l'aurícula dreta. La variació dels valors de l'amplitud de la contracció en l'experiment d'hipòxia és estadísticament significativa tant a l'aurícula esquerra com a la dreta amb un p -valor de $p < 0.0001$ (****). En la Fig. 4.19 es mostra l'efecte sobre la duració de la contracció del teixit cardíac en l'experiment d'hipòxia.

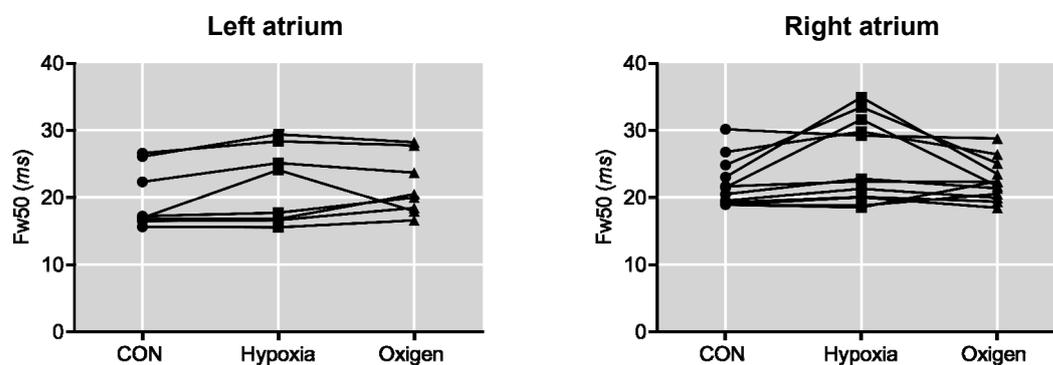


Fig. 4.19. **A.** Variació de la duració de contracció (FWHM) durant l'experiment d'hipòxia en l'aurícula esquerra estimulada. **B.** Variació de la duració de contracció durant l'experiment d'hipòxia en l'aurícula dreta sense cap tipus d'estimulació.

Durant l'experiment d'hipòxia no s'ha observat una variació estadísticament significativa de la duració de contracció al nivell del 50% (FWHM) en cap de les dues aurícules.

Les mesures de l'interval de temps fins el pic (ttp), del temps de pujada ($Trise$) i de la constant de temps (Tau) per a les diferent condicions d'oxigen han sortit no significatives per a l'aurícula esquerra i dreta.

4.4 Mètode computacional per a la classificació i detecció d'anomalies en dades de contracció mecànica.

En aquest apartat es presenten dues metodologies per extreure informació de anomalies del senyal (Veure [Figura 4.20](#)):

- Classificador d'anomalies (*anomaly classifier*)
- Detecció d'anomalies (*anomaly detector*)

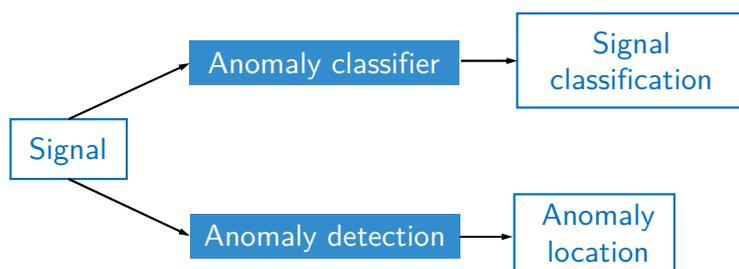


Fig. 4.20. Classificador i detector d'anomalies.

El classificador d'anomalies (*anomaly classifier*) consisteix en classificar el senyal de contracció en funció de si presenta alguna anomalia, classe anòmala, o si no presenta cap anomalia, classe no anòmala. Aquesta primera aproximació, no ens dona informació temporal d'on es produeix l'esdeveniment anòmal, simplement indica si hi ha o no una anomalia present en el senyal. En canvi, el detector d'anomalies, sí que ens dona informació temporal d'on es produeix l'esdeveniment anòmal.

4.4.1 Creació de la base de dades.

Es parteix de la creació de una base de dades (*dataset*) sintètiques de la contracció mecànica del teixit cardíac. En la creació de la base de dades sintètiques s'han generat des de senyals de contracció normal fins a diferents dades de contracció anòmala. S'han generat 1 senyal de contracció normal i 7 tipus de diferents anomalies. S'han generat 100 dades per a cada categoria, $N=800$ senyals. En la següent taula ([Taula 4.4](#)) es resumeixen les diferents dades sintètiques generades. Aquestes dades serviran per a validar tant el classificador com el detector d'anomalies.

Per la creació dels senyals sintètics d'anomalies, s'han tingut en compte els diferents fenòmens de contracció anòmala observats als registres experimentals. La freqüència de mostreig dels senyals amb el convesor analògic digital

PowerLab 800 (AD Instruments, Dunedin, Nova Zelanda) amb una freqüència de mostreig de $F_s=1000$ [Hz]. El teixit cardíac ha estat estimulat amb un pols de corrent de 40 mA durant 0,4 ms, amb diferents freqüències d'estimulació, T_{stim} , de 1 Hz, 2 Hz, 3 Hz, 5 Hz i 10 Hz.

	Nom	Descripció	Categoria	Anomalies	Repeticions
				N_{anom}	N_{rep}
1	Normal signal	Senyal de contracció normal.	Normal	6	x
2	Less Amplitude	Senyal amb fenòmens de petita amplitud de contracció.	Anòmala	6	x
3	More Amplitude	Senyal amb fenòmens de gran amplitud de contracció.	Anòmala	6	x
4	Missing Pulse	Senyal amb absència de polsos de contracció.	Anòmala	1	x
5	Slow Pulse decay	Senyal amb períodes de contracció amb dinàmica de decaïment lenta.	Anòmala	1	x
6	Fast Pulse decay	Senyal amb períodes de contracció amb dinàmica de decaïment ràpida.	Anòmala	1	x
7	Early or anticipate pulse	Senyal amb períodes de contracció anticipats.	Anòmala	1	x
8	Pause	Senyal amb períodes d'absència de polsos de contracció.	Anòmala	1	10

Taula. 4.4. Base de dades sintètiques de senyals de la contracció mecànica del teixit cardíac.

En la [Figura 4.21](#) es mostren les diferents dades sintètiques generades pel cas d'una freqüència d'estimulació de 6 [Hz], que implica l'aplicació d'un pols d'estimulació aproximadament cada 167 [mostres]. Per la creació dels senyals sintètics s'ha imposat una duració total del senyal de 100000 [mostres].

Per tal de fer els senyals més realista s'ha afegit soroll aleatori (*random*) seguint una llei normal $\sim N(\mu, \sigma)$ amb valor mitjà igual a zero, $\mu=0$, i una desviació estàndard, $\sigma=0.005$. A continuació es descriuen els paràmetres utilitzats per la generació de cada un dels senyals sintètics:

1. Senyal tipus Normal

Per observació del senyal experimental, el senyal corresponent a una contracció s'ha creat amb una dinàmica de pujada recta i amb un decaïment que segueix un model exponencial simple del tipus;

$$f(x) = e^{-\frac{x}{\tau}} \quad (4.7)$$

On

τ és la constant de temps (*time constant*).

El senyal d'estimulació s'ha modelitzat com un tren de polsos de deltes de Dirac amb freqüència d'estimulació, T_{stim} . La constant temps pel senyal normal pren un valor de $\tau=1/0.03$. S'ha definit una amplitud de 0.2 [g]. Finalment, el senyal normal s'ha aconseguit del resultat de convolucionar el tren de polsos amb el senyal exponencial corresponent a una contracció. Al senyal resultant, també s'afegeix un *offset* de 0.15 [g].

2. Senyal tipus More amplitude

S'utilitza el senyal tipus Normal i s'afegeixen anomalies en polsos aleatoris, $N_{anom}=6$, resultant-ne un 50% més d'amplitud del pols.

3. Senyal tipus Less amplitude

S'utilitza el senyal tipus Normal i s'afegeixen anomalies en polsos aleatoris, $N_{anom}=6$, resultant-ne un 50% menys d'amplitud del pols.

4. Senyal tipus Missing pulse

S'utilitza el senyal tipus Normal i s'afegeixen anomalies en polsos aleatoris, $N_{anom}=1$, resultant-ne una amplitud igual a zero.

5. Senyal tipus Slow pulse decay

S'utilitza el senyal tipus Normal i s'afegeixen anomalies en polsos aleatoris, $N_{anom}=1$, utilitzant un decaïment exponencial més lent amb una constant de temps de $\tau=1/0.006$.

6. Senyal tipus Slow pulse decay.

S'utilitza el senyal tipus Normal i s'afegeixen anomalies en polsos aleatoris, $N_{anom}=1$, utilitzant un decaïment exponencial més ràpid amb una constant de temps de $\tau=1/0.1$.

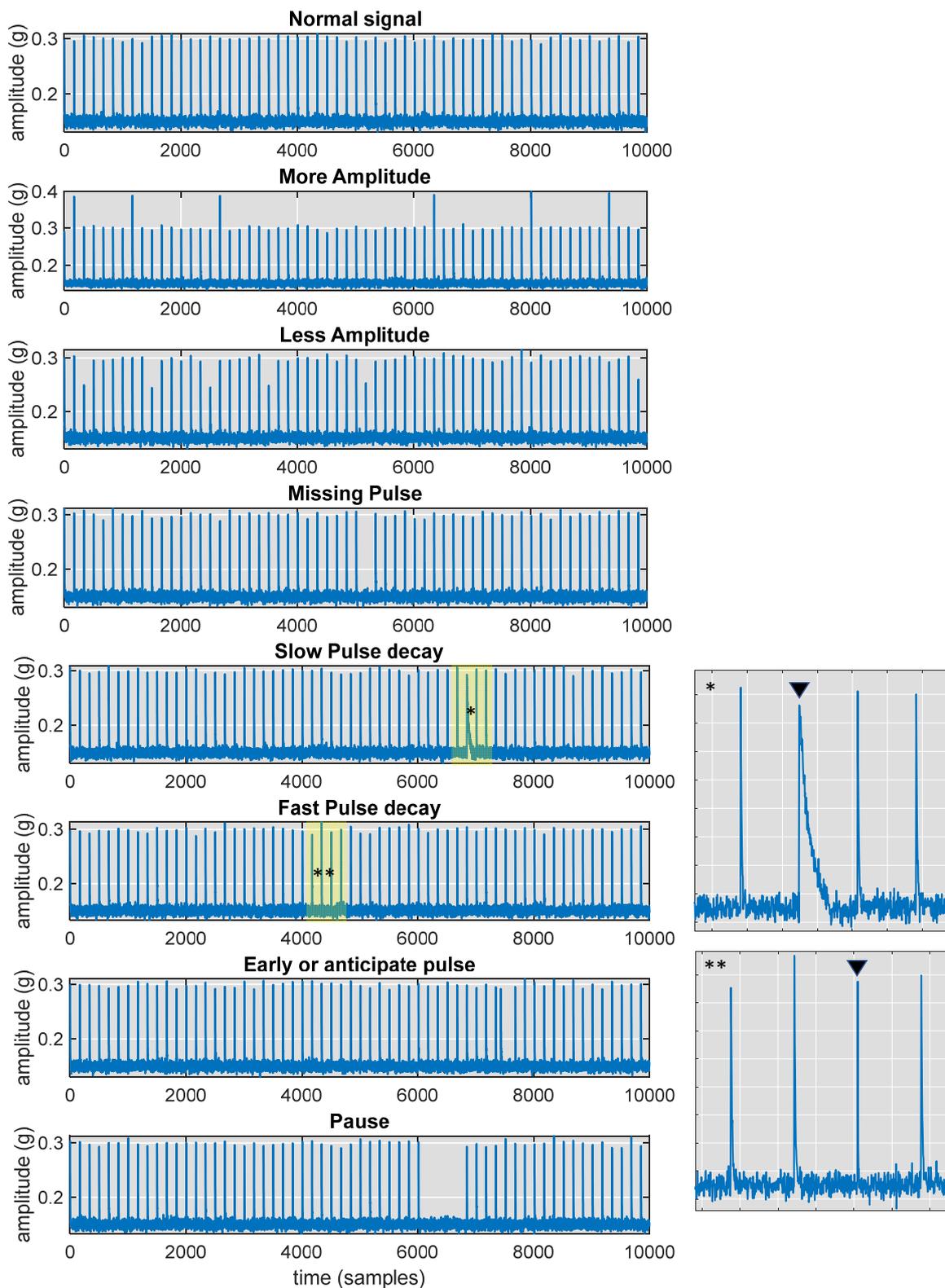


Fig. 4.21. Senyals sintètiques representatives de cada anomalia per una freqüència d'estimulació de 6 Hz.

7. Senyal tipus Early pulse

S'utilitza el senyal tipus Normal i s'afegeixen anomalies en polsos aleatoris, $N_{anom}=1$, resultant-ne una anticipació del pols d'estimulació.

8. Senyal tipus Pause

S'utilitza el senyal tipus Normal i s'afegeixen anomalies de pauses aleatòries, $N_{anom}=1$, durant un nombre determinat de polsos, $Nrep=10$.

Anomalies en polsos aleatoris, $N_{anom}=1$.

4.4.2 Classificació d'anomalies.

Per la classificació dels senyals s'han avaluat tres opcions de classificadors (veure Fig. 4.22):

-Classificador basat en intel·ligència artificial clàssica (*Machine Learning*) a partir de extracció de característiques. (C.1)

Classificador basat en aprenentatge profund (*Deep Learning*):

-Classificador basat en xarxa LSTM i extracció de característiques. (C.2)

-Classificador basat en xarxa LSTM i el senyal original (raw). (C.3)

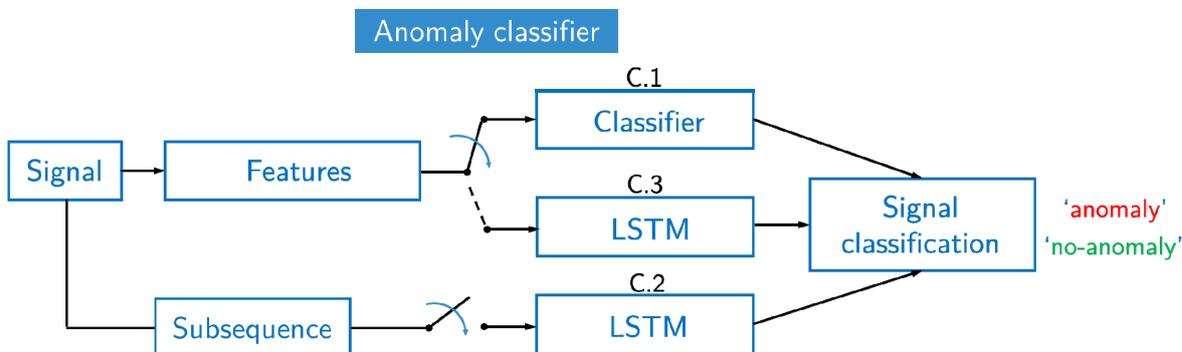


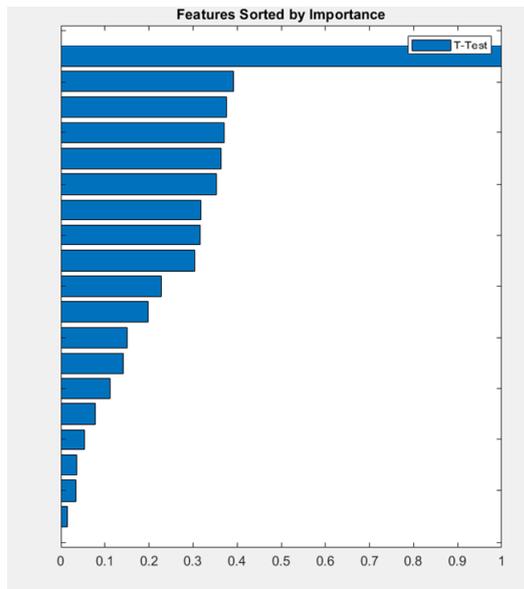
Fig. 4.22. Classificador d'anomalies.

Aquests classificadors tenen la capacitat de classificar de forma automàtica els senyals de contracció del teixit cardíac en dues categories: senyal normal (*normal signal*), senyal anòmal (*anomaly signal*).

4.4.2.1 Classificador basat en aprenentatge màquina

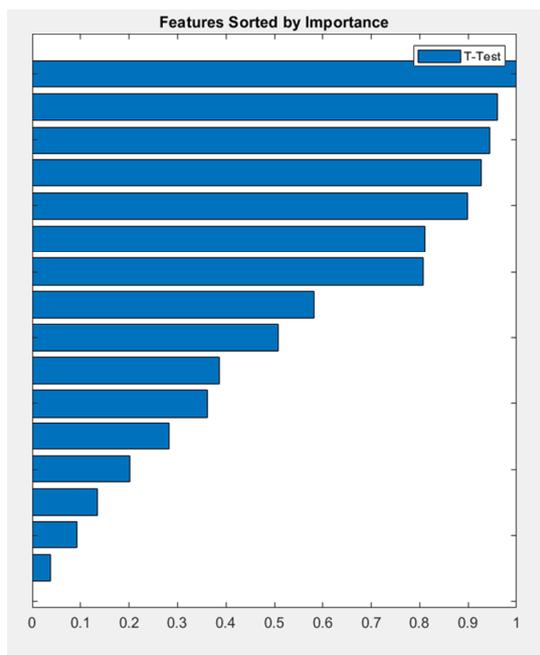
Per l'entrenament del classificador basat en intel·ligència artificial clàssica o *Machine Learning*, cal extreure unes característiques. L'opció que hem seleccionat inclou característiques temporals (*temporal features*), característiques freqüencials (*freqüencial features*) i característiques no lineals

(*non-linear features*), fins a un total de 19 característiques presentades en l'apartat següent. Amb mode de resum, s'han avaluat l'exactitud (*accuracy*) per a diferents nombres de característiques. En el nostre cas amb el test estadístic *t*-test (*two-sample t-test*) s'han ordenat les característiques per rellevància. (veure figures: Fig. 4.23, Fig. 4.24 i Fig. 4.25).



Features	t-test
Approximation Entropy	8.9603
Crest Factor	3.5106
Clearance Factor	3.3729
Impulse Factor	3.3174
Total Harmonic Distorsion (THD)	3.2546
Kurtosis	3.1557
Shape Factor	2.8474
Skewness	2.8330
Correlation Dimension	2.7257
Peak Value (frequency)	2.0434
Peak Value	1.7800
Std	1.3565
Root Mean Square (RMS)	1.2701
Signal-to-Noise Ratio (SNR)	0.9949
Signal-to-Noise and Distortion Ratio (SINAD)	0.7078
Band Power	0.4758
Peak Frequency	0.3255
Lyapunov Exponent	0.3147
Mean	0.1304

Fig. 4.23. Classificació per rellevància amb el test *t*-test de totes les característiques temporals, freqüencials i no lineals (19 característiques) amb l'ordre de la taula.



Features	t-test
Crest Factor	3.5106
Clearance Factor	3.3729
Impulse Factor	3.3174
Total Harmonic Distorsion (THD)	3.2546
Kurtosis	3.1557
Shape Factor	2.8474
Skewness	2.8330
Peak Value (frequency)	2.0434
Peak Value	1.7800
Std	1.3565
Root Mean Square (RMS)	1.2701
Signal-to-Noise Ratio (SNR)	0.9949
Signal-to-Noise and Distortion Ratio (SINAD)	0.7078
Band Power	0.4758
Peak Frequency	0.3255
Mean	0.1304

Fig. 4.24. Classificació per rellevància només les característiques temporals i freqüencials (16 característiques) amb l'ordre de la taula.

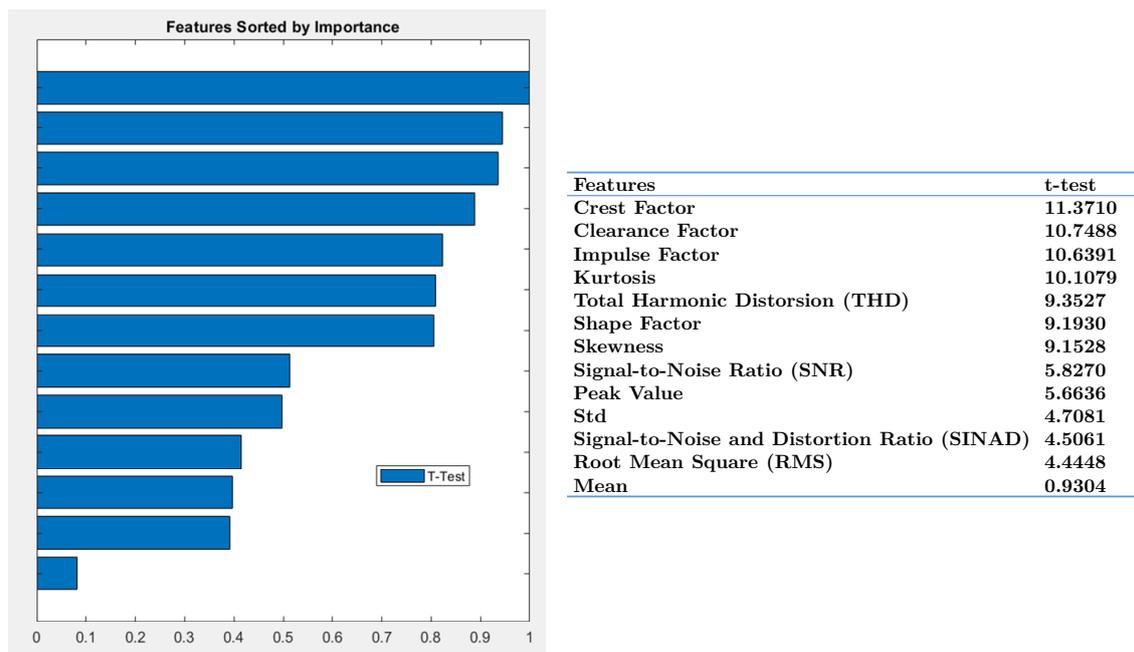


Fig. 4.25. Classificació per rellevància amb el test *t-test* de només les característiques temporals (13 característiques) amb l'ordre de la taula.

4.4.2.1.1 *Extracció de característiques*

En el nostre cas, s'han calculat un total de 19 característiques que inclouen característiques temporals (*temporal features*), característiques freqüencials (*frequencial features*) i característiques no lineals basades en la teoria del caos (*non-linear features*). De totes aquestes característiques es determina quines són les que discriminen millor els senyals patològics dels senyals sans. Els canvis en aquestes característiques poden indicar canvis en l'estat de salut de la cèl·lula.

Característiques temporals.

A continuació es descriuen de forma detallada les 13 característiques temporals que s'han calculat per la detecció d'anomalies en el senyal del teixit cardíac. S'han utilitzat mesures d'estadística bàsica i estadística d'ordre superior (curtosi i asimetria).

1) Factor de cresta (*Crest Factor, CF*).

El factor de cresta és indicatiu del nombre de pics presents en un senyal. El factor de cresta 1 indica que no hi ha pics en el senyal, com ara un senyal de corrent continu o un senyal d'ona quadrada, i un factor de cresta elevat indica la presència de molts pics en el senyal. El factor de cresta es defineix com l'amplitud màxima del senyal dividit pel valor RMS del senyal:

$$CF(x) = \frac{\max(|x|)}{RMS(x)} = \frac{\max(|x|)}{\sqrt{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_i^2}} \quad (4.8)$$

Aquest paràmetre és molt interessant per l'estudi de les anomalies del teixit cardíac, atès que les anomalies sovint es manifesten primer en canvis en el pic d'un senyal abans de manifestar-se en l'energia representada per l'arrel quadrada mitjana del senyal. El factor de cresta (*crest factor*) ens pot proporcionar un avís precoç de les anomalies quan es desenvolupen per primera vegada.

2) factor d'eliminació (*Clearance Factor, CLF*).

El factor d'eliminació compara l'amplitud màxima del senyal amb l'amplitud mitjana del senyal. Es defineix com:

$$CLF(x) = \frac{\max(|x|)}{\left(\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \sqrt{|x_i|}\right)^2} \quad (4.9)$$

3) Factor d'impuls (*Impulse Factor, IF*).

El factor d'impuls compara l'amplitud màxima del senyal amb l'amplitud mitjana del senyal. Es defineix com:

$$IF(x) = \frac{\max(|x|)}{\mu(x)} = \frac{\max(|x|)}{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N |x_i|} \quad (4.10)$$

4) Curtosi (*Kurtosis, kurt*).

La curtosis mesura com de punxegut és un pic (*peakedness*) de la funció de distribució de probabilitat del senyal. Es defineixen dos tipus de curtosi: la curtosi no normalitzada (*kurtosis proper*) i la curtosi normalitzada o excés de curtosi (*kurtosis excess*). La curtosi d'excés computacionalment és eficient de calcular però, malauradament, és molt sensible als valors atípics (*outliers*). No s'ha fet correcció del biaix (*no bias-corrected*). La curtosi no normalitzada (*kurtosis proper*) es defineix com:

$$\text{kurt}(x) = \beta_2(x) = \frac{\mu_4(x)}{\sigma^4(x)} = \frac{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^4}{\left(\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2\right)^2} \quad (4.11)$$

On

σ és la desviació estàndard.

μ_4 és el quart moment central.

La curtosi normalitzada o excés de curtosi (*kurtosis excess*) es defineix com:

$$\text{kurt}(x) = \gamma_2(x) = \beta_2(x) - 3 = \frac{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^4}{\left(\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2 \right)^2} - 3 \quad (4.12)$$

El factor de correcció -3 s'afegeix per fer que la curtosi de la distribució normal sigui igual a zero. Segons el valor de la curtosis podem fer les següents afirmacions sobre la distribució de probabilitat (veure Fig. 4.26):

- $\text{Kurt}(x) > 0$ Distribució leptocúrtica (Super-Gaussiana)
- $\text{Kurt}(x) = 0$ Distribució mesocúrtica (Gaussiana)
- $\text{Kurt}(x) < 0$ Distribució platicúrtica (Sub-gaussiana)

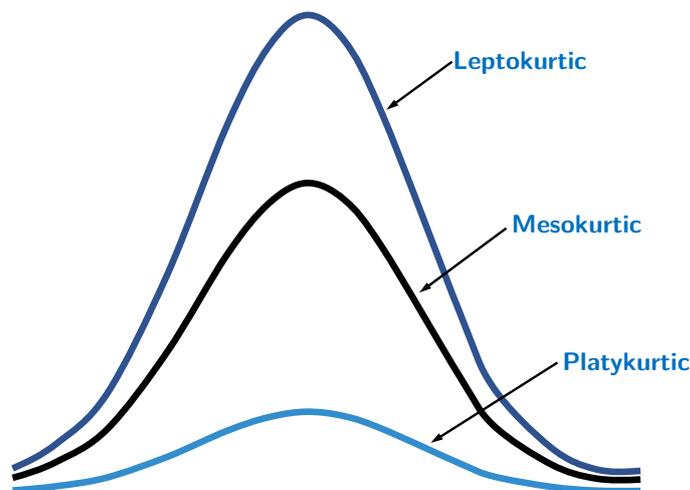


Fig. 4.26. Possibles distribucions de la curtosis.

En la majoria de les nostres dades, es presenten distribucions leptocúrtiques (súper gaussianes).

5) Distorsió harmònica total (*Total Harmonic Distorsion, THD*).

És la relació entre la potència dels components harmònics (soroll) i la potència fonamental (senyal). Es calcula com:

$$THD = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (P_i)^2}}{P_0} = \frac{\sqrt{P_1^2 + P_2^2 + \dots + P_n^2}}{P_0} \quad (4.13)$$

La THD s'expressa en decibels. La THD (dB) es defineix com:

$$THD_{dB} = 10 \cdot \log_{10}(THD) \quad (4.14)$$

La distorsió harmònica total es determina a partir de la freqüència fonamental i dels cinc primers harmònics, n , utilitzant un periodograma modificat. Pel càlcul del periodograma s'ha utilitzat una finestra de Kaiser amb longitud, L , igual que el senyal d'entrada i factor de forma $\beta=38$. El factor de forma, β , afecta l'atenuació del lòbul lateral de la transformada de Fourier en finestrada (Oppenheim et al. 1999). L'augment de β amplia el lòbul principal i disminueix l'amplitud dels lòbuls laterals. Així, en el nostre cas, s'ha seleccionat un factor de forma que proporciona una gran atenuació del lòbul lateral, $\beta=38$ (veure Fig. 4.27).

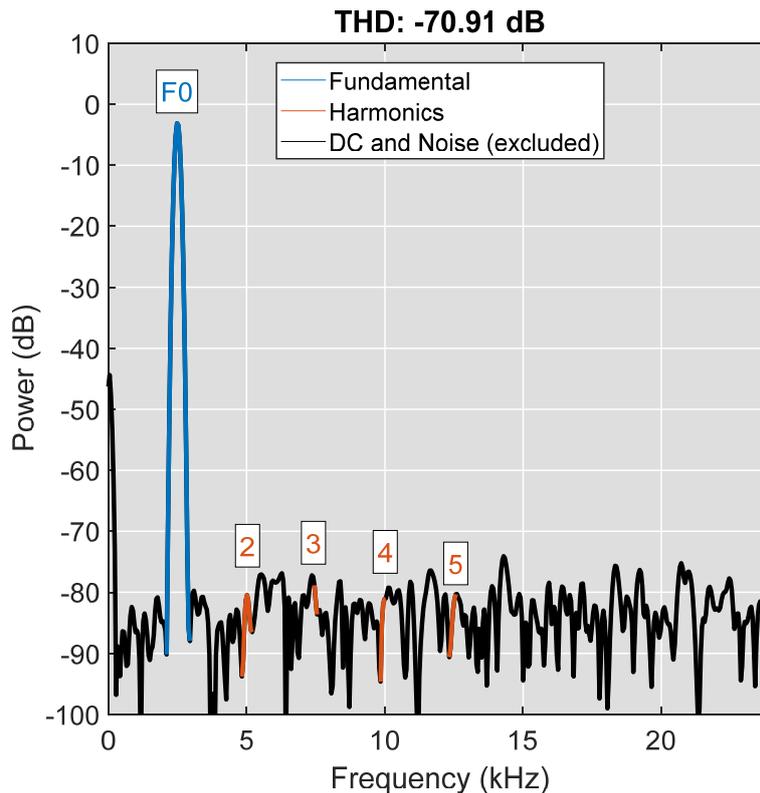


Fig. 4.27. Representació del periodograma pel càlcul del THD d'un senyal sinusoidal de $2,5 \text{ kHz}$ mostrejat a 48 kHz amb soroll blanc amb variància de valor $0,001$.

En el càlcul de la THD s'exclou el valor de la component DC. El nombre d'harmònics (inclòs el fonamental) ha estat seleccionat de $n=5$. Els coeficients de la finestra de Kaiser, w_K , (Kaiser and James. 1974) s'han calculat a partir de l'equació següent:

$$W_K(n) = \frac{I_0 \cdot \left(\beta \cdot \sqrt{1 - \left(\frac{n - N/2}{N/2} \right)^2} \right)}{I_0(\beta)} \quad 0 \leq n \leq N \quad (4.15)$$

On

I_0 és la funció de Bessel modificada d'ordre zero (de primer tipus).

β és el factor de forma.

6) Factor de forma (*Shape Factor, SF*).

Es defineix el factor de forma com el valor RMS del senyal dividit per la mitjana del valor absolut del senyal. Es defineix com:

$$SF(x) = \frac{RMS(x)}{\mu(x)} = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_i^2}}{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N |x_i|} \quad (4.16)$$

El factor de forma depèn de la forma del senyal tot i que és independent de les dimensions del senyal.

7) Asimetria (*Skewness*).

L'asimetria mesura el grau d'asimetria de la distribució de probabilitat d'un senyal. No s'ha fet correcció del biaix (*no bias-corrected*). Es defineix com:

$$\text{skew}(x) = \gamma_1(x) = \frac{\kappa_3}{\kappa_2^{3/2}} = \frac{\mu_3(x)}{\sigma(x)^3} = \frac{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^3}{\left(\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2 \right)^{3/2}} \quad (4.17)$$

On

μ és la mitjana.

σ és la desviació estàndard.

μ_3 és el tercer moment central.

κ_2 és el segon acumulant. A més: $\kappa_2 = \sigma^2 = \mu_2$.

Segons el valor de l'asimetria podem fer les següents afirmacions sobre la distribució de probabilitat:

- Si $\gamma > 0$, la distribució és positiva asimètrica (o a la dreta).
- Si $\gamma < 0$, la distribució és asimètrica negativa (o a la esquerra).
- Si $\gamma = 0$, la distribució és simètrica.

És un paràmetre a tenir en compte el diagnòstic d'anomalies, ja que els senyals anòmals es veuen afectats per la simetria de la distribució probabilística del senyal i, per tant, augmenta el nivell d'asimetria. S'ha de tenir en compte que una mostra representa una població gran i s'ha de corregir el biaix sistemàtic que es produeix. En les nostres mesures d'asimetria, curtosi i mitjana no s'ha aplicat la correcció del biaix (*bias-correction*), donat que aquesta correcció és més efectiva per a distribucions normals, que no és el cas dels nostres senyals.

8) Relació senyal-soroll (*Signal-to-Noise Ratio, SNR*).

És la relació entre la potència del senyal i la potència del soroll. La relació SNR es defineix de la següent manera:

$$SNR = \frac{P_{signal}}{P_{noise}} = \left(\frac{A_{signal}}{A_{noise}} \right)^2 \quad (4.18)$$

On

P_{signal} és la potència del senyal o de la freqüència fonamental.

P_{noise} és la potència del senyal corresponent al soroll.

A_{signal} és l'amplitud del senyal o de la freqüència fonamental.

A_{noise} és l'amplitud del senyal corresponent al soroll.

El SNR s'expressa en decibels. El SNR (*dB*) es defineix com:

$$SNR_{dB} = 10 \cdot \log_{10} \left(\frac{P_{signal}}{P_{noise}} \right) = 20 \cdot \log_{10} \left(\frac{A_{signal}}{A_{noise}} \right) \quad (4.19)$$

El SNR es determina mitjançant un periodograma modificat. Pel càlcul del periodograma s'ha utilitzat una finestra de Kaiser ([Kaiser and James. 1974](#)) amb longitud, L , igual que el senyal d'entrada i factor de forma $\beta=38$.

La potència del senyal, P_{signal} , s'obté calculant la potència de la freqüència fonamental. Per trobar la freqüència fonamental, es cerca al periodograma el component espectral més gran. Les regions fora del la freqüència fonamental es consideren soroll i serveixen per calcular la potència del soroll, P_{noise} . En el càlcul

es descarta el component freqüencial de DC i també els harmònics del senyal fonamental (veure Fig. 4.28).

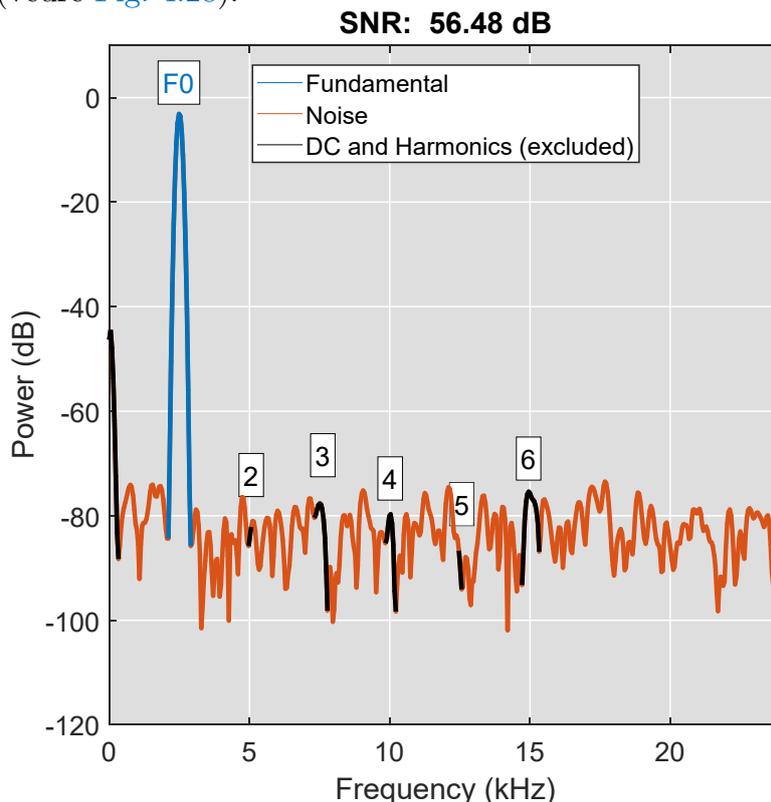


Fig. 4.28. Representació del periodograma pel càlcul del SNR d'un senyal sinusoidal de 2,5 kHz mostrejat a 48 kHz amb soroll blanc amb variància de valor 0,001.

9) Valor de pic (*Peak Value*).

Màxim valor absolut del senyal. Es calcula com:

$$\text{peak}(x) = \max(|x(t)|) \quad (4.20)$$

10) Desviació estàndard (*Standard Deviation, std*).

La desviació estàndard indica la dispersió dels valors d'un senyal respecte al seu valor mitjà. La desviació estàndard de la mostra (*sample standard deviation*) es calcula després d'aplicar la correcció de Bessel, com:

$$\sigma(x) = \text{std}(x) = \sqrt{\frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2} \quad (4.21)$$

11) Relació senyal-soroll i distorsió (*Signal-to-Noise and Distortion Ratio, SINAD*).

És una mesura similar al SNR. El SINAD es defineix com la relació entre la potència total del senyal i la potència total de soroll més la potència de la distorsió.

$$SINAD = \frac{P_{signal} + P_{noise+distort}}{P_{noise+distort}} \quad (4.22)$$

El SINAD s'expressa en decibels. El SINAD (dB), es defineix com:

$$SNR_{dB} = 10 \cdot \log_{10} \left(\frac{P_{signal} + P_{noise+distort}}{P_{noise+distort}} \right) \quad (4.23)$$

El SINAD es determina mitjançant un periodograma modificat. Pel càlcul del periodograma s'ha utilitzat una finestra de Kaiser (Kaiser and James. 1974) amb longitud, L , igual que el senyal d'entrada i factor de forma $\beta=38$ (veure Fig. 4.29).

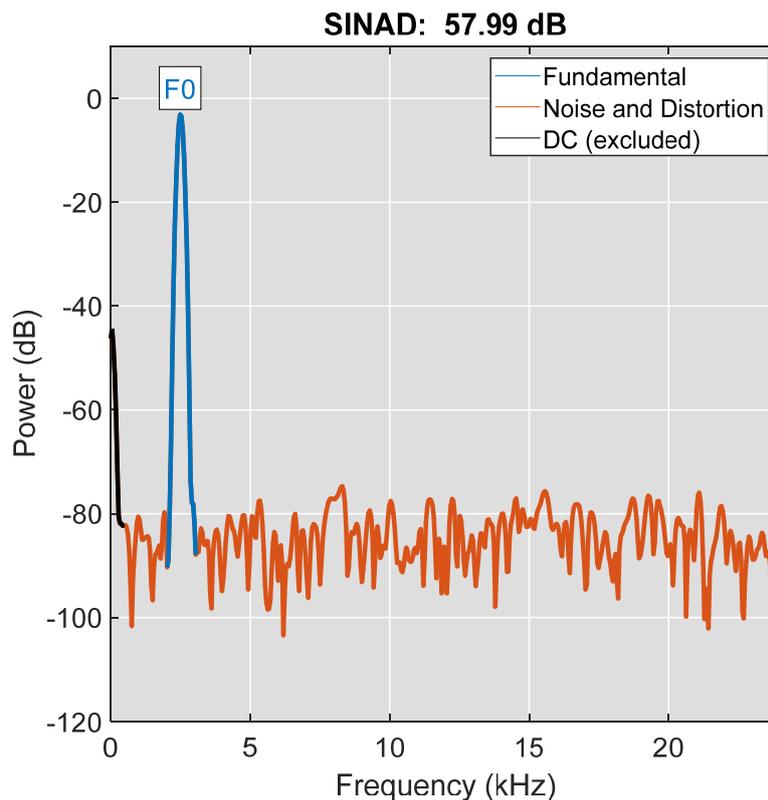


Fig. 4.29. Representació del periodograma pel càlcul del SINAD d'un senyal sinusoidal de 2,5 kHz mostrejat a 48 kHz amb soroll blanc amb variància de valor 0,001.

Per trobar la freqüència fonamental, es cerca al periodograma el component espectral més gran. Les regions fora del la freqüència fonamental es consideren

soroll més distorsió. En el càlcul no es té en compte el component freqüencial de DC.

12) Arrel quadràtica Mitjana (*Root Mean Square, RMS*).

Es defineix l'arrel quadràtica mitjana d'un senyal com (IEEE. 181):

$$RMS(x) = \sqrt{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_i^2} \quad (4.24)$$

13) Mitjana (*Mean*).

Es defineix la mitjana d'un senyal com:

$$\mu(x) = \bar{x} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_i \quad (4.25)$$

Característiques freqüencials.

A continuació es descriuen de forma detallada les 3 característiques freqüencials que s'han calculat per la detecció d'anomalies en el senyal del teixit cardíac. Les característiques freqüencials ens proporcionen mètriques del senyal en el domini de la freqüència. Sigui la funció d'autocorrelació, $r_{xx}(\tau)$, d'un senyal $x(t)$:

$$r_{xx}(\tau) = x(t) \otimes x(t) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) \cdot x(t - \tau)^* \cdot dt \quad (4.26)$$

L'asterisc denota un conjugat complex i, per descomptat, es pot ometre si el senyal es real. Per calcular les característiques freqüencials, primer hem de calcular l'espectre de potència. L'espectre de potència s'ha calculat a partir de la densitat espectral de potència (*Power Spectrum Density, PSD*) o també anomenat periodograma (Schuster. 1898). Per aplicació del teorema de Wiener-Khinchin, es defineix la densitat espectral de potència, $S_{xx}(f)$, (*Power Spectrum Density, PSD*) com la transformada de Fourier de la seva funció d'autocorrelació, és a dir:

$$S_{xx}(f) = F\{r_{xx}(\tau)\} = X(f) \cdot X(f) = |X(f)|^2 \quad (4.27)$$

En el nostre cas utilitzarem el mètode del periodograma promitjat, més conegut com el mètode de Welch. Computacionalment, el mètode de Welch calcula de

manera eficient la transformada de Fourier amb l'algorisme de la transformada ràpida de Fourier (*Fast Fourier Transform, FFT*). El principal avantatge d'aquest mètode és la reducció del nombre de càlculs, atès que divideix les dades en diverses seccions de finestres de Hamming amb una superposició definida, i després realitza la transformada ràpida de Fourier (*FFT*) a cada segment, es calcula la densitat espectral de potència (*PSD*) i, finalment, es fa el promig dels resultats obtinguts en totes les seccions (Hayes, Monson. 1996, Stoica et al. 2005). Pel nostre cas, hem utilitzat un solapament de $N_{overlap}=50$ (%) de superposició entre seccions i utilitzant una finestra de Hamming de longitud $n=64$ mostres. Per tant, la longitud de les seccions també és de 64.

14) Amplitud del pic (*Peak amplitude*).

L'amplitud del pic, es el valor màxim de la *PSD* calculada amb el mètode de Welch:

$$|H(\omega_{peak})| = \max(S_{xx}(\omega)) \quad (4.28)$$

Per la detecció dels pics es defineixen els següents paràmetres: mínima alçada de pic (*min peak height*) de valor $-\infty$, la mínima distància de pic (*min peak distance*) o també anomenada bretxa mínima de freqüència (*minimum frequency gap*) és la mínima freqüència on es pot trobar el pic amb un valor de 0.01 [*rad/s*], i la mínima prominència del pic (*min peak prominence*) o també anomenada tolerància a l'excursió del pic (*peak excursion tolerance*) amb un valor de 0.

15) Freqüència del pic (*Peak frequency*).

La freqüència de pic, ω_{peak} , és la freqüència angular [*rad/s*] on té lloc el pic freqüencial màxim, $|H(\omega_{peak})|$.

16) Banda de potència (*Band power*).

Es defineix la banda de potència, *BP*, com la integral de densitat espectral de potència (*PSD*) acotada entre les freqüències angulars ω_1 i ω_2 on es defineix la banda de potència, d'aquesta manera:

$$BP = \int_{\omega_1}^{\omega_2} S_{xx}(\omega) \cdot d\omega \quad (4.29)$$

En el nostre cas s'ha definit ω_1 i ω_2 amb els valors de 0 i 0,5 [*rad/s*] respectivament. La integral es calcula numèricament amb el mètode trapezoidal.

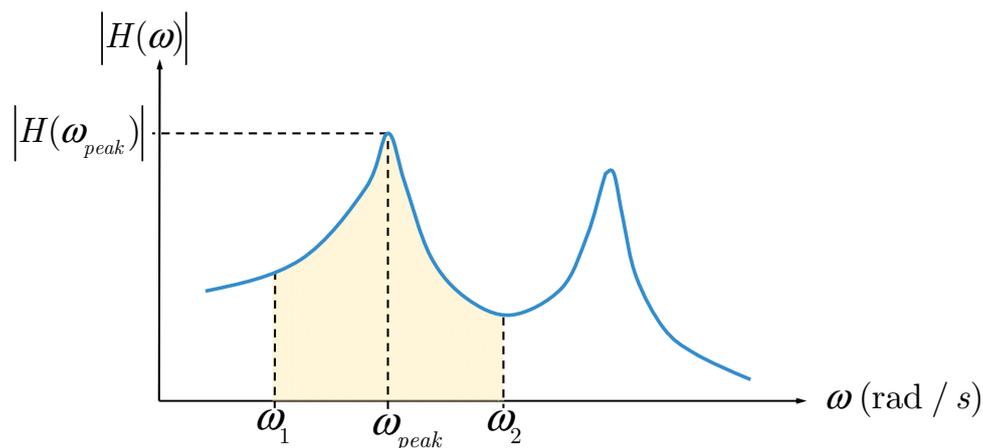


Fig. 4.30. Representació gràfica de les característiques en el domini freqüencial.

Característiques no lineals.

A continuació es descriuen de forma detallada les 3 característiques freqüencials que s'han calculat per la detecció d'anomalies en el senyal del teixit cardíac. Aquestes mesures tenen el seu origen en la caracterització de sistemes no lineals i la teoria del Caos.

El primer pas en càlcul de característiques no lineals és reconstrucció en l'espai de fases (*phase space*) del senyal $x(t) = (x_1(t), x_2(t), \dots, x_N(t))$ que conté N punts, s'ha de generar una reconstrucció en l'espai de fases, $X = [x(t), x(t+\tau), x(t+2\tau), \dots, x(t+m\tau)]$, amb una dimensió d'incrustació (*embedding dimension*) m i retard d'incrustació (*embedding lag*) τ (Takens. 1980, Sauer et al. 1991).

En senyals experimentals amb soroll és clau l'elecció del paràmetre del retard d'incrustació, τ , per obtenir una bona reconstrucció. Si el paràmetre del retard d'incrustació, τ , és massa petit, no es poden distingir dos components successius del vector de retard. D'altra banda, si el retard d'incrustació, τ , és massa gran, els elements successius del vector de retard són aproximadament independents i, per tant, es perden totes les dependències necessàries per reconstruir l'atractor.

El retard d'incrustació, τ , es pot estimar pel primer pas per zero de la funció d'autocorrelació entre $x(t)$ i $x(t+\tau)$ (Liebert and Schuster. 1989, Liebert et al. 1991). Però, aquest mètode té com inconvenient que només es tenen en compte les correlacions lineals (Deco and Schürmann. 2001). Per tant, una millor opció es basa en detectar un retard tal que la dependència estadística entre $x(t)$ i $x(t+\tau)$ mesuri la informació mútua (MI): $I(x(t), x(t+\tau))$ i tingui el seu primer mínim local (Fraser and Swinney. 1986). Amb aquest mètode sí que es tenen en compte les interaccions no lineals. En el nostre cas s'ha utilitzat el mètode

basat en la informació mútua. El càlcul de la informació mútua es realitza a través d'un histograma, per tant aquest mètode no és fiable per a senyals temporals sorollosos o curts.

17) Exponents de Lyapunov (*Lyapunov exponents*).

L'exponent de Lyapunov d'un senyal x , mesura la taxa mitjana de separació (velocitat de separació) de trajectòries infinitesimalment properes en l'espai de fases (*phase space*) (veure Fig. 4.31). (Strogatz. 2015, Deco and Obradovic. 1997). Quantitativament, dues trajectòries a l'espai de fases amb separació inicial $\delta(0)$ divergeixen seguint l'expressió linealitzada (Danílov. 2006, Deco and Schürmann. 2001):

$$|\delta(t)| \approx e^{\lambda t} \cdot |\delta(0)| \quad (4.30)$$

On

$\delta(0)$ és la separació inicial.

$\delta(t)$ és la separació a l'instant t .

λ és l'exponent de Lyapunov.

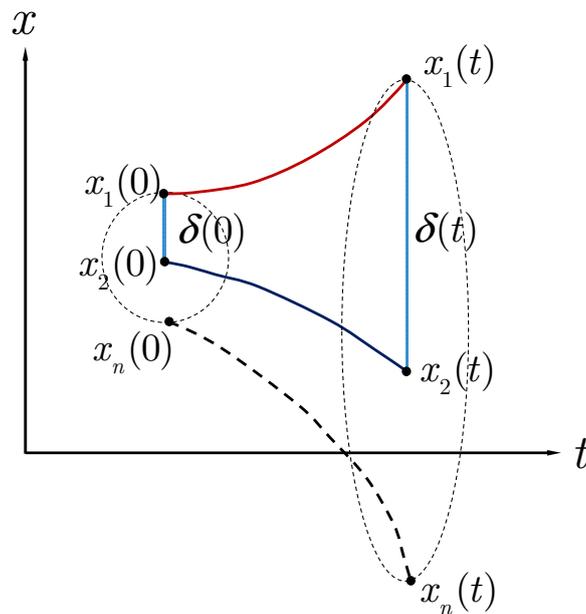


Fig. 4.31. Representació de l'exponent de Lyapunov en l'espai de fases.

L'exponent Lyapunov es pot definir de la següent manera (Deco and Schürmann. 2001, Wolf et al. 1985):

$$\lambda_i = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \ln \left(\frac{|\delta_i(t)|}{|\delta_i(0)|} \right) \quad (4.31)$$

A més sabem que $\delta(0) = |x_2(0) - x_1(0)| \approx 0$ i també que $\delta(t) = |x_2(t) - x_1(t)|$.

Pel càlcul numèric de l'exponent Lyapunov es segueixen els següents passos:

a) Reconstrucció en l'espai de fases. A partir del senyal $x(t) = (x_1(t), x_2(t), \dots, x_N(t))$ s'ha de generar una reconstrucció en l'espai de fases, $X = [x(t), x(t+\tau), x(t+2\tau), \dots, x(t+m\tau)]$, amb una dimensió d'incrustació, m , i retard d'incrustació, τ , que tindrà la següent dimensió: $n \times m$. On $n = N - (m-1) \cdot \tau$, i N és el número de punts del senyal x . Es defineix el rang d'expansió (*expansion range*), K , els valors compresos K_{\max} entre K_{\min} , llavors es crea el nou senyal $X = X(1:Np)$ que només s'avalua en $Np = N - K_{\max}$. En el nostre cas s'ha definit els valors del rang d'expansió $K_{\min} = 1$ i $K_{\max} = 5$.

b) Cerca de punts més pròxims. Per cada mostra i es busca el punt veí més proper i^* que compleixi que $|Y(i) - Y(i^*)| > MinSep$, on *MinSep* és una separació mínima imposada.

c) Càlcul dels exponents de Lyapunov. Es calcula l'exponent de Lyapunov per a cada punt mostra i , com segueix (Rosenstein et al. 1993):

$$\lambda_i = \frac{1}{N_p \cdot dt} \cdot \sum_{K=K_{\min}}^{K_{\max}} \ln \left(\frac{|X(i+K) - X(i^*+K)|}{|X(i) - X(i^*)|} \right) \quad (4.32)$$

On

dt és el període de mostreig del senyal x .

d) Càlcul de l'exponent màxim de Lyapunov. Finalment es calcula la dimensió del màxim, λ_{\max} , valor dels exponents de Lyapunov com el pendent dels exponents de Lyapunov, λ_i , versus en rang d'expansió, K , en escala logarítmica.

$$\lambda_{\max} = \frac{d \log_{10}(\lambda_i)}{d \log_{10}(K)} \quad (4.33)$$

De manera numèrica, per obtenir el màxim, λ_{\max} , valor dels exponents de Lyapunov es realitza un ajust lineal de la manera següent: $\lambda_{\max} = \text{polyfit}([K_{\min}, K_{\max}], \lambda_i)$.

L'exponent de Lyapunov és útil per detectar possibles anomalies del senyal i també es pot utilitzar per quantificar el nivell de caos en un sistema (Deco and

Schürmann. 2001, McCue et al. 2011, Caesarendra et al. 2013), de la manera següent:

- Sistema estable (non-conservatiu): $\lambda_i < 0$
- Estabilitat de Lyapunov (conservatiu): $\lambda_i = 0$
- Sistema caòtic: $\lambda_i > 0$
- Soroll: $\lambda_i = \infty$

18) L'entropia aproximada (*Approximate Entropy*).

L'entropia aproximada, *ApEn*, mesura no lineal de la regularitat i la imprevisibilitat de fluctuacions en un senyal x (Pincus. 1991, Ryan et al. 1997). Una sèrie temporal que conté molts patrons repetitius té un entropia aproximada relativament petita mentre que un procés menys predictable, és a dir, més complex, té un entropia aproximada més alta (Pincus and Goldberger 1994, Ho et al. 1997).

Pel càlcul numèric de l'entropia aproximada, *ApEn*, es segueixen els següents passos:

a) Reconstrucció en l'espai de fases. A partir del senyal $x(t)=(x_1(t), x_2(t), \dots, x_N(t))$ que conté N punts, s'ha de generar una reconstrucció en l'espai de fases, $X=[x(t), x(t+\tau), x(t+2\tau), \dots, x(t+m\tau)]$, amb una dimensió d'incrustació (*embedding dimension*) m i retard (*lag*) τ que tindrà la següent dimensió: $n \times m$. On $n=N-(m-1) \cdot \tau$, i N és el número de punts del senyal x .

b) Càlcul de la semblança. Es calcula el nombre de distàncies que són més petites que R :

$$C_i(r) = \frac{1}{N - m + 1} \cdot \text{num} \left\{ |X(i) - X(j)| \leq R \right\} \quad (4.34)$$

On

R és el radi de semblança (*radius of similarity*).

En el nostre cas el radi, R , s'ha calculat com $r = 0.2 \cdot \text{sqrt}(\text{trace}(\text{cov}(x)))$.

c) Càlcul de la semblança. Es defineix la semblança, $\Phi_m(r)$, com:

$$\Phi_m(r) = \frac{1}{N - m + 1} \cdot \sum_{i=1}^{N-m+1} \log(C_i(r)) \quad (4.35)$$

d) Càlcul de l'entropia aproximada. Finalment, es calcula l'entropia aproximada, $ApEn$, es calcula llavors com:

$$ApEn = \Phi_m(r) - \Phi_{m+1}(r) \quad (4.36)$$

19) Dimensió de correlació (*Correlation Dimension*).

La dimensió de correlació, D_2 , mesura de la complexitat d'un senyal x . Va ser introduïda per primer cop per Grassberger i Procaccia ([Grassberger and Procaccia. 1983](#)).

Pel càlcul numèric de la dimensió de correlació, D_2 , es segueixen els següents passos:

a) Reconstrucció en l'espai de fases. A partir del senyal $x(t)=(x_1(t), x_2(t), \dots, x_N(t))$ que conté N punts, s'ha de generar una reconstrucció en l'espai de fases, $X=[x(t), x(t+\tau), x(t+2\tau), \dots, x(t+m\tau)]$, amb una dimensió d'incrustació (*embedding dimension*) m i retard (*lag*) τ que tindrà la següent dimensió: $n \times m$. On $n=N-(m-1) \cdot \tau$, i N és el número de punts del senyal x .

b) Càlcul de la suma de correlació. Es calcula com ([Theiler. 1987](#)):

$$C(\epsilon) = \frac{2}{N \cdot (N - 1)} \cdot \text{num} \left\{ |X(i) - X(j)| \leq \epsilon \right\} \quad (4.37)$$

On

ϵ és el radi de semblança (*radius of similarity*).

La suma de correlació calcula els parells (X_i, X_j) els quals la seva distància és més petita que ϵ . El radi de semblança es defineix entre ϵ_{\min} i ϵ_{\max} . En el nostre cas el radi mínim de semblança, ϵ_{\min} , s'ha agafat un valor 1000 i en el radi màxim de semblança, ϵ_{\max} , s'ha calculat mitjançant: $\epsilon_{\max} = 0.2 \cdot \text{sqrt}(\text{trace}(\text{cov}(x)))$. El nombre de punts calculats entre ϵ_{\min} i ϵ_{\max} s'ha definit de valor igual a 10 punts.

c) Càlcul de dimensió de correlació. Finalment es calcula dimensió de correlació, D_2 , com el pendent de la suma de correlació, $C(\epsilon)$ versus el radi de semblança, ϵ , en escala logarítmica.

$$D_2 = \frac{\partial \log_{10}(C(\epsilon))}{\partial \log_{10}(\epsilon)} \quad (4.38)$$

S'espera que $C(\varepsilon)$ en segueixi una llei de potència (*power law*) tal que $C(\varepsilon) \propto \varepsilon^{D_2}$. De manera numèrica, per obtenir la dimensió de correlació, D_2 , es realitza un ajust lineal de la manera següent: $D_2 = \text{polyfit}([\varepsilon_{\min} \ \varepsilon_{\max}], C(\varepsilon))$.

4.4.2.2 Classificador basat en aprenentatge profund

S'han implementat dos classificadors basats en aprenentatge profund (*Deep Learning*) que utilitzen una estructura de xarxa neuronal recurrent (*Recurrent Neural Network*, RNN) del tipus xarxes de memòria a llarg termini (*Long short-term memory*, LSTM): Classificador basat en xarxa LSTM i el senyal (C.2) i classificador basat en xarxa LSTM i extracció de característiques (C.3) (veure Fig. 4.22). Per tant, utilitzarem xarxes LSTM per construir un model predictiu que pugui classificar els senyals mecànics en una d'aquestes dues categories diferents: senyal normal o anòmal. Disposem de 100 senyals a la classe normal i de 700 senyals a la classe anòmal ($N=800$). Cada senyal té 100000 mostres de llargada.

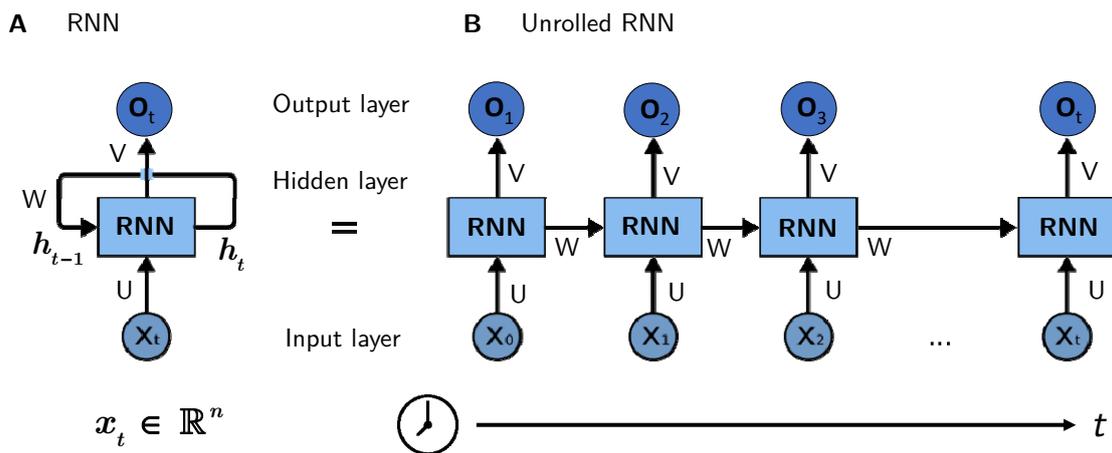


Figura. 4.32. **A.** Xarxa neuronal Recurrent (RNN). **B.** Xarxa neuronal Recurrent desplegada (RNN).

Una xarxa neuronal recurrent (RNN) és una estructura de xarxa d'aprenentatge profund que utilitza informació d'estats anteriors per tal de millorar el rendiment de la xarxa. L'estructura de les RNN conté una capa d'entrada, x_t , un estat ocult, h_t , i una capa de sortida, o_t . El que fa especial les RNN és que la informació de l'estat ocult actual es realimenta, en tant que esdevé l'entrada de l'estat ocult següent. Aquesta estructura realimentada és el que ens permet treballar amb seqüències de dades. Per tant, una cel·la d'una xarxa recurrent és un element amb memòria, ja que la seva sortida depèn dels estats anteriors i actuals de les capes ocultes i de l'entrada (veure Fig. 4.32).

Mentre que en una xarxa neuronal convencional, la sortida depèn només de l'entrada actual, x_t . De manera general, la sortida d'una cel·la RNN es pot expressar amb la següent funció de recurrència:

$$h_t = f(h_{t-1}, x_t) \tag{4.39}$$

On

h_t és el nou estat de la capa oculta.

h_{t-1} és l'estat anterior de la capa oculta.

x_t és l'entrada actual.

L'entrada, x_t , d'una RNN és una seqüència de qualsevol longitud, i en el nostre cas correspon a la senyal de contracció mecànica del teixit cardíac.

Desenrotllant una cel·la d'una RNN (veure Fig. 4.32), s'aprecia com la informació es mou per la xarxa amb una seqüència de dades. Notem que cada node representa una capa de neurones en un pas de temps.

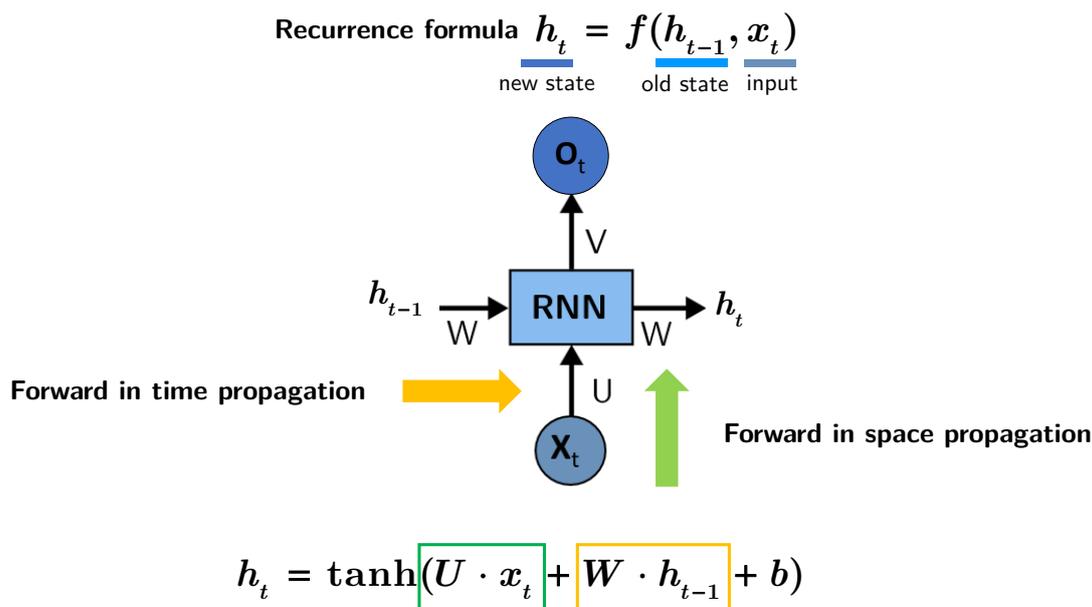


Figura. 4.33. Propagació de les dades en la xarxa neuronal Recurrent, RNN.

Es veu com l'estat ocult passa al següent pas de temps. Durant l'entrenament, la xarxa aprèn pesos tant per a les entrades com per a l'estat ocult. Així es determina quina proporció d'informació actual o passada s'utilitza en l'entrada de la cel·la actual. L'estructura única de les xarxes recurrents neuronals, RNN, permet una propagació de les dades cap endavant (*forward propagation*) en el temps i també en l'espai (veure Fig. 4.33). A la pràctica, les xarxes neuronals

recurrents simples (*vanilla RNN*) experimenten un problema amb l'aprenentatge de dependències a llarg termini.

Les xarxes RNN s'entrenen habitualment mitjançant la retropropagació (*backpropagation*), on poden experimentar el problema del gradient d'esvaïment (*vanishing gradient*). Aquests problemes fan que els pesos de la xarxa esdevinguin molt petits o molt grans, limitant l'efectivitat de l'aprenentatge de les relacions a llarg termini. Per tal d'evitar aquest problema s'ha utilitzat un tipus especial de xarxa neuronal recurrent que és la xarxa de memòria a curt termini (LSTM), introduïda l'any 1997 per Hochreiter and Schmidhuber (Hochreiter and Schmidhuber. 1977). En la Fig. 4.34 es compara una cel·la recurrent simple (*vanilla RNN*) amb una cel·la LSTM simple (*vanilla LSTM*). A més, les cel·les LSTM són capaces d'aprendre dependències a llarg termini.

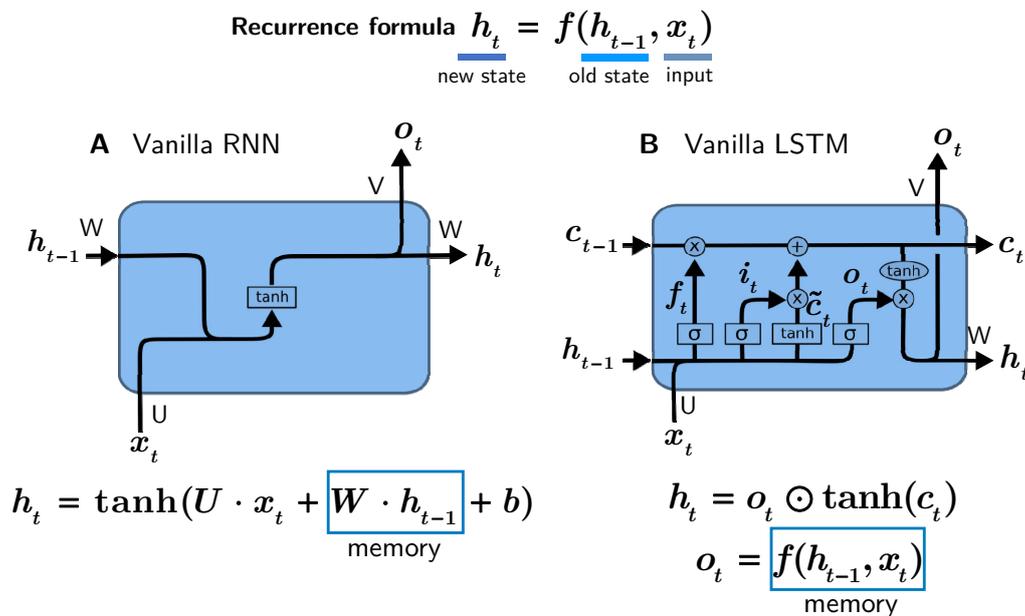


Figura. 4.34. Comparativa entre una cel·la recurrent simple (*vanilla RNN*) amb una xarxa LSTM simple (*vanilla LSTM*).

La sortida d'una cel·la recurrent simple (*vanilla RNN*) queda descrita per la següent funció de recurrència:

$$h_t = \tanh(U \cdot x_t + W \cdot h_{t-1} + b) \quad (4.40)$$

On

h_t és el nou estat de la capa oculta.

h_{t-1} és l'estat anterior de la capa oculta.

x_t és l'entrada actual.

l'estat ocult (*hidden state*), h_t . (Veure Fig. 4.35). A més el candidat a la cel·la d'estat (*cell state candidate*), afegeix informació a la cel·la d'estat, c_t .

En la Taula 4.5 es resumeixen les equacions de govern d'una cel·la de la xarxa LSTM (Hochreiter et al. 1997).

Component	Funció
Hidden state	$h_t = o_t \odot \tanh(c_t)$
Cell state	$c_t = f_t \odot c_{t-1} + i_t \odot \tilde{c}_t$
Cell state candidate	$\tilde{c}_t = \tanh(U_c \cdot x_t + W_c \cdot h_{t-1} + b_c)$
Input gate	$i_t = \sigma(U_i \cdot x_t + W_i \cdot h_{t-1} + b_i)$
Forget gate	$f_t = \sigma(U_f \cdot x_t + W_f \cdot h_{t-1} + b_f)$
Output gate	$o_t = \sigma(U_o \cdot x_t + W_o \cdot h_{t-1} + b_o)$

Taula. 4.5. Equacions de govern d'una cel·la LSTM.

La notació sigma, σ , indica que la funció d'activació que s'utilitza en la cel·la LSTM és una funció d'activació sigmoide de la forma:

$$f(x_t) = \text{sigm}(x_t) = \sigma(x_t) = \frac{1}{1 + e^{-x_t}} \quad (4.42)$$

On

x_t és l'entrada.

I pel que fa a la funció d'activació de la tangent hiperbòlica, pren la forma:

$$f(x_t) = \tanh(x_t) = \frac{e^{x_t} - e^{-x_t}}{e^{x_t} + e^{-x_t}} \quad (4.43)$$

On

x_t és l'entrada.

En una cel·la vainilla LSTM, la funció sigmoide s'utilitza com a funció d'activació principal per a la porta d'entrada, la porta de sortida i la porta d'oblit. Perquè produeix un valor entre 0 i 1, i deixa fluir o bloqueja la informació a través de les portes. A més, per superar el problema del gradient de desaparició, causat per la derivada de la funció d'activació que en els mètodes de descens del gradient és molt propera a zero. Així, necessitem una

funció que la segona derivada es pugui mantenir durant molt de temps abans de tendir a zero. Aleshores, a la fórmula de recurrència de l'estat candidat, la funció tangent hiperbòlica (*tanh*) assegura que els valors de la porta s'encallin entre -1 i 1, augmentant així l'estabilitat durant el descens del gradient.

Per les funcions d'activació de la nostra xarxa neuronal, s'han utilitzat unitats RELU, que no tenen zones de saturació, a diferència d'altres funcions d'activació com la tangent hiperbòlica, *tanh*, on els límits de saturació són -1 i 1 o la funció d'activació sigmoïdal, *sigm*, on els límits de saturació són 0 i 1.

Aquestes zones de saturació fan que a la sortida de funció d'activació, durant algunes fases del procés d'entrenament de la xarxa, els valors no canviïn significativament, en tant que el gradient no canvia i que per tant els paràmetres de la xarxa que s'actualitzen usant el gradient descendent no pateixin canvis apreciables, provocant un estancament en el procés d'entrenament. A més la RELU a part de no posseir regions de saturació i evitar l'estancament durant l'entrenament, tampoc afegeix complexitat a la xarxa neuronal. La funció d'activació RELU es descriu de la següent manera:

$$f(x_t) = \max(0, x_t) \quad (4.44)$$

On x_t és l'entrada.

4.4.2.2.1 Arquitectura del classificador

La xarxa d'aprenentatge profund implementada per la classificació del senyals de contracció normals o anòmales segueix l'estructura mostrada a la [Figura 4.37](#) amb 7 capes i 6 connexions.

Els paràmetres que defineixen la xarxa LSTM emprada per la tasca de classificació es resumeixen a la [Taula 4.6](#). La definició dels millors hiperparàmetres s'aconsegueix mitjançant un estudi empíric.

Layer name	Type	Activations	Lernables	States
1 Input	Sequence input	1	-	-
2 LSTM 1	LSTM	15	Input weights: 60x1 Recurrent weights: 60x15 Bias: 60x1	Hidden states: 15x1 Cell states: 15x1
3 RELU 1	RELU	15	-	-
4 LSTM 2	LSTM	15	Input weights: 60x15 Recurrent weights: 60x15 Bias: 60x1	Hidden states: 15x1 Cell states: 15x1

5 RELU 2	RELU	15	-	-
6 Fully Connected	FC	1	Weights: 1x15 Bias: 1x1	-
7 Regression Layer	RL	1	Mean Squared Error	-

Taula 4.6. Paràmetres de la xarxa LSTM utilitzada per la tasca de classificació dels senyals de contracció mecànica del teixit cardíac en les classes normal o anòmla.

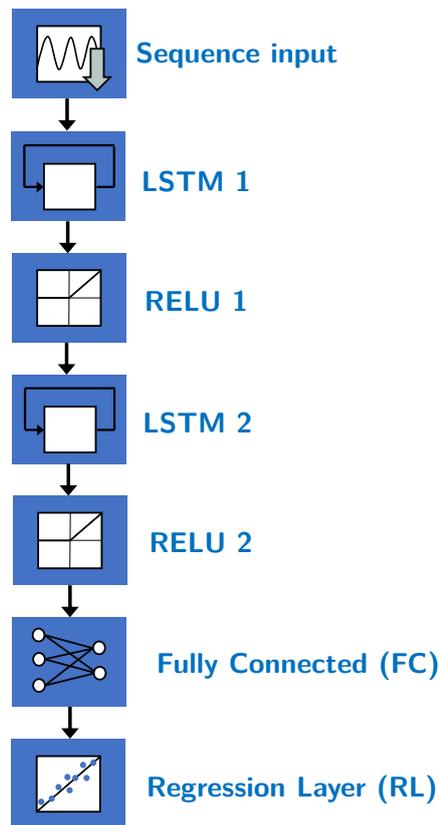


Figura. 4.36. Xarxa de memòria a curt termini (LSTM) utilitzada per la classificació d'anomalies.

Existeixen moltes funcions pèrdua (*Loss function*), però en el nostre cas al tractar-se de valors reals, la funció de pèrdua s'ha definit com una funció d'error quadràtic mitjà (*mean-squared-error*, MSE), que calcula l'error entre les prediccions de la xarxa i els valors objectius per a la tasca de regressió:

$$J(W) = \frac{1}{N} \cdot \sum_{t=1}^N (y_t - \tilde{y}_t)^2 \quad (4.45)$$

On

y_t són les dades reals (*ground truth*). Dimensió: $mx1$.

\tilde{y}_t (\sim) és el valor a la sortida de la xarxa neuronal. Dimensió: $mx1$.

Un cop definida la funció de pèrdua, podem entrenar la xarxa neuronal que no és res més que minimitzar la funció de pèrdua (*loss function*):

$$\operatorname{argmin}_W \{J(W)\} \quad (4.46)$$

El gradient de la funció de pèrdua es defineix com:

$$\nabla J(W) = \frac{\partial J(W)}{\partial W} \quad (4.47)$$

Numèricament s'utilitzen optimitzadors (*optimizers*) que minimitzen la funció de pèrdua mitjançant iteracions successives, l , que parteixen d'un valor inicial aleatori (veure Fig. 4.38). La formulació clàssica de l'actualització d'una iteració amb el mètode de descens de gradient (*Gradient Descent*, GD), és:

$$W_{l+1} = W_l - \alpha \cdot \nabla J(W_l) \quad (4.48)$$

On

W_l és vector de pesos en l'estat actual.

W_{l+1} és vector de pesos en el següent estat.

∇J és el gradient de la funció de pèrdues.

α és la taxa d'aprenentatge (*learning rate*).

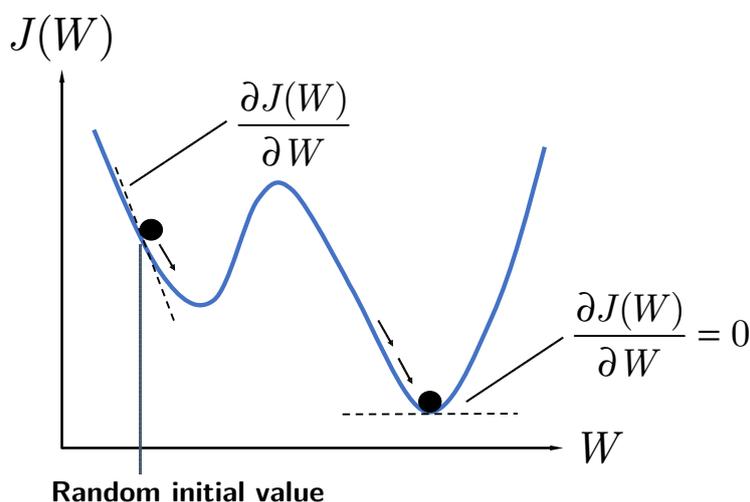


Figura. 4.37. Minimització de la funció pèrdua (*loss function*).

Així, els pesos de la xarxa, W , s'actualitzen a la següent iteració, W_{l+1} , utilitzant el valor dels pesos de la iteració actual, W_l . Òbviament cal definir un criteri d'aturada (*stop criterion*), és comú establir un llindar basat en gradient $\nabla J(W_l)$,

que s'aturi quan el gradient sigui molt petit. En l'actualització dels pesos en el mètode de descens de gradient clàssic (SG), el gradient de la funció de pèrdua, $\nabla J(W_i)$, s'avalua utilitzant tot el conjunt de les dades d'entrenament alhora. Per contra, el mètode de descens del gradient estocàstic (*Stochastic Gradient Descent*, SGD), avalua el gradient de la funció de pèrdua, $\nabla J(W_i)$, mitjançant un subconjunt de les dades d'entrenament, per tant s'accelera el procés d'optimització. A cada iteració s'utilitza un subconjunt diferent seleccionat de manera aleatòria, anomenat mini-lot (*mini-batch*). La passada completa de l'algoritme d'entrenament a tot el conjunt de dades d'entrenament utilitzant mini-lots s'anomena època (*epoch*). S'anomena estocàstic perquè les actualitzacions dels pesos, W , calculades mitjançant un mini-lot són una estimació sorollosa vers l'actualització que resultaria d'utilitzar el conjunt complet de les dades d'entrenament.

A més, en el mètode clàssic de descens del gradient estocàstic (SGD) es poden produir oscil·lacions en el recorregut descendent fins a la convergència de l'algoritme. Per això, alternativament s'utilitza el mètode de descens de gradient estocàstic amb moment (*stochastic gradient descent with momentum*, SGDM), on aquestes oscil·lacions es poden reduir de forma eficaç afegint un paràmetre de moment (Murphy, 2012). Com que es redueixen les oscil·lacions s'arriba més ràpid al mínim i el temps de convergència del mètode de SGDM és més ràpid. La formulació de l'actualització d'una iteració amb el mètode de descens de gradient estocàstic amb moment (SGDM) ve donada per:

$$W_{l+1} = W_l - \alpha \cdot \nabla J(W_l) + \gamma \cdot (W_l - W_{l-1}) \quad (4.49)$$

On

W_l és vector de pesos en l'estat actual.

W_{l+1} és vector de pesos en el següent estat.

W_{l-1} és vector de pesos en l'estat anterior.

∇J és el gradient de la funció de pèrdues.

α és la taxa d'aprenentatge (*learning rate*).

En la fórmula anterior es pot observar com el paràmetre de moment, γ , determina la contribució del pes anterior, W_{l-1} , al pes de la iteració actual, W_l .

Una idea intuïtiva de com afecta el moment en la convergència de l'algorisme, pot ser la següent: si fem el símil que la funció a minimitzar és una muntanya on volem trobar la seva vall. Si fem rodar una bola turó avall, per a cada època (*epoch*), la bola roda més ràpid cap als mínims locals en la següent interacció. Això ens fa més propensos a assolir uns mínims locals, o potser mínims globals, millors del que podríem aconseguir amb el mètode del SGD clàssic. La funció real no es un terreny llis, té obstacles i formes estranyes i llavors la bola que llisca turó avall pot quedar atrapada en un mínim local. I seguint amb el símil de la bola, per treure la bola d'aquesta situació d'encallament cal afegir-li un moment rotor a la bola perquè pugui sortir de la situació d'encallament i seguir rodolant turó avall fins a trobar el mínim global.

Però, en el nostre cas, per l'entrenament de la xarxa s'ha utilitzat l'algorisme Adam (*adaptive moment estimation*), que és un mètode de descens de gradient estocàstic que es basa en l'estimació adaptativa de les taxes d'aprenentatge (*adaptive learning rate*) dels moments de primer, m_l , i segon ordre, v_l per a millorar encara més el temps de convergència (Kingma. et al. 2014). Computacionalment, és un mètode molt eficient, ja que utilitza poca memòria, i per tant, és molt adequat per a problemes amb una gran quantitat de dades. Els mètodes de descens de gradient utilitzen una única taxa d'aprenentatge per a tots els paràmetres. En canvi, el mètode Adam pretén millorar l'entrenament de la xarxa mitjançant l'ús de taxes d'aprenentatge adaptatives que es puguin adaptar automàticament a la funció de pèrdua que s'està optimitzant. En l'actualització d'una interacció amb el mètode Adam s'utilitza una mitjana mòbil (*moving average*) com:

$$W_{l+1} = W_l - \frac{\alpha \cdot \hat{m}_l}{\sqrt{\hat{v}_l + \epsilon}}$$

$$\hat{m}_l = \frac{m_l}{(1 - \beta_1^l)} \quad m_l = \beta_1 \cdot m_{l-1} + (1 - \beta_1) \cdot \nabla J(W_l) \quad (4.50)$$

$$\hat{v}_l = \frac{v_l}{(1 - \beta_2^l)} \quad v_l = \beta_2 \cdot v_{l-1} + (1 - \beta_2) \cdot [\nabla J(W_l)]^2$$

On

m_l és el moment de primer ordre en l'estat actual.

v_l és el moment de segon ordre en l'estat actual.

W_l és vector de pesos en l'estat actual.

W_{l+1} és vector de pesos en el següent estat.

- W_{l-1} és vector de pesos en l'estat anterior.
- ∇J és el gradient de la funció de pèrdues.
- β_1 és la taxa de decaïment exponencial del primer moment.
- β_2 és la taxa de decaïment exponencial del segon moment.

L'actualització dels pesos amb la mitjana mòbil permet que si els gradients contenen majoritàriament soroll, la mitjana mòbil del gradient es fa més petita i, per tant, les actualitzacions dels pesos també es fan més petites. Els moments indicats amb el símbol ($\hat{}$), són els moments amb el biaix (*bias*) corregit que apareix al començament de l'entrenament. Una idea intuïtiva de què significa la taxa d'aprenentatge adaptatiu és semblant a quan juguem a golf que es comença colpejant la pilota amb passos grans i acabem amb passos petits, per refinar l'encert de la pilota dins del forat, és dir, la convergència de l'algorisme al seu mínim. D'aquesta manera se'ns permet avançar més ràpid inicialment i a mesura que la taxa d'aprenentatge disminueix, fem passos cada cop més petits, que ens permeten convergir més ràpidament, ja que no es supera el mínim local amb passos grans.

A continuació es descriuen els paràmetres que s'han utilitzat per l'entrenament de la xarxa neuronal completa. El nombre màxim d'èpoques, *MaxEpochs*, s'ha definit a 30 *epochs*. I la mida del mini-lot, *MiniBatchSize*, s'ha definit en 10. Amb l'opció de barrejar, *Shuffle*, les dades d'entrenament s'han barrejat una vegada. Pel que fa a la taxa d'aprenentatge inicial, *InitialLearnRate*, s'ha definit a $\alpha_0 = 0.001$.

El regularitzador permet aplicar penalitzacions als paràmetres de la capa durant l'optimització. Aquestes penalitzacions es sumen a la funció de pèrdua que optimitza la xarxa. En el nostre cas s'ha utilitzat un regularitzador que aplica una penalització de regularització L_2 . Així, el factor per a la regularització L_2 , *L2Regularization*, s'ha definit a $L_2 = 0.0001$. A més, afegir un terme de regularització per als pesos a la funció de pèrdua, $J(W)$, és una manera de reduir el sobreajust (*overfitting*) (Bishop. 2006, Murphy. 2012). Llavors, la nova funció de pèrdues després de la regularització L_2 , s'expressa com:

$$J_{L_2}(W_l) = J(W_l) + L_2 \cdot W^2 \quad (4.51)$$

On

- $J_{L_2}(W)$ és la funció de pèrdues amb regularització L_2 .
- W és el vector de pesos en l'estat actual.
- L_2 és la penalització de regularització L_2 .

Tots els paràmetres utilitzats en les opcions d'entrenament (*training options*) de la nostra xarxa neuronal de classificació d'anomalies del senyal mecànic del teixit cardíac es resumeixen a la [Taula 4.7](#).

Descripció	Paràmetre	Valor
Algoritme d'optimització	<i>solverName</i>	Adam
Taxa del primer moment	<i>GradientDecayFactor</i>	$\beta_1= 0.9$
Taxa del segon moment	<i>SquaredGradientDecayFactor</i>	$\beta_2= 0.999$
Epsilon	<i>Epsilon</i>	$\epsilon= 1 \cdot 10^{-8}$
Nombre màxim d'èpoques	<i>MaxEpochs</i>	8000
Mida del mini-lot	<i>MiniBatchSize</i>	300
Barrejar les dades	<i>Shuffle</i>	once
Taxa d'aprenentatge inicial	<i>InitialLearnRate</i>	$\alpha_0= 0.001$
Factor per a la regularització L_2	<i>L2Regularization</i>	$L_2= 0.0001$

Taula 4.7. Paràmetres d'entrenament de la xarxa neuronal LSTM per la classificació d'anomalies del senyal mecànic del teixit cardíac.

LSTM i el senyal original (C.2).

Un dels avantatges de l'aprenentatge profund, *Deep Learning*, és que pot utilitzar la mateixa estructura per a l'extracció de característiques i també per la classificació, així que s'ha utilitzat com a classificador la xarxa neuronal LSTM descrita a la [Taula 4.11](#), però que utilitza directament com a entrada el propi senyal brut (*raw*) de contracció mecànica, no essent pas necessària l'extracció de característiques. Tot i que aquest enfocament senzill d'alimentar els senyals mecànics del teixit cardíac directament a la xarxa LSTM pot funcionar, pot ser que no funcioni si per exemple, per detectar el patró d'una anomalia fa falta una mostra de senyal llarga, ja que només mirar trossos més curts de senyal no aportarà informació per la detecció. A continuació es descriuen de forma detallada els passos que s'han seguit per a la creació del classificador basat en la xarxa neuronal LSTM i les dades brutes (*raw*).

a) Creació de les dades de test i d'entrenament

Primer de tot, a partir de la base de dades sintètiques (*synthetic dataset*) assignem que un 70% de les dades actui com a dades d'entrenament (*training data*), mentre que el 30% restant actua com a dades de validació o test (*validation or test data*).

b) Normalització de les dades

Després es normalitzen les dades: es centren i s'estandaritzen amb la transformació z-score.

c) Creació de la matriu de subseqüències

Tot seguit, cal obtenir subseqüències del senyals normalitzat per el conjunt de dades de les categories normals i anòmales (veure [Figura 4.38](#)). Per a la creació de les subseqüències del senyal, s'ha definit el nombre de finestres, K , com:

$$K = N - W \quad (4.52)$$

On

K és el nombre de finestres.

N la gambada entre finestres en mostres (*stride*).

W és la dimensió de la finestra en mostres (*window size*).

Les subseqüències s'organitzen en una matriu, X , de dimensió $W \times K$ amb la següent forma:

$$X = \begin{bmatrix} x(1) & x(1+S) & x(1+2 \cdot S) & \dots & x(1+K \cdot S) \\ x(2) & x(2+S) & x(2+2 \cdot S) & \dots & x(2+K \cdot S) \\ x(3) & x(3+S) & x(3+2 \cdot S) & \dots & x(3+K \cdot S) \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots \\ x(W) & x(W+S) & x(W+2 \cdot S) & \dots & x(W+K \cdot S) \end{bmatrix} \quad (4.53)$$

On

x és el senyal normalitzat amb N mostres. Dimensió: $1 \times N$.

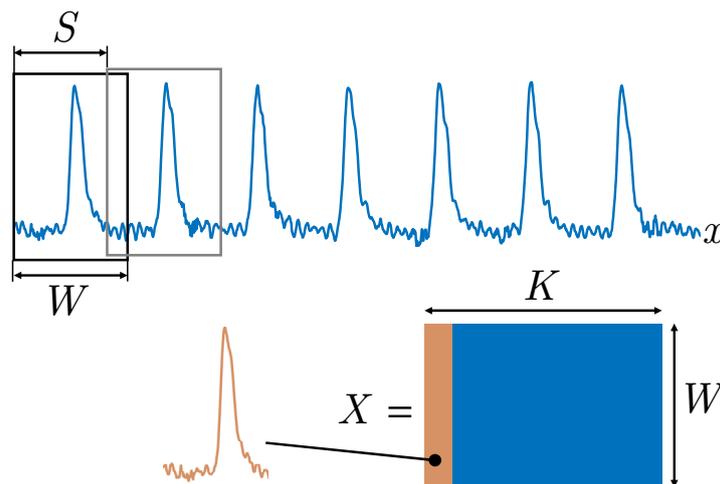


Figura. 4.38. Creació de la matriu de subseqüències, X , a partir de la sèrie temporal, x , del senyal de contracció.

En el nostre cas s'ha utilitzat la gambada entre finestres (*stride*) de valor $N=10$ mostres i la dimensió de la finestra (*window size*) de $W=300$ mostres.

d) Entrenament amb les dades normals

Després, entrenem la xarxa LSTM amb les subseqüències de les dades d'entrenament (*training*) de la categoria del senyal normal.

e) Reconstrucció amb les dades de test

Seguidament, agafem les dades de validació o test (*validation or test data*), amb les corresponents subseqüències i fem servir el model entrenat del senyal normal per reconstruir el senyal.

f) Càlcul de l'error

Després, calculem l'error quadràtic (*squared-error*, SE) entre el senyal d'entrada x , abans de la creació de la matriu de subseqüències, i el senyal reconstruït y (LSTM *output*).

g) Classificació

Finalment, si l'error llindar (*Threshold*) quan la mitjana de l'error de totes les subseqüències sigui més gran que 0.5, llavors el senyal es classifica com a la categoria anòmala.

LSTM i extracció de característiques (C.3).

En aquest classificador les característiques (*features*) constitueixen directament l'entrada de la xarxa LSTM de la [Taula 4.11](#). Com hem mencionat abans, disposem de dues categories de dades sintètiques: senyal normal i senyal anòmala. Però, el classificador LSTM només ha estat entrenat amb les característiques (temporals, freqüencials i no lineals) del senyal de la categoria normal. Aquestes característiques constitueixen les entrades (*inputs*) de la xarxa LSTM. A continuació es descriuen de forma detallada els passos que s'han seguit per a la creació del classificador basat en la xarxa neuronal LSTM i l'extracció de característiques.

a) Creació de les dades de test i d'entrenament

Primer de tot, a partir de la base de dades sintètiques (*synthetic dataset*) assignem que un 70% de les dades actui com a dades d'entrenament (*training data*), mentre que el 30% restant actua com a dades de validació o test (*validation or test data*).

b) Normalització de les dades

Després, es normalitzen les dades: es centren i s'estandarditzen amb la transformació z-score.

c) Extracció de les característiques

Tot seguit, entrenem la xarxa LSTM amb les característiques temporals amb les dades d'entrenament (*training*) de la categoria del senyal normal.

d) Entrenament amb les dades normals

Després, entrenem la xarxa LSTM amb les característiques de les dades d'entrenament (*training*) de la categoria del senyal normal.

e) Reconstrucció amb les dades de test

Seguidament, agafem les dades de validació o test (*validation or test data*), i fem servir el model entrenat del senyal normal per reconstruir el senyal.

f) Càlcul de l'error

Després, calculem l'error quadràtic (*squared-error*, SE) entre les característiques del senyal d'entrada x (LSTM *input*) i el senyal reconstruït y (LSTM *output*).

$$E(n) = \sqrt{\sum_{n=1}^N (y_n - x_n)^2} \quad (4.54)$$

On

x_n és el vector de les característiques del senyal d'entrada a la xarxa.

y_n és el vector de les característiques del senyal reconstruït per la xarxa.

En la Fig. 4.40. podem visualitzar el comportament del model a les dades de validació (*test data*) per al cas particular de les característiques temporals (13 característiques). Això és indicatiu que el senyal té un comportament anòmal. S'observa com l'error de reconstrucció de les dades anòmales és significativament superior al normal.

Com que la xarxa és entrenada sota condicions de senyals normals, és lògic que reconstrueixi millor els senyals normals mentre que l'error serà menor. En la Fig. 4.40. podem veure que en particular, pel cas de les característiques temporals, en les característiques 1-4 no es reconstrueixen bé per a l'entrada anormal i, per tant, tenen un valor d'error elevat. Aquest fet és un indicatiu que hi ha una anomalia. Això té sentit, ja que la xarxa LSTM ha estat entrenada només pels senyals normals, de manera que reconstruirà millor senyals similars als senyals normals. Quan el senyal d'entrada sigui un senyal anòmal, la xarxa LSTM tindrà dificultats per fer una reconstrucció del senyal normal, mentre que l'error de les característiques augmentarà. Així, si la reconstrucció supera un llindar d'error, podem assegurar que es tracta d'una anomalia.

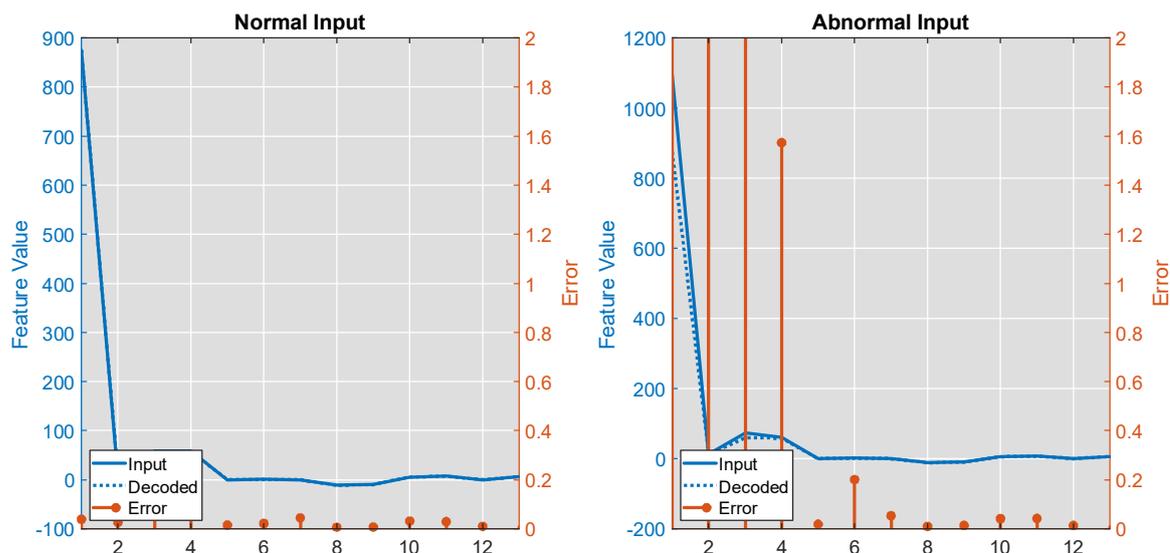


Fig. 4.39. Exemple de l'error de reconstrucció per les característiques temporals (13 característiques) per un senyal normal i un senyal anòmal.

S'ha seleccionat un valor de llindar (*Threshold*) que quan la mitjana de l'error de totes les observacions sigui més gran que 0.5, llavors el senyal es classifiqui dins la categoria anòmal. En la figura Fig. 4.41. es mostra l'error mitjà de reconstrucció utilitzant per a cada un dels senyal anòmals ($N=700$) i per a cada un dels senyals normals ($N=100$) per al cas d'emprar les característiques temporals.

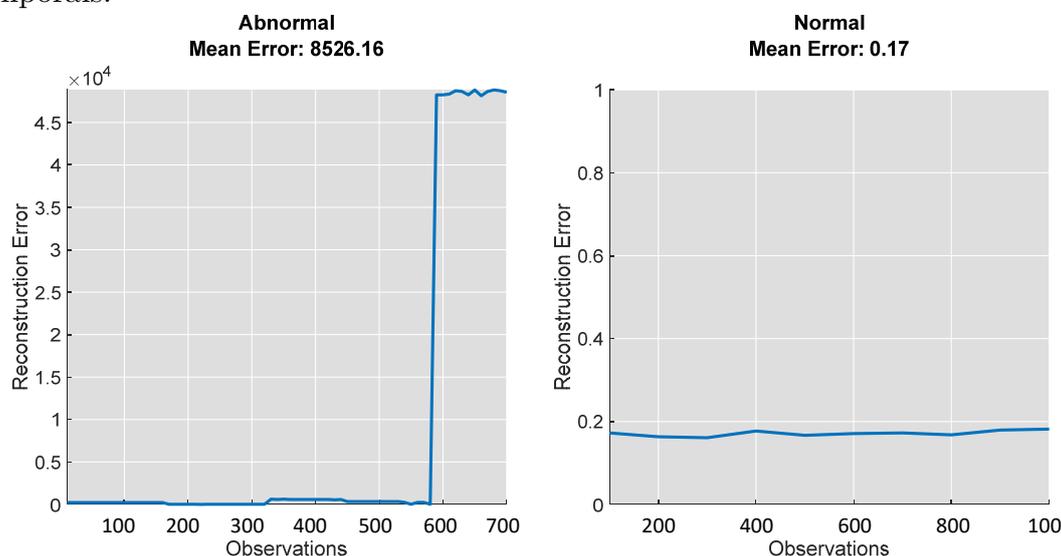


Fig. 4.40. Error de reconstrucció pel cas de les característiques temporals **A.** Error reconstrucció de les senyals anòmales ($N=700$). **B.** Error de reconstrucció de les senyals normals ($N=100$).

g) Classificació

Finalment, si quan la mitjana de l'error de totes les subseqüències sigui més gran que l'error llindar (*Threshold*) que s'ha seleccionat amb un valor de 0.5, llavors el senyal es classifica com a la categoria anòmala mentre que si no supera l'error llindar es classifica com a senyal de la categoria normal. En la figura Fig. 4.42. es mostra la matriu de confusió (*confusion matrix*) pel cas de les característiques temporals.

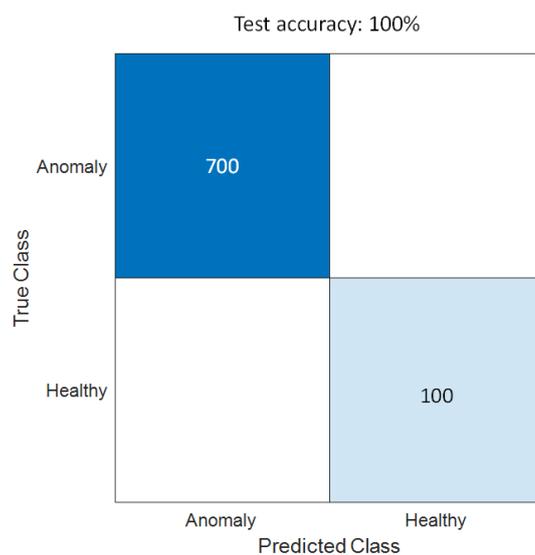


Fig. 4.41. Matriu de confusió pel cas de les característiques temporals.

4.4.3 Detector d'anomalies

La segona metodologia, presenta un mètode per a la detecció d'anomalies de mecàniques en el teixit cardíac mitjançant l'ús de l'aprenentatge profund i el disseny de dos detectors d'anomalies. A diferència dels classificadors d'anomalies, els detectors d'anomalies permeten una identificació precisa de la posició temporal de l'anomalia. S'han implementat dos detectors d'anomalies basats en aprenentatge profund (*Deep Learning*) que tenen per finalitat reconstruir el senyal original. S'ha utilitzat una xarxa tipus LSTM i una xarxa d'autoencoder, ambdues entrenades amb els senyals sense patologies, senyals normals (veure Fig. 4.42). Les dades de contracció mecànica presenten diversos problemes: alta presència de soroll a causa de la variabilitat biològica en la resposta de contracció, soroll introduït per la cadena d'adquisició de dades i gran varietat d'anomalies. Per tant, presentem un marc robust de detecció d'anomalies basat en l'aprenentatge profund que aborda aquests problemes principals, que són difícils de resoldre amb tècniques estàndard d'aprenentatge no supervisat. A més, aquests detectors d'anomalies es poden entrenar amb dades que representen el funcionament normal, és a dir, no es necessiten dades de fallida.

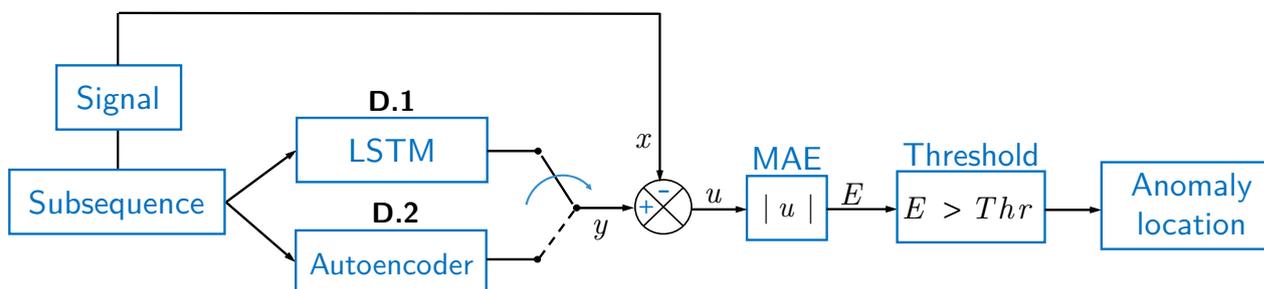


Fig. 4.42. Detector d'anomalies.

Les cel·les LSTM bidireccional (BiLSTM), que són simplement la unió de dues cel·les LSTM convencionals, permet que les cel·les recuperin la informació de la seqüència en dues direccions, cap enrere o cap endavant (Wang et al. 2018). Per tant, l'etapa BiLSTM obtindrà entrades de dues maneres; una del passat al futur i una altra del futur al passat. La Figura 4.36 compara una cel·la LSTM convencional amb una cel·la LSTM bidireccional. En la nostra xarxa, a part de les estructures LSTM bidireccional (BiLSTM), també s'han utilitzat unitats lineals rectificades (*Rectified Linear Unit*, RELU), capes totalment connectades (*Fully Connected*, FC) i una última capa de regressió (*Rectified Linear Unit*, RELU). Les funcions d'activació s'encarreguen de posar a zero els valors negatius entre capa i capa ja que no són important per l'aprenentatge.

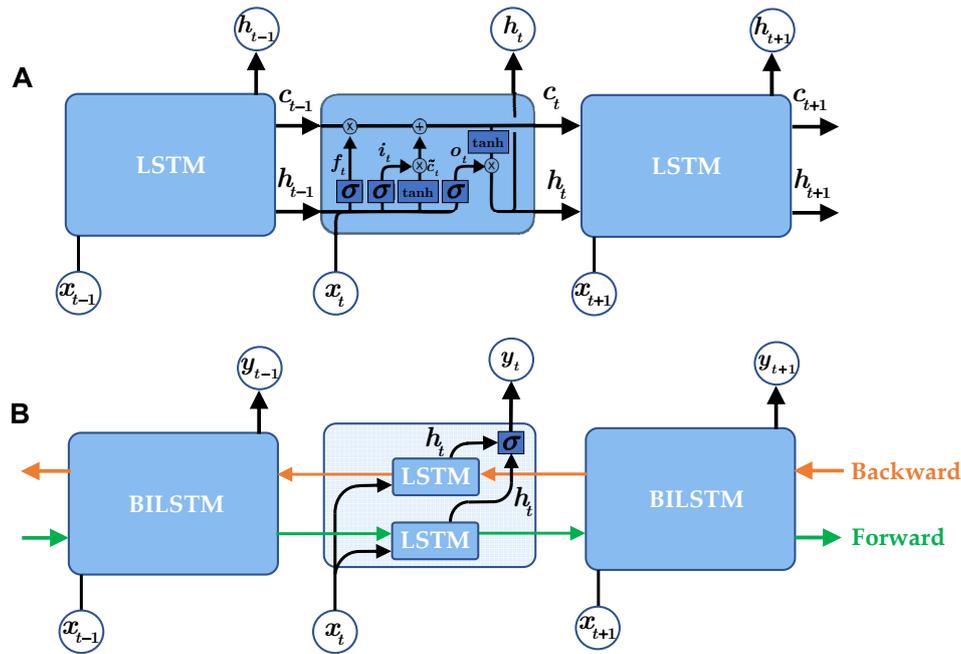


Figura. 4.43. Comparació d'una cel·la LSTM unidireccional amb una cel·la LSTM bidireccional. A. Cel·la LSTM unidireccional (LSTM). B. Cel·la LSTM bidireccional (BiLSTM).

Els paràmetres que defineixen la xarxa LSTM emprada per la tasca de classificació es resumeixen a la [Taula 4.8](#).

Layer name	Type	Activations	Lernables	States
1 Input	Sequence input	1	-	-
2 BiLSTM 1	BiLSTM	520	Input weights: 2080x1 Recurrent weights: 2080x260 Bias: 2080x1	Hidden states: 520x1 Cell states: 520x1
3 RELU 1	RELU	520	-	-
4 BiLSTM 2	BiLSTM	320	Input weights: 1280x520 Recurrent weights: 1280x160 Bias: 1280x1	Hidden states: 320x1 Cell states: 320x1
5 RELU 2	RELU	320	-	-
6 BiLSTM 3	BiLSTM	520	Input weights: 2080x320 Recurrent weights: 2080x260 Bias: 2080x1	Hidden states: 520x1 Cell states: 520x1
3 RELU 3	RELU	520	-	-
8 Fully Connected	FC	1	Weights: 1x520 Bias: 1x1	-
9 Regression Layer	RL	1	Mean Squared Error	-

Taula 4.8. Paràmetres de la xarxa LSTM utilitzada per la tasca de detecció d'anomalies en els senyals de contracció mecànica del teixit cardíac.

Per la xarxa neuronal, s'ha creat una xarxa neuronal LSTM amb 9 capes i 8 connexions. Veure Fig. 4.45.

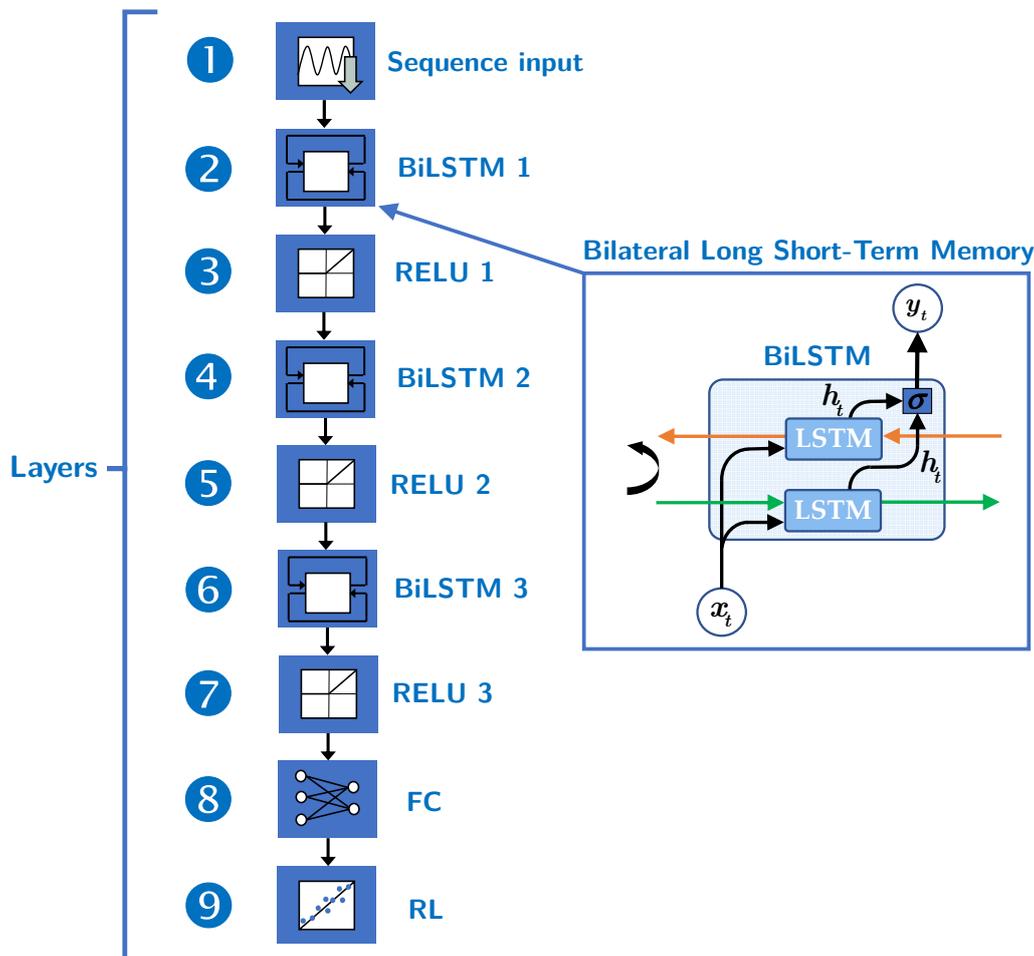


Fig. 4.44. Xarxa de memòria a curt termini (LSTM) utilitzada per la classificació d'anomalies.

Tots els paràmetres utilitzats en les opcions d'entrenament (*training options*) de la nostra xarxa neuronal de detecció d'anomalies del senyal mecànic del teixit cardíac es resumeixen a la Taula 4.9.

Descripció	Paràmetre	Valor
Algoritme d'optimització	<i>solverName</i>	Adam
Taxa del primer moment	<i>GradientDecayFactor</i>	$\beta_1 = 0.9$
Taxa del segon moment	<i>SquaredGradientDecayFactor</i>	$\beta_2 = 0.999$
Epsilon	<i>Epsilon</i>	$\epsilon = 1 \cdot 10^{-8}$
Nombre màxim d'èpoques	<i>MaxEpochs</i>	20
Mida del mini-lot	<i>MiniBatchSize</i>	10
Barrejar les dades	<i>Shuffle</i>	once
Taxa d'aprenentatge inicial	<i>InitialLearnRate</i>	$\alpha_0 = 0.001$
Factor per a la regularització L_2	<i>L2Regularization</i>	$L_2 = 0.0001$

Taula 4.9. Paràmetres d'entrenament de la xarxa neuronal LSTM per la detecció d'anomalies del senyal mecànic del teixit cardíac.

Els autoencoders són algoritmes d'aprenentatge no supervisat, sense etiquetes, que es basen en xarxes neuronals i consten de dues parts: un codificador i un descodificador. El codificador és en essència un reductor de dimensionalitat. Així, si disposem d'una entrada $x = \{x_1, x_2, x_3, \dots, x_N\}$ el codificador comprimeix l'entrada N -dimensional en un codi $h = \{h_1, h_2, h_3, \dots, h_M\}$ on $M < N$, anomenat representació latent (*latent representation*), que conté la major part de la informació de l'entrada. La Fig.4.45 mostra l'arquitectura d'un autoencoder bàsic.

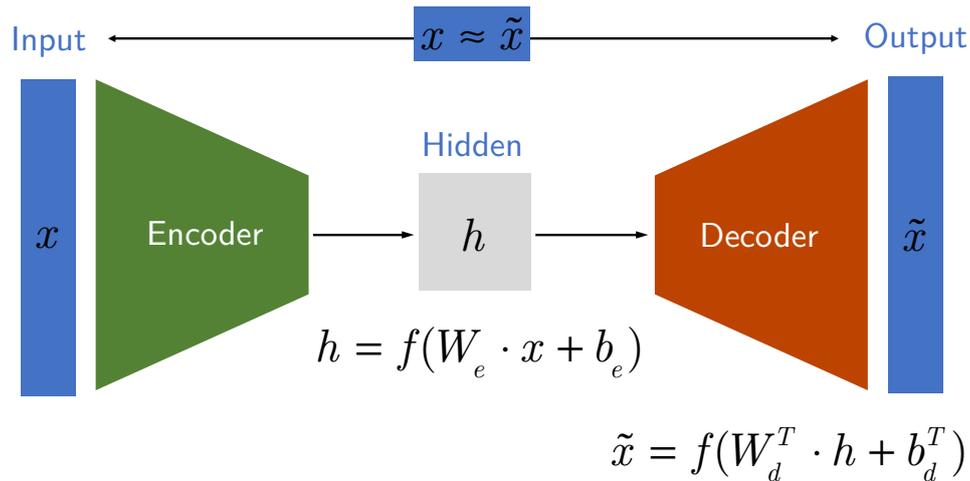


Figura. 4.45. Esquema d'un autoencoder bàsic.

Però a diferència d'altres tècniques de reducció de dimensionalitat, com per exemple el PCA, els codificadors poden capturar també relacions no lineals. El descodificador, en canvi, té un funcionament invers al codificador, ja que intenta descodificar l'entrada a partir de la representació latent, h , per tal d'obtenir la sortida descodificada, \tilde{x} , que sigui similar a l'entrada, x .

Matemàticament, podem representar la xarxa de l'autoencoder mitjançant la seves equacions de codificació i descodificació (Veure Figura.4.47):

$$\begin{aligned} h &= f(W_e \cdot x + b_e) \\ \tilde{x} &= f(W_d^T \cdot h + b_d^T) \end{aligned} \quad (4.55)$$

On

x és el vector del senyal d'entrada a l'autoencoder. Dimensió: $N \times 1$.

\tilde{x} és el vector del senyal de sortida a l'autoencoder. Dimensió: $N \times 1$.

h és l'estat ocult. Dimensió: $M \times 1$.

W_e és el vector de pesos del codificador. Dimensió: $M \times N$.

W_d és el vector de pesos del descodificador. Dimensió: $M \times N$.

b_e és el biaix (*bias*) del codificador. Dimensió: $M \times 1$.

b_d és el biaix (*bias*) del descodificador. Dimensió: $N \times 1$.

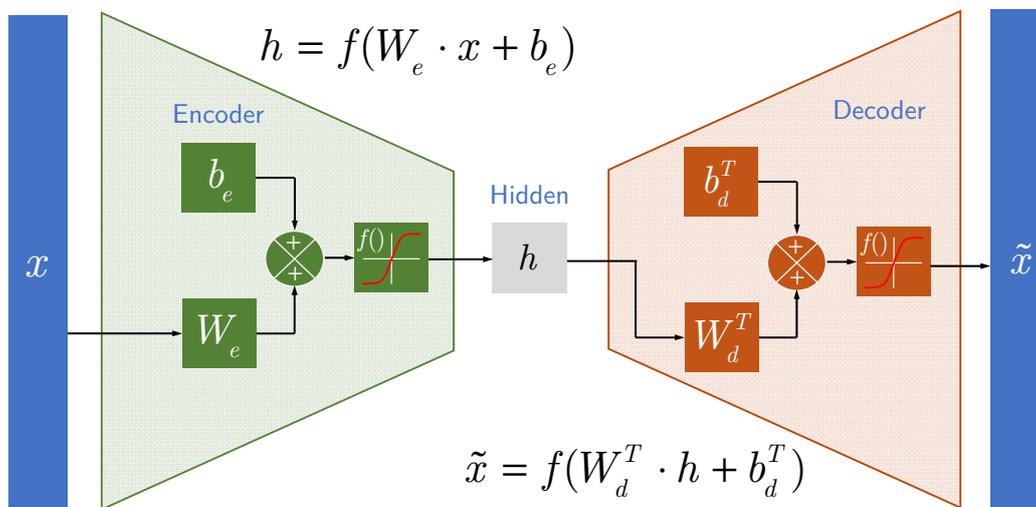


Fig. 4.46. Equació d'un autoencoder bàsic.

Per la creació del nostre autoencoder s'ha utilitzat la funció d'activació sigmoide logística (*logistic sigmoid, logsig*), tant en el codificador com en el descodificador:

$$f(x_i) = \text{logsig}(x_i) = \frac{1}{1 + e^{-x_i}} \quad (4.56)$$

On

x_i és l'entrada.

Per la definició de la funció de pèrdua (*Loss function*) de l'autoencoder, com la nostra entrada, x , té un valor real, hem utilitzat una funció de pèrdua definida com una funció d'error quadràtic mitjà dispersa (*Mean Squared Error Sparse, msespase*), que calcula l'error entre l'entrada de l'autoencoder i el seu valor de sortida, i dos termes de regularització:

$$J(W) = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \tilde{x}_i)^2 + \Omega_{L2} + \Omega_{KL} \quad (4.57)$$

On

N és nombre de mostres del vector del senyal d'entrada.

x_i és el valor de la mostra a l'entrada de l'autoencoder.

\tilde{x}_i és el valor de la mostra a la sortida de l'autoencoder.

Ω_{L2} és el terme de regularització L_2 .

Ω_{KL} és el terme de regularització de la dispersió (*sparsity*).

Per a la minimització de la funció de pèrdua s'ha utilitzat el descens del gradient estocàstic (SGD).

En l'equació anterior (4.58), podem observar que s'utilitzen dos termes de regularització amb l'objectiu d'evitar el sobreajustament (*overfitting*). La regularització L_2 afecta els pesos, W , mentre que la regularització de dispersió afecta l'activitat de les capes ocultes, h .

El terme de la regularització L_2 o regularització de cresta (*ridge regularization*), s'expressa com la suma i -èsima dels quadrats dels pesos, W , multiplicats pel paràmetre de decaïment del pes (*weight decay*), λ , que tendeix a disminuir la magnitud dels pesos, i ajuda a evitar el sobreajustament (Olshausen and Field, 1997, Nair and Hinton, 2009):

$$\Omega_{L_2} = \lambda_{dec} \cdot \frac{1}{2} \cdot \sum_{l=1}^L \sum_{i=1}^{s_l} \sum_{j=1}^{s_{l+1}} (W_{ji}^l)^2 \quad (4.58)$$

On

λ_{dec} és el pes del paràmetre de decaïment (*weight decay parameter*).

L és el nombre de capes.

s_l és el nombre d'unitats a la capa l .

W_{ji} és el pes entre la unitat j a la capa l i la unitat i a la capa $l+1$.

Imposar una restricció de dispersió (*sparsity*), ens permet descobrir estructures interessants fins i tot quan el nombre d'unitats ocultes és gran, inclús encara més gran que el nombre de mostres de l'entrada. Diem que una neurona és activa (*firing*) si el seu valor de sortida és proper a 1, mentre que serà inactiva si el seu valor de sortida és proper a 0. Tot això, assumint una funció d'activació sigmoide, sigm , tal com és el nostre cas, ja que si utilitzéssim una funció d'activació tangent hiperbòlica, tanh , llavors la neurona estaria inactiva a valors propers a -1. Ens interessa que les neurones de la capa oculta estiguin inactives la major part del temps, i només s'activi un subconjunt d'aquestes neurones per a unes entrades específiques, fet que en general dona millors resultats, ja que les neurones esdevenen més especialitzades, i llavors només s'activen per a determinades entrades x , en lloc de totes. Es diu dispersa (*sparse*) perquè cada unitat o neurona només s'activa a un determinat tipus d'entrades, no a totes. Quan s'entrena un autoencoder, les neurones ocultes de la capa mitjana s'activaran per a la majoria de mostres d'entrenament. Però, idealment el que volem és que només s'activin les neurones per a unes determinades entrades x . Per tant, l'objectiu de la regularització de dispersió, Ω_{KL} , és reduir el subconjunt de neurones de la capa oculta que es dispararan per

a cada entrada. L'activació o valor de sortida de la unitat o neurona j a la capa l per a una entrada x , es defineix com:

$$a_i^l(x) = \sum_{j=1}^N W_{ij}^{l-1} \cdot x_j + b_i^{l-1} \quad (4.59)$$

On

a_i^l és l'activitat de la neurona j a la capa l per l'entrada x .
 x_j és valor de la mostra j a l'entrada del autoencoder.

I l'activitat mitjana de la unitat oculta j , calculada sobre el conjunt de dades d'entrenament, m , es defineix com (Lee et al. 2007):

$$\hat{\rho}_j = \frac{1}{m} \cdot \sum_{i=1}^m a_j^2(x_i) \quad (4.60)$$

On

a_j^2 és l'activitat de la capa oculta (*hidden unit*).
 $\hat{\rho}_j$ és l'activitat mitjana de la neurona oculta j .
 x_i és el valor de la mostra i a l'entrada del autoencoder.

Notar que a_j^2 és l'activitat de la unitat de la segona capa del autoencoder, $l=2$, per tant és el mateix que la capa oculta (*hidden unit*). Ens interessa poder fer complir la següent restricció:

$$\hat{\rho}_j = \rho \quad (4.61)$$

On

$\hat{\rho}_j$ és l'activitat mitjana de la neurona oculta j .
 ρ és el paràmetre de dispersió (*sparsity parameter*). $\rho = 0.1$.

En altres paraules, volem que l'activació mitjana de cada neurona oculta j estigui a prop de ρ . Típicament el paràmetre de dispersió, ρ , pren un valor petit proper a zero. En el nostre cas hem seleccionat $\rho = 0.1$. Per satisfer aquesta restricció, les activacions de la unitat oculta han de ser majoritàriament properes a 0. Per aconseguir-ho, el terme de regularització de dispersió, Ω_{KL} , penalitza quan $\hat{\rho}_j$ es desvia significativament de ρ . El terme de regularització de dispersió, Ω_{KL} , està basat en el concepte de la divergència de Kullback-Leibler (KL) (Coates and Ng. 2011):

$$\Omega_{KL} = \beta \cdot \sum_{j=1}^M D_{KL}(\rho \parallel \hat{\rho}_j) \quad (4.62a)$$

$$D_{\text{KL}}(\rho \parallel \hat{\rho}_j) = \rho \cdot \log\left(\frac{\rho}{\hat{\rho}_j}\right) + (1 - \rho) \cdot \log\left(\frac{1 - \rho}{1 - \hat{\rho}_j}\right) \quad (4.62b)$$

On

M és nombre de neurones ocultes (*hidden neurons*).

β és el paràmetre de regularització de la dispersió.

$\hat{\rho}$ és el vector de l'activitat mitjana a la capa oculta, h .

ρ és el paràmetre de proporció de la dispersió (*sparsity proportion*).

El paràmetre de regularització de la dispersió (*sparsity regularization*), β , regula el pes del terme de dispersió, Ω_{KL} , per això sovint és anomenat també com el pes de la penalització de la dispersió (*sparsity penalty weight*). La divergència de Kullback-Leibler (KL) és una mesura entre dos distribucions estadístiques. En concret és la distància entre dues distribucions de variables aleatòries de Bernoulli amb mitjana ρ i una altra amb mitjana $\hat{\rho}_j$. La divergència de Kullback-Leibler, D_{KL} , té les següent propietats:

$$\begin{cases} D_{\text{KL}}(\rho \parallel \hat{\rho}_j) = 0 & \hat{\rho}_j = \rho = 0.1 \\ D_{\text{KL}}(\rho \parallel \hat{\rho}_j) = \uparrow & \hat{\rho}_j \neq \rho = 0.1 \end{cases} \quad (4.63)$$

La Fig. 4.47 mostra la variació de la divergència KL, D_{KL} , pel cas de $\rho = 0.2$. Observem com el mínim de la D_{KL} , valor igual a zero, té $\hat{\rho}_j = \rho = 0.2$, i tendeix a infinit, $D_{KL} \rightarrow \infty$, a mesura que $\hat{\rho}_j$ s'acosta a 0 o 1. Per tant, minimitzar aquest terme de penalització té com efecte que $\hat{\rho}_j$ sigui proper a ρ .

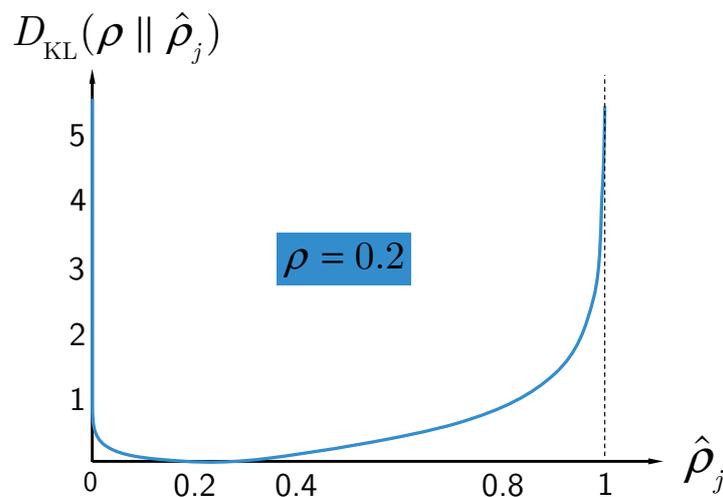


Figura. 4.47. Exemple de la variació de la divergència KL, D_{KL} , pel cas de $\rho = 0.2$.

Quan $\hat{\rho}_j$ s'apropa a $\rho = 0.1$, llavors la divergència KL, D_{KL} , a tendeix a 0. Mentre que en cas contrari la divergència KL augmenta monòtonament a mesura que $\hat{\rho}_j$ divergeix de $\rho = 0.1$. Recordem que en el nostre cas hem seleccionat $\rho = 0.1$. La manera com es poden utilitzar les xarxes d'autoencoder i la xarxes per a la detecció d'anomalies és que quan s'introdueixen dades normals a la xarxa, la xarxa pot regenerar l'entrada i l'error entre l'entrada i la sortida és petit. Mentre que quan les dades que contenen anomalies s'introdueixen a la xarxa, la xarxa no pot regenerar l'entrada i l'error es fa més gran. Tots els paràmetres utilitzats en les opcions d'entrenament (*training options*) del nostre autoencoder es resumeixen a la [Taula 4.10](#).

Descripció	Paràmetre	Valor
Nombre de nodes ocults	<i>hiddenSize</i>	200
Regularització L_2	<i>L2WeightRegularization</i>	$\lambda = 0.0001$
Regularització de la dispersió	<i>SparsityRegularization</i>	$\beta = 0.0001$
Proporció de la dispersió	<i>SparsityProportion</i>	$\rho = 0.1$
Nombre màxim d'èpoques	<i>MaxEpochs</i>	200
Funció de pèrdua	<i>LossFunction</i>	mseparse
Funció d'activació (Encoder)	<i>EncoderTransferFunction</i>	logsig
Funció d'activació (Decoder)	<i>DecoderTransferFunction</i>	logsig

Taula 4.10. Paràmetres d'entrenament de l'autoencoder per la detecció d'anomalies del senyal mecànic del teixit cardíac.

A continuació es descriuen de forma detalla els passos que s'han seguit per a la creació del detector d'anomalies basat en l'autoencoder (D.1) ([veure Fig. 4.53](#)) o una xarxa LSTM (D2) ([veure Fig. 4.54](#)).

a) Organització de les dades

Primer de tot, separem les dades de contracció mecànica en classe normal i classe anòmala.

b) Normalització de les dades

Després, es normalitzen les dades: es centren i s'estandaritzen amb la transformació z-score.

c) Creació de la matriu de subseqüències

Tot seguit, cal obtenir subseqüències del senyals normalitzat per al conjunt de dades de les categories normals i anòmales. Seguim amb l'entrenament de la xarxa LSTM amb les subseqüències de les dades d'entrenament (*training*) de la categoria del senyal normal.

d) Entrenament amb les dades normals

Després, entrenem l'autoencoder o la xarxa LSTM o amb les subseqüències de les dades d'entrenament (*training*) de la categoria del senyal normal.

e) Reconstrucció amb les dades de test

Seguidament, agafem les dades de validació o test (*validation or test data*), amb les corresponents subseqüències i fem servir el model entrenat del senyal normal per reconstruir el senyal.

f) Càlcul de l'error

Després, calculem l'error quadràtic (*mean-squared-error*, MSE) entre el senyal d'entrada x , abans de la creació de la matriu de subseqüències, i el senyal reconstruït y (LSTM *output*).

$$E(n) = \sqrt{\frac{1}{N} \cdot \sum_{n=1}^N (y_n - x_n)^2} \quad (4.64)$$

On

x_n és senyal d'entrada.

y_n és el senyal reconstruït per la xarxa.

g) Ajust de l'error a una distribució Gaussiana

A continuació, ajustem l'error a una distribució normal multivariable mitjançant l'estimació de màxima versemblança (*Maximum Likelihood Estimation*, MLE), tal que:

$$E(n) \sim N(\hat{\mu}, \hat{\Sigma}) \quad (4.65)$$

On

$\hat{\mu}$ és el vector de valors mitjans estimat.

$\hat{\Sigma}$ és la matriu de covariància estimat.

L'estimador de màxima versemblança (MLE) d'una distribució normal s'ha calculat com (McLachlan and Peel. 2000):

$$\begin{aligned} \hat{\mu} &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N E_i \\ \hat{\sigma} &= \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (E_i - \hat{\mu})^2} \end{aligned} \quad (4.66)$$

D'acord amb (Malhotra. et al. 2015), és recomanable per simplicitat ajustar una distribució gaussiana, que s'utilitza per avaluar la probabilitat d'un comportament anòmal (veure Fig. 4.49).

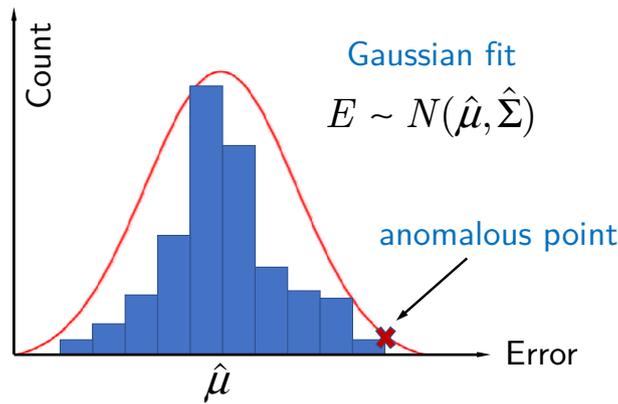


Fig. 4.48. Ajust d'una distribució gaussiana a la mesura de l'error entre el senyal d'entrada i el senyal reconstruït.

h) Càlcul de la distància

Quan l'error es troba a la cua de la distribució normal, és probable que s'hagi produït una anomalia. Així podem mesurar la raresa de l'esdeveniment mirant com s'allunya la ubicació de l'error $E(n)$ de la distribució normal, $N(\hat{\mu}, \hat{\Sigma})$. Com proposen diversos autors (Malhotra. et al. 2015, Keogh et al. 2005) pel càlcul de la distància s'ha utilitzat la mesura de la distància de Mahalanobis, ja que és una mesura de la distància entre un punt d'una mostra de l'error, $E(n)$, i una distribució estadística:

$$dM(n) = \text{dist}(E(n), N(\hat{\mu}, \hat{\Sigma})) \quad (4.67)$$

Representa la distància de la mitjana en nombre de desviacions estàndards. Per tant, en certa manera estem utilitzant la distància de Mahalanobis com una puntuació d'anomalia (*anomaly score*). Llavors, pel nostre cas la distància de Mahalanobis, dM , prendrà la següent forma:

$$dM(n) = (E(n) - \hat{\mu})^T \cdot \hat{\Sigma}^{-1} \cdot (E(n) - \hat{\mu}) \quad (4.68)$$

La matriu de covariància, es defineix com:

$$\Sigma = \begin{bmatrix} \sigma_x^2 & \sigma_{xy} \\ \sigma_{yx} & \sigma_y^2 \end{bmatrix} \quad (4.69)$$

La Fig. 4.50 compara la definició de la distància euclidià amb la distància de Mahalanobis.

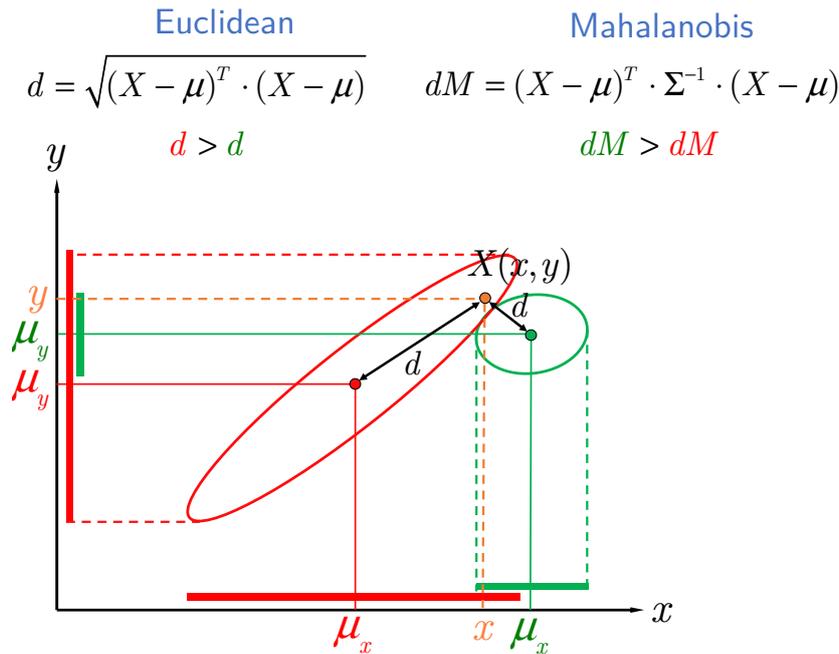


Figura. 4.49. Comparació de la distància euclidià amb la distància de Mahalanobis.

En la següent figura s'observa com a diferència de la distribució Euclidea, la distància de Mahalanobis té en compte la dispersió de la distribució.

i) Extracció de l'evolvent

L'evolvent del senyal, $\zeta(n)$, s'ha calculat interpolant la distància de Mahalanobis, $dM(n)$, amb una funció spline els màxims locals separats per almenys $n_p=30$ mostres.

j) Càlcul del llindar les mostres anòmales

S'ha comprovat amb la prova de Kolmogorov-Smirnov d'una mostra (*Kolmogorov-Smirnov one-sample test*) que les dades d'error dels senyals de validació no segueixen una distribució normal. Per tant, el llindar, *Thr*, (*threshold*) per a la detecció de les mostres anòmales s'ha definit com el quartil superior, $Q3$, de l'evolvent de l'error de validació més 2 vegades el rang interquartil, *IQR*:

$$Thr = Q3(\zeta(n)) + 5 \cdot IQR(\zeta(n)) \quad (4.70)$$

On

E_{\max} és l'error màxim les dades de validació.

k) Localització temporal de les mostres anòmales

Es considera com a mostra anòmala, quan el valor de l'evolvent de la distància de Mahalanobis, $\zeta(n)$ supera el següent llindar:

$$\zeta(n) \geq Thr \quad (4.71)$$

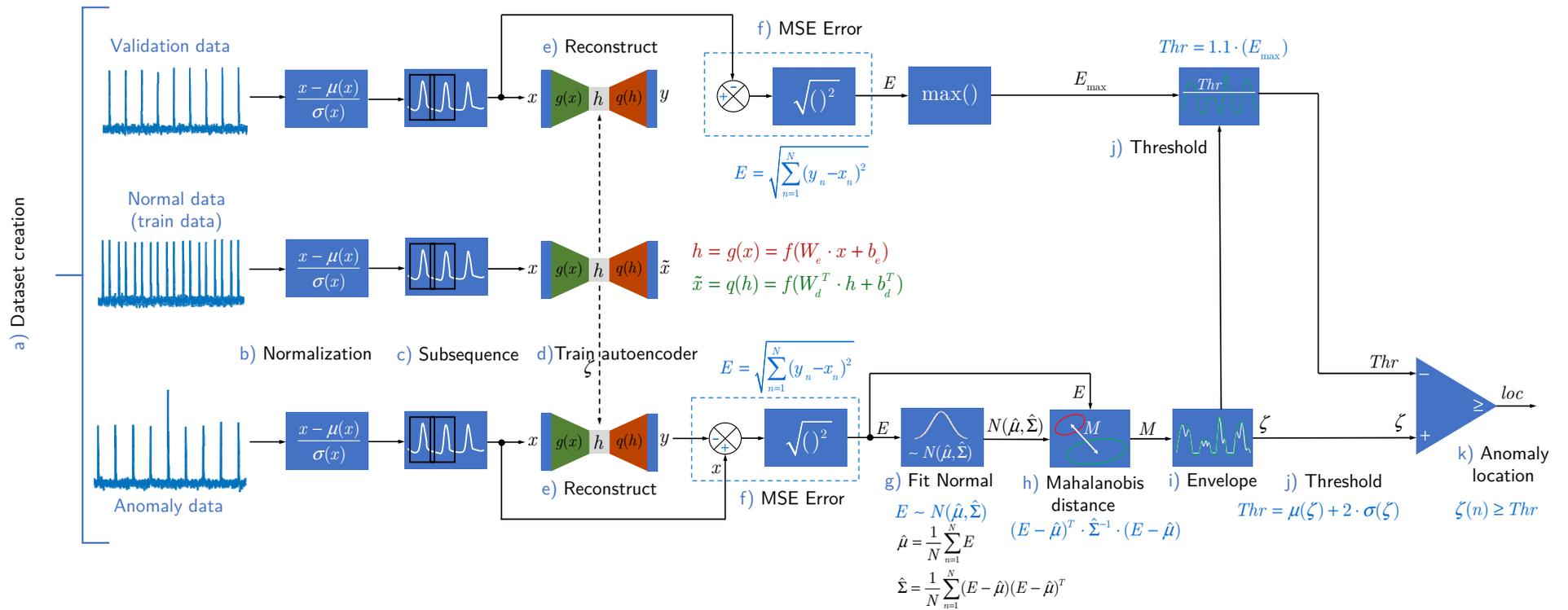


Fig. 4.50. Esquema del procediment desenvolupat per la detecció d'anomalies utilitzant autoencoders.

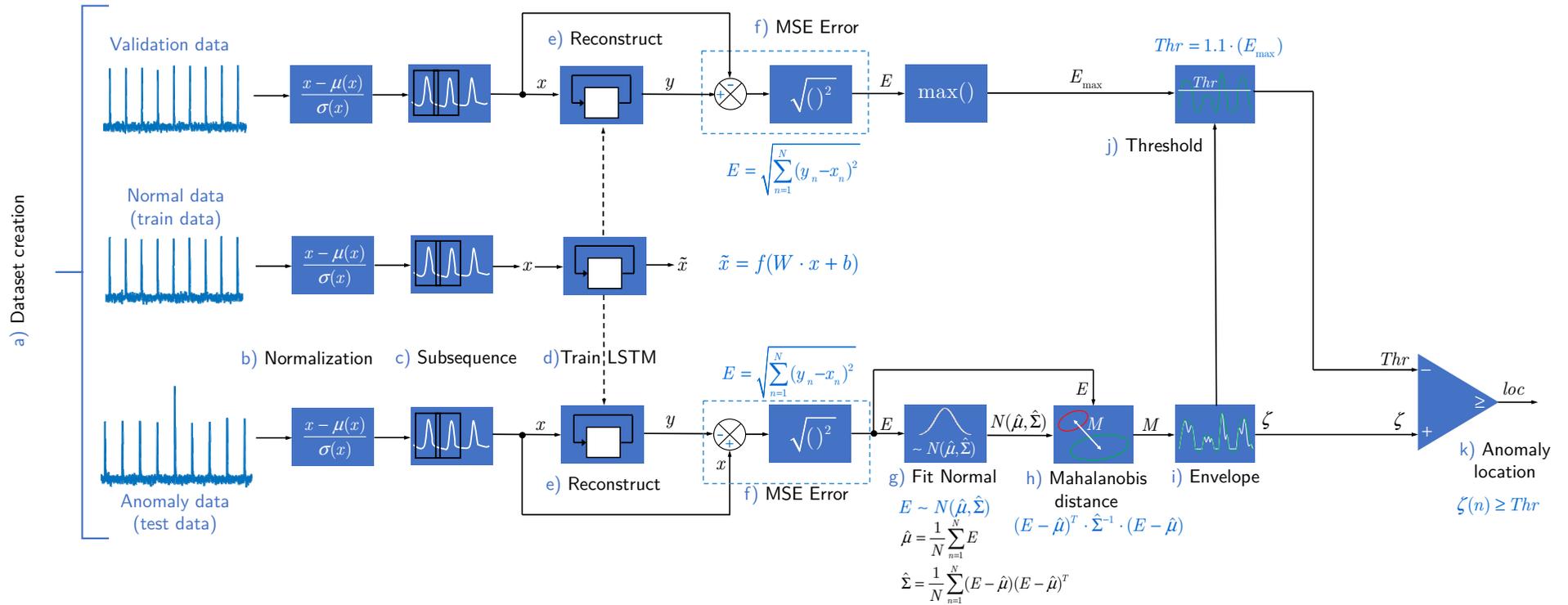


Fig. 4.51. Esquema del procediment desenvolupat per la detecció d'anomalies utilitzant una arquitectura de xarxa LSTM.

4.5 Resultats i discussió

4.5.1 Validació

En aquest apartat es procedirà a la validació del classificador i el detector d'anomalies.

4.5.1.1 Validació del classificador

En aquest apartat s'explicarà la metodologia considerada per a la validació del classificador utilitzant el set de dades, *dataset*, creat a l'apartat 4.3.1 on s'han generat un total de $N=800$ senyals, on 100 pertanyen a la categoria de contracció normal i els 700 restants a la categoria de contracció anómala.

S'ha utilitzat una fracció del 70% per cent de les dades per l'entrenament dels classificadors, i el 30% restant per la validació. Per evitar el sobreajustament (*overfitting*), s'ha emprat una validació creuada de k -plecs (*k-folds cross-validation*), amb un valor de $k=5$ plecs. Es particiona el set de dades (*dataset*) en k folds, i es calcula l'exactitud (*accuracy*) per a cada *fold*. El valor que s'expressa a la taula és l'exactitud després de realitzar la mitjana dels k -folds.

En la [Taula 4.11](#), s'observa com les característiques temporals són suficients per tal d'aconseguir una bona exactitud. Tradicionalment les característiques temporals s'han utilitzat per la detecció de anomalies cardíques del ECG, com per exemple la detecció de batecs isquèemics del miocardi ([Niranjana. et al. 2018](#)).

Les característiques no lineals són una bona opció degut al seu temps computacional pel seu càlcul es desproporcionat. Per tant, s'ha decidit utilitzar les 13 característiques temporals: factor de cresta (CF), factor d'eliminació (CLF), factor d'impuls (IF), curtosi, distorsió harmònica total (THD), factor de forma (SF), asimetria, relació senyal-soroll (SNR), valor de pic, desviació estàndard, relació senyal-soroll i distorsió (SINAD), arrel quadràtica Mitjana (RMS) i mitjana.

Model		Accuracy (%)		
Type	Options	Time	Time and frequency	All
Tree	Fine	99.7 %	99.7 %	99.7 %
	Medium	99.7 %	99.7 %	99.7 %
	Coarse	99.7 %	99.7 %	99.7 %
Linear discriminant analysis (LDA)		97.5 %	97.5 %	99.7 %
Quadratic discriminant analysis (QDA)		failed	failed	failed
Logistic regression		97.5 %	95%	97.5 %
Naive Bayes	Gaussian	failed	failed	failed
	Kernel	86.2 %	86.2 %	86.2 %
Support Vector Machines (SVM)	Linear	86.2 %	95 %	98.8 %
	Quadratic	99.7 %	99.7 %	99.7 %
	Cubic	95 %	97.5 %	98.8 %
	Fine Gaussian	87.5 %	87.5 %	87.5 %
	Medium Gaussian	87.5 %	87.5 %	87.5 %
	Coarse Gaussian	87.5 %	87.5 %	87.5 %
k -Nearest Neighbors (KNN)	Fine	98.8 %	99.7 %	99.7 %
	Medium	92.5 %	93.8 %	99.7 %
	Coarse	87.5 %	87.5 %	87.5 %
	Cosine	93.8 %	97.5 %	99.7 %
	Cubic	92.5 %	95 %	99.7 %
	Weigthed	98.8 %	98.8 %	99.7 %
Ensemble	Boosted Trees	87.5 %	87.5 %	87.5 %
	Bagged Trees	99.7 %	99.7 %	99.7 %
	Subspace discriminant	85 %	90 %	91.2 %
	Subspace KNN	99.7 %	99.7 %	99.7 %
	RUSBoosted Trees	87.5 %	88.2 %	91.2 %
Neural Networks	Narrow (10 layers)	99.7 %	99.7 %	98.8 %
	Medium (25 layers)	99.7 %	99.7 %	99.7 %
	Wide (99.7 layers)	99.7 %	99.7 %	98.8 %
	Bilayered (10, 10 layers)	98.8 %	99.7 %	99.7 %
	Trilayered (10, 10, 10 layers)	99.7 %	99.7 %	97.5 %

Taula. 4.11. Exactitud de la classificació per a diferents combinacions de les característiques temporals, freqüencials i no lineals utilitzant models d'intel·ligència artificial clàssics.

Per tal de reduir la dimensionalitat de les 13 característiques temporals a dos dimensions, s'ha realitzat una anàlisi de components principals (*Principal Component Analysis, PCA*). És una de les tècniques més antigues de l'anàlisi multivariant, va ser introduïda per Karl Pearson ([Pearson. 1901](#)). La tècnica realitza una reducció de dimensionalitat (lineal) maximitzant la variància. En l'àrea de comunicacions es coneix també com Transformació de Karhunen-Loève (KLT) i en l'àrea d'estadística també s'anomena transformació de Hotelling. La interpretació geomètrica d'aquesta tècnica és la següent, les m mostres de totes

les n característiques es tracten com un punt en un espai de dimensions igual al número de característiques, de tal manera que es forma un núvol de punts en aquest espai. Aquest núvol s'expandeix més en una direcció que en les altres. Ens interessa poder determinar en quina dimensió les dades s'expandeixen més, es a dir, tenen màxima variació. Per això, cal descompondre les dades en els seus valors propis (*eigenvalues*) que indiquen quanta variància hi ha a les dades en cada direcció i també els vectors propis (*eigenvectors*) que apunten en la direcció de màxima variació. Així, es defineix el component principal com la direcció on les dades varien més (màxima variància). Per tant, el vector propi amb el valor propi més alt és primer el component principal, PC1, i així de forma successiva. Es compleix també, que els eixos dels diferents components principals (PCs) són ortogonals entre ells.

Els components principals (PCs) s'han calculat numèricament seguint el següents passos:

1. Centrar i estandaritzar les dades

A partir de la matriu de característiques amb m mostres i n característiques s'han obtingut, les dades transformades, X_c , restant la mitja a la matriu de característiques i dividint-ho per la desviació estàndard, per tal de garantir que les columnes de matriu de característiques tinguin mitjana igual a 0 (centrar) i desviació estàndard igual a 1 (estandaritzar). Aquesta transformació s'anomena comunament z-score, i s'expressa com:

$$X_c = \text{z-score}(X) = \frac{X - \mu(X)}{\sigma(X)} \quad (4.72)$$

On

X_c són les dades centrades i estandaritzades. Dimensió: $m \times n$.

X és la matriu de característiques. Dimensió: $m \times n$.

$\mu(X)$ és la matriu de les mitjanes. Dimensió: $m \times n$.

$\sigma(X)$ és la matriu de les desviacions estàndard. Dimensió: $m \times n$.

En la matriu de les mitjanes, $\mu(X)$, es repeteix en cada una de les m files la mitjana calculada per a cada una de les n característiques. I de igual forma succeeix amb la matriu de les desviacions estàndard, $\sigma(X)$.

2. Calcular la matriu de covariància.

La matriu de covariància s'ha calculat a partir de les dades centrades com;

$$\Sigma = \frac{1}{n-1} (X - \mu)^T \cdot (X - \mu) \quad (4.73)$$

On

Σ és la matriu de covariància. Dimensió: $n \times n$.

3. Càlcul del valors propis i vectors propis de la matriu de covariància

Es calculen els valors propis (*eigenvalues*), λ , resolent la següent expressió:

$$|\Sigma - \lambda \cdot I| = 0 \quad (4.74)$$

On

Σ és la matriu de covariància. Dimensió: $n \times n$.

λ són els valors propis (*eigenvalues*). Dimensió: $n \times 1$.

I és la matriu identitat. Dimensió: $n \times n$.

Obtinguts els valors propis (*eigenvalues*), λ , s'obtenen els vectors propis (*eigenvectors*), ν , resolent la següent expressió:

$$(\Sigma - \lambda \cdot I) \cdot \nu = 0 \quad (4.75)$$

On

Σ és la matriu de covariància. Dimensió: $n \times n$.

λ són els valors propis (*eigenvalues*). Dimensió: $n \times 1$.

I és la matriu identitat. Dimensió: $n \times n$.

ν són els vectors propis (*eigenvectors*). Dimensió: $n \times n$.

4. Ordenar els vectors propis

Els vectors propis s'ordenen ascendentment, ν_{sort} , i aquest ordre serveix també per definir l'ordre dels valors propis, λ_{sort} .

5. Projectar les dades

Es projecten les dades centrades a l'espai dels components principals, amb la següent rotació geomètrica (veure [Fig. 4.32](#)):

$$X_p = X_c \cdot \nu_{\text{sort}} \quad (4.76)$$

On

X_p són les dades projectades. Dimensió: $m \times n$.

X_c són les dades centrades i estandaritzades. Dimensió: $m \times n$.

ν_{sort} són els vectors propis ordenats ascendentment. Dimensió: $n \times n$.

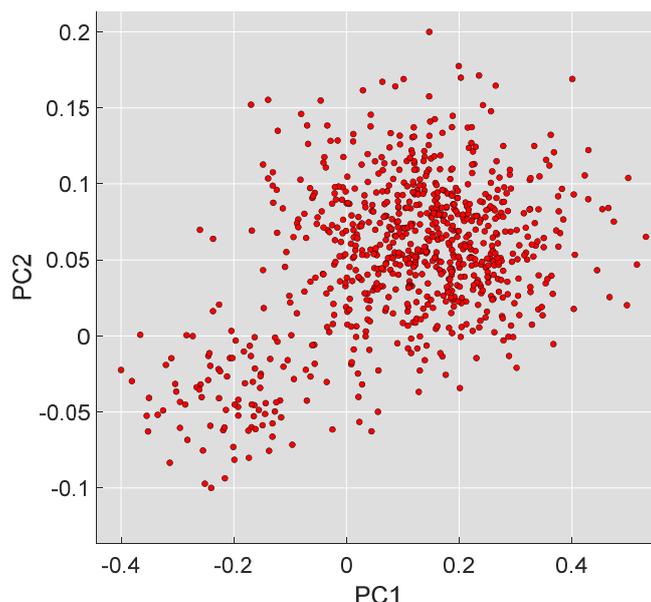


Fig. 4.52. Projectió de les característiques temporals a l'espai de les components principals.

6.a Calcular la variància explicada

La variància explicada, varExp , (*variance explained*) en tant per cent (%) es calcula com:

$$\text{varExp} = \frac{\nu_{\text{sort}}(i)}{\sum_{i=1}^n \nu_{\text{sort}}(i)} \cdot 100 \quad (4.77)$$

6.b Calcular el percentatge acumulat de variància explicada.

El percentatge acumulat de variància explicada, cumVarExp , es calcula com:

$$\text{cumvarExp} = \sum_{i=1}^n \text{varExp}(i) \quad (4.78)$$

7. Reduir components

La reducció de components comença creant un gràfic on es representen els valors propis (*eigenvalues*) en funció dels components principals (PCs). Aquest gràfic es coneix com *scree plot* i va ser introduït per Raymond B. Cattell l'any 1966 (Cattel. 1966), on el punt de colze (*elbow point*), definit com el punt de màxima curvatura, ens indica el nombre de components principals a mantenir en una anàlisi de components principals (PCA). (Fig. 4.53). Aquest criteri pot ser subjectiu quan apareixen múltiples colzes que dificulten conèixer el nombre correcte components a retenir (Geoffrey et al. 2007) o de vegades es retenen massa pocs factors (Lewith et al. 2010).

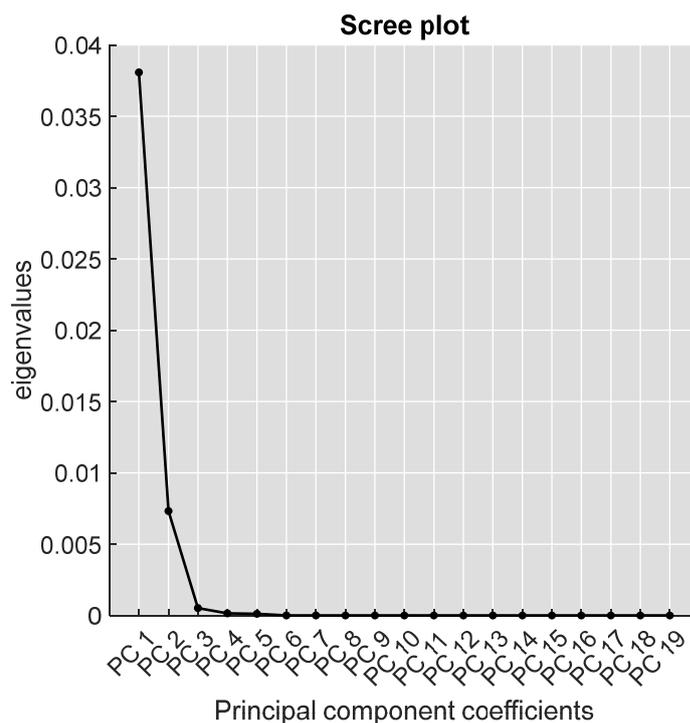


Fig. 4.53. Gràfic de *scree plot* on es representen els valors propis (*eigenvalues*) en funció dels components principals (PCs) de les característiques temporals.

Per això, una pràctica comuna consisteix en representar el *scree plot* com la variància explicada (*variance explained*) en tant per cent (%) en funció dels components principals (PCs) (veure Fig. 4.54).

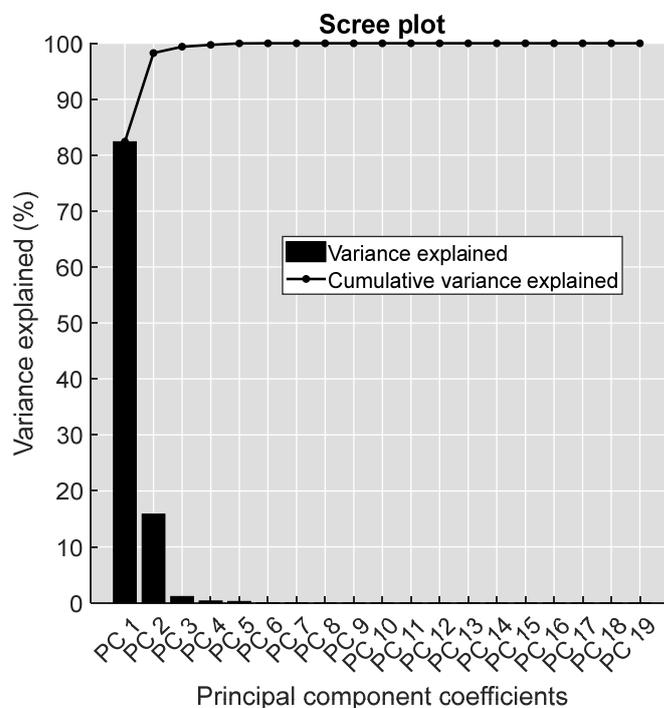


Fig. 4.54. Gràfic de *scree plot* on es representa la variància explicada (*explained variance*) en funció dels components principals (PCs).

Com a regla pràctica es sol agafar suficients components per a garantir que la variància explicada (*explained variance*) no sigui inferior al 60% (Blinowska and Zygierewicz. 2011), així com s’aconsegueix la reducció de dimensionalitat. En el cas del nostre set de dades, seleccionant només les dues primeres components principals (PC1 i PC2), aconseguim retenir fins a un 98% de la informació. En la Taula 4.12 es mostra l’exactitud dels diferents classificadors després d’aplicar una reducció de dimensionalitat amb una anàlisi de components principals (PCA) mantenint dos components principals.

Model		
Type	Options	PC1 and PC2
Tree	Fine	99.4 %
	Medium	99.4 %
	Coarse	99.4 %
Linear discriminant analysis (LDA)		87.5 %
Quadratic discriminant analysis (QDA)		failed
Logistic regression		86.2 %
Naive Bayes	Gaussian	failed
	Kernel	99.4 %
Support Vector Machines (SVM)	Linear	87.5 %
	Quadratic	98.8 %
	Cubic	68.8 %
	Fine Gaussian	87.5 %
	Medium Gaussian	87.5 %
	Coarse Gaussian	87.5 %
<i>k</i> -Nearest Neighbors (KNN)	Fine	97.5 %
	Medium	96.2 %
	Coarse	87.5 %
	Cosine	96.2 %
	Cubic	96.2 %
	Weighed	96.2 %
Ensemble	Boosted Trees	87.5 %
	Bagged Trees	99.4 %
	Subspace discriminant	87.5 %
	Subspace KNN	99.4 %
	RUSBoosted Trees	87.5 %
Neural Networks	Narrow (10 layers)	98.8 %
	Medium (25 layers)	98.8 %
	Wide (99.4 layers)	98.8 %
	Bilayered (10, 10 layers)	98.8 %
	Trilayered (10, 10, 10 layers)	97.5 %

Taula. 4.12. Exactitud de la classificació utilitzant les dues primeres components principals (PC1, PC2) obtingudes a partir de les característiques temporals, freqüencials i no lineals, utilitzant models d’intel·ligència artificial clàssics.

Per a concloure, en la [Taula 4.13](#) es mostra l'exactitud obtinguda del classificador en utilitzar la xarxa LSTM i l'extracció de característiques (C.3) i pel cas d'utilitzar la xarxa LSTM i el senyal original (C.2).

Model		Accuracy (%)		
Type	Options	(Time)	(Time and frequency)	(All)
Deep Learning	features+LSTM (C.3)	100 %	100 %	100 %
Deep Learning	signals+LSTM (C.2)	98%		

Taula 4.13. Comparació de l'exactitud (%) pels models d'aprenentatge profund (*Deep Learning*) utilitzant una xarxa LSTM amb les característiques (C.3) o les senyals original (C.2).

Les dues opcions mostren una exactitud elevada. Tot i que és l'opció d'utilitzar les característiques (*features*) calculades com a entrada de la xarxa LSTM (C.3) on s'aconsegueix la major exactitud. En aquest cas no s'observa canvi a nivell d'exactitud en utilitzar les diferents característiques. Però sí que hi ha un canvi significatiu del cost computacional (veure [Taula 4.14](#)).

Característiques	Cost computacional (temps)
Temporals	2.17 <i>min</i>
Freqüencials	4,45 <i>min</i>
No lineals	22,72 <i>h</i>

Taula 4.14. Cost computacional per a les diferents característiques.

L'extracció de característiques no lineals del les dades d'entrenament té un cost molt elevat, per això es decideixen descartar aquestes característiques. Els càlcul de les característiques i l'entrenament dels classificadors s'ha realitzat amb un ordinador Alienware X15 (Dell, Austin, Texas, EUA). (veure [Taula 4.15](#)).

En la següent taula es mostren les especificacions de l'ordinador pel càlcul.

Part	Especificacions
Model	Alienware x15 R1
Processador	Intel Core i9 -11900H (11th Gen) 250 GHz, 2496 MHz
Memòria RAM	32 GB
Targeta gràfica (GPU)	NVIDIA GeForce RTX 3070

Taula 4.15. Especificacions de l'ordinador utilitzat pels càlculs.

4.5.1.2 Validació del detector

Pel càlcul de l'exactitud (*accuracy*) del detector d'anomalies el criteri d'intersecció sobre la unió (IOU) i l'índex de Sørensen–Dice (SDI) s'utilitzen habitualment per calcular la precisió del detector d'anomalies en les dades sintètiques. El criteri de la intersecció sobre la unió (*Intersection Over Union*, IOU), que es defineix com (veure Fig. 4.51):

$$IOU(\%) = \frac{\text{intersection}}{\text{union}} \cdot 100 = \frac{ROI_D \cap ROI_{GT}}{ROI_D \cup ROI_{GT}} \cdot 100 \quad (4.79)$$

On

ROI_D és la regió anòmla detectada pel detector d'anomalies.

ROI_{GT} és la regió anòmla verdadera (ground truth).

La regió d'interès (ROI) correspon a les cardinalitats de les dues regions (és a dir, el nombre de mostres de cada conjunt).

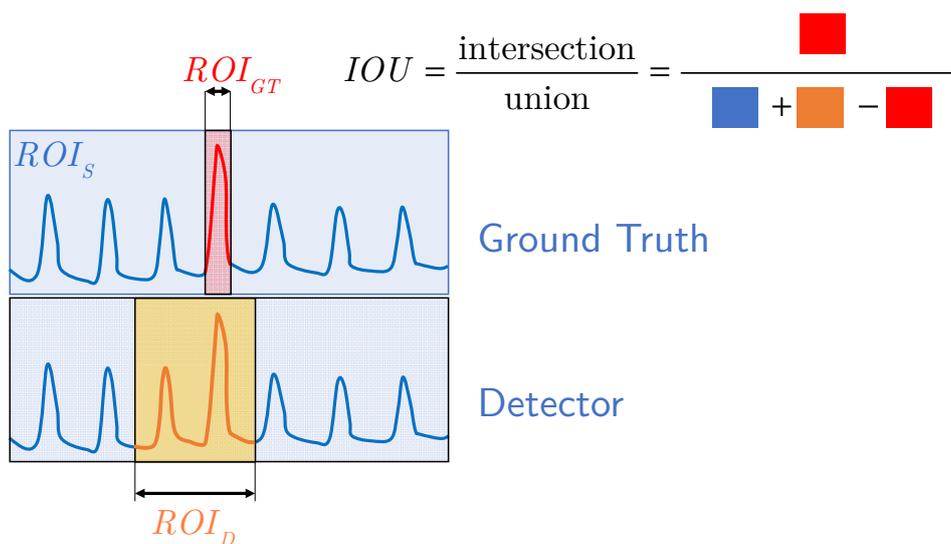


Figura. 4.55. Mètode d'obtenció de la intersecció sobre la unió (*Intersection Over Union*, IOU) en senyals.

La figura Fig. 4.55 detalla el càlcul pràctic de la intersecció sobre la unió (*Intersection Over Union*, IOU), quan es coneix la regió d'interès del ground truth (ROI_{GT}), la regió d'interès detectada pel detector d'anomalies (ROI_D) i la regió del senyal restant (ROI_S). Alternativament, l'IOU es pot escriure utilitzant la definició de *true positive* (TP), fals positiu (FP) i fals negatiu (FN), com:

$$IOU = \frac{\text{intersection}}{\text{union}} = \frac{TP}{TP + FP + FN} \in [0,1] \quad (4.80)$$

Aquest índex és conegut per diversos altres noms, especialment la puntuació F1. De manera similar, l'índex de Sørensen–Dice (SDI) o puntuació F1 es defineix com:

$$SDI = \frac{2 \cdot TP}{2 \cdot TP + FP + FN} \in [0,1] \quad (4.81)$$

Es diferencia de l'índex IOU que només compta els positius reals una vegada tant en el numerador com en el denominador. Tots dos índexs, IOU i Sørensen–Dice, oscil·len en l'interval tancat entre 0 i 1. Es poden interpretar com una mesura de similitud sobre conjunts. La [Figura. 4.56](#) mostra la precisió de detecció mitjançant el detector d'anomalies basat en l'autoencoder i l'LSTM per a un cas particular de senyal sintètic: major amplitud.

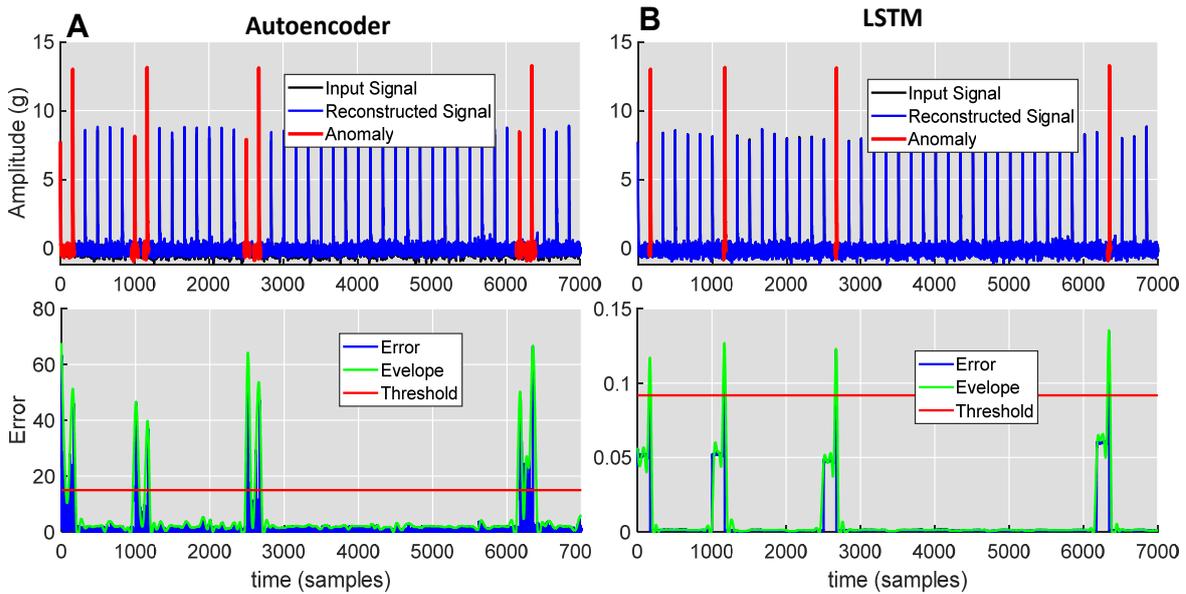


Figura. 4.56. Mètode d'obtenció de la intersecció sobre la unió (*Intersection Over Union*, IOU) en senyals.

La [Taula 4.19](#) mostra la precisió obtinguda pel classificador basat en l'autoencoder i la xarxa neuronal de tipus LSTM, vam decidir utilitzar la IDE per avaluar la precisió. Per a l'avaluació s'utilitzen dades sintètiques que modelen set tipus d'anomalies, excloent el senyal normal, representatiu del senyal contràctil del teixit cardíac (vegeu la [Taula 4.4](#)).

Signal type	Sørensen–Dice Index (SDI)	
	Autoencoder	LSTM
2. Lower amplitude	0.55	0.83
3. Higher amplitude	0.71	0.99
4. Missing pulse	0.63	0.91
5. Slow pulse decay	0.67	0.95
6. Fast pulse decay	0.61	0.88
7. Early or anticipated pulse	0.51	0.77
8. Pause/block	0.61	0.9

Taula. 4.20. Precisió dels detectors d'anomalies basats en aprenentatge profund.

El marc computacional basat en xarxes neuronals LSTM presenta la millor precisió (*accuracy*). També es nota que el senyal de pols anticipat (*early pulse*) és el senyal més difícil de detectar en ambdues aproximacions.

No s'han trobat estudis previs a la literatura on la metodologia de detecció d'anomalies s'apliqui a la contracció mecànica del teixit cardíac. No obstant això, podem comparar-ho amb la precisió aconseguida pels detectors d'anomalies basats en l'aprenentatge profund en el senyal elèctric cardíac, que es troba en el rang entre 0.75 i 0.1 ([Zhao et al. 2021](#)).

4.5.2 Aplicació a dades real

En aquest apartat es presenta una aplicació en dades real de contracció mecànica de teixit cardíac, tant el classificador com també el detector d'anomalies.

4.5.2.1 Aplicació del classificador

A continuació en la Fig. 4.57 es mostren els resultats de l'aplicació a dades reals utilitzant el classificador basat en característiques temporals i la xarxa LSTM (C.3).

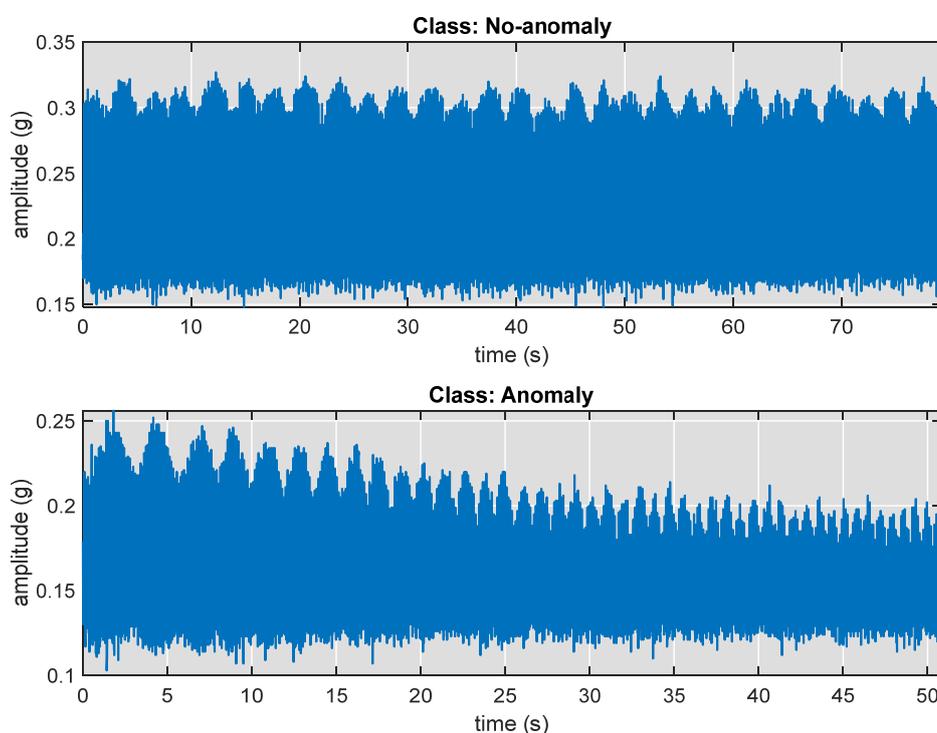


Fig. 4.57. Resultat del classificador aplicat a dades reals.

4.5.2.2 Aplicació del detector

En aquest apartat es descriu l'aplicació del sistema a dades reals utilitzant la metodologia presentada de detecció d'anomalies basada en aprenentatge profund. En concret, en l'apartat anterior s'ha validat amb dades sintètiques que una xarxa LSTM ofereix millor precisió en la detecció d'anomalies (Veure apartat 4.3.3). Per tant, s'ha provat el detector d'anomalies basat en una xarxa tipus LSTM en senyals reals de contracció mecànica del teixit cardíac de l'aurícula esquerra (LA) estimulat a freqüències successives de 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz, 6 Hz, 8

Hz i $10 Hz$ i també en dades reals de l'aurícula dreta sense estimular, en tant que aquesta aurícula és controlada per les cèl·lules marcapassos.

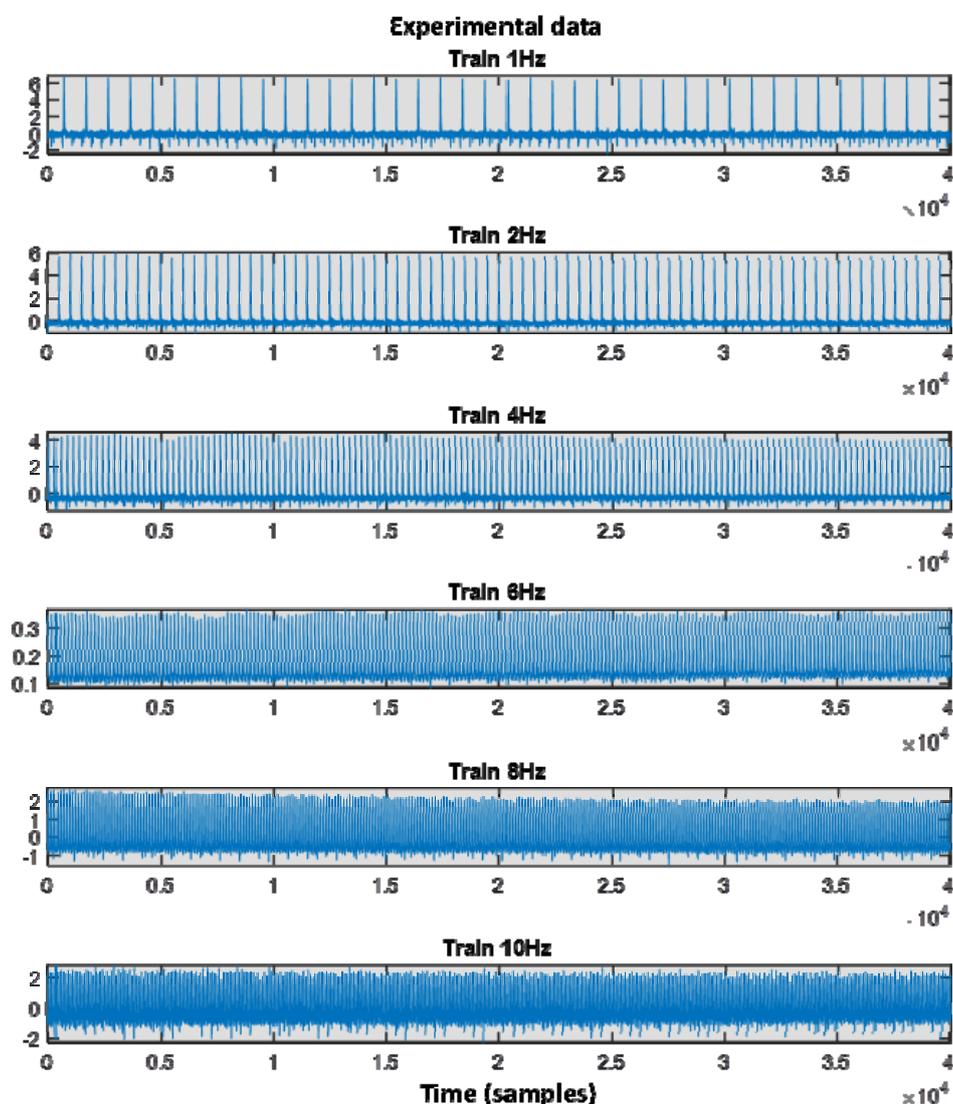


Figura. 4.58. Senyals experimentals de la categoria normal amb diferents freqüències d'estimulació. Aquests senyals són utilitzats per l'entrenament del detector d'anomalies que s'aplica als senyals experimentals.

Per als registres estimulats de l'aurícula esquerra s'han utilitzat senyals experimentals normals per l'entrenament de la xarxa. Per l'entrenament de la xarxa dels registres del teixit cardíac de l'aurícula dreta, s'utilitzen senyals experimentals normals estimulats a freqüència d'estimulació de $5 Hz$, donat que en l'[apartat 4.3.1](#) s'ha demostrat que la contracció observada en el teixit cardíac de l'aurícula esquerra s'aproxima a $5 Hz$. Concretament, es van seleccionar 16 registres de 12 ratolins on es van observar anomalies representatives. En la [Figura. 4.58](#) es mostren els senyals experimentals de la categoria normal

utilitzats per l'entrenament del detector d'anomalies emprat en els senyals experimentals.

La [Figura. 4.59](#) mostra el detector d'anomalies de tipus LSTM aplicat a senyals mecànics experimentals de les aurícules esquerra i dreta del teixit cardíac de ratolins CD-1. Es confirma visualment com el detector és capaç d'identificar satisfactòriament les anomalies presents en el senyal. La [Fig. 4.59.A](#) mostra una anomalia apareguda en les aurícules esquerres quan s'estimula a 5 Hz. Mentre que la [Fig. 4.59.B](#) mostra anomalies detectades en les aurícules dretes que romanen sense estimular, ja que té un marcapassos fisiològic natural. Aquestes aurícules que no segueixen un patró d'estimulació són més propenses a la gènesi d'anomalies. En concret, apareixen dos fenòmens d'aturada cardíaca, identificats correctament pel detector d'anomalies.

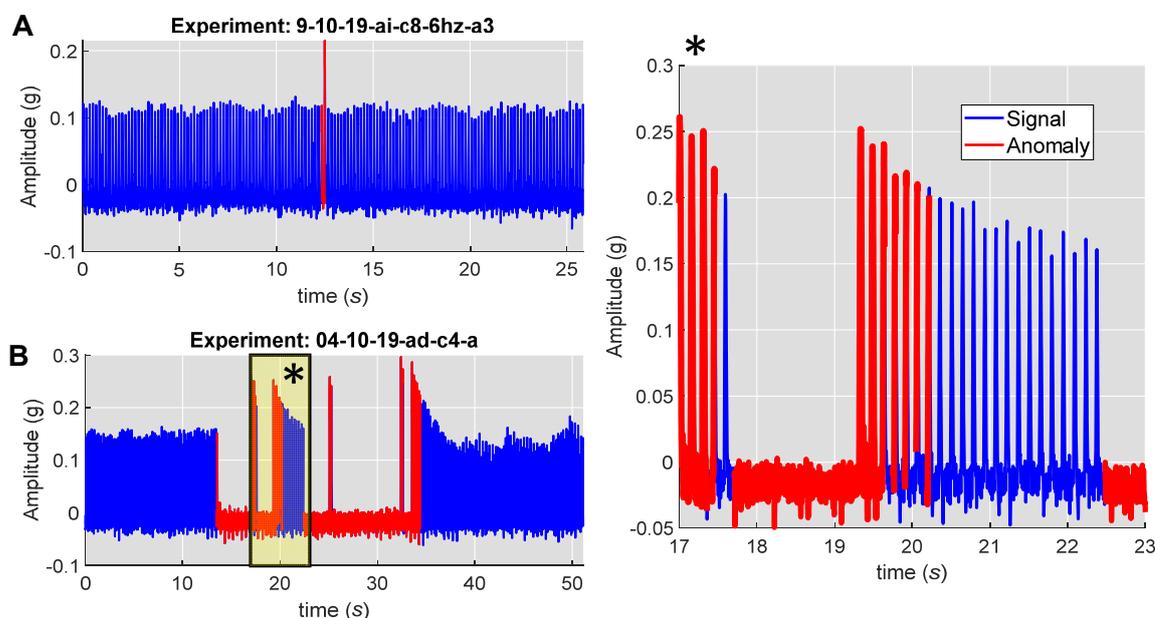


Figura 4.59. Anomalies detectades en senyals experimentals. **R.** Aurícules esquerres.
B. Aurícules dretes.

El detector d'anomalies s'ha implementat en una interfície d'usuari interactiva (*Graphical User Interface, GUI*), (Veure [Figura. 4.60](#)) on l'investigador o clínic pot carregar, analitzar les dades i exportar els resultats a un fitxer html amb gràfics interactius on es destaquen les regions anòmales. A més, aquest fitxer incorpora eines bàsiques de visualització que permeten accions com ampliar (*zoom in*), allunyar (*zoom out*), escalar automàticament, i descarregar els resultats com a fitxer d'imatge, fitxer .png. Tot aquest conjunt d'eines interactives permeten aprofundir en l'anàlisi i l'explicació d'anomalies, associades a la generació d'arítmies cardíques. Els fitxers amb extensió .html es

poden utilitzar en qualsevol sistema operatiu (OS), no requereixen gaires recursos computacionals i es poden utilitzar en mode fora de línia (sense connexió a internet). Tots els fitxers de gràfics interactius HTML són de lliure accés en una pàgina de repositori Git sota la llicència MIT Open software (<https://github.com/xavierMarimon/CardiacTissueAnomaly/>).

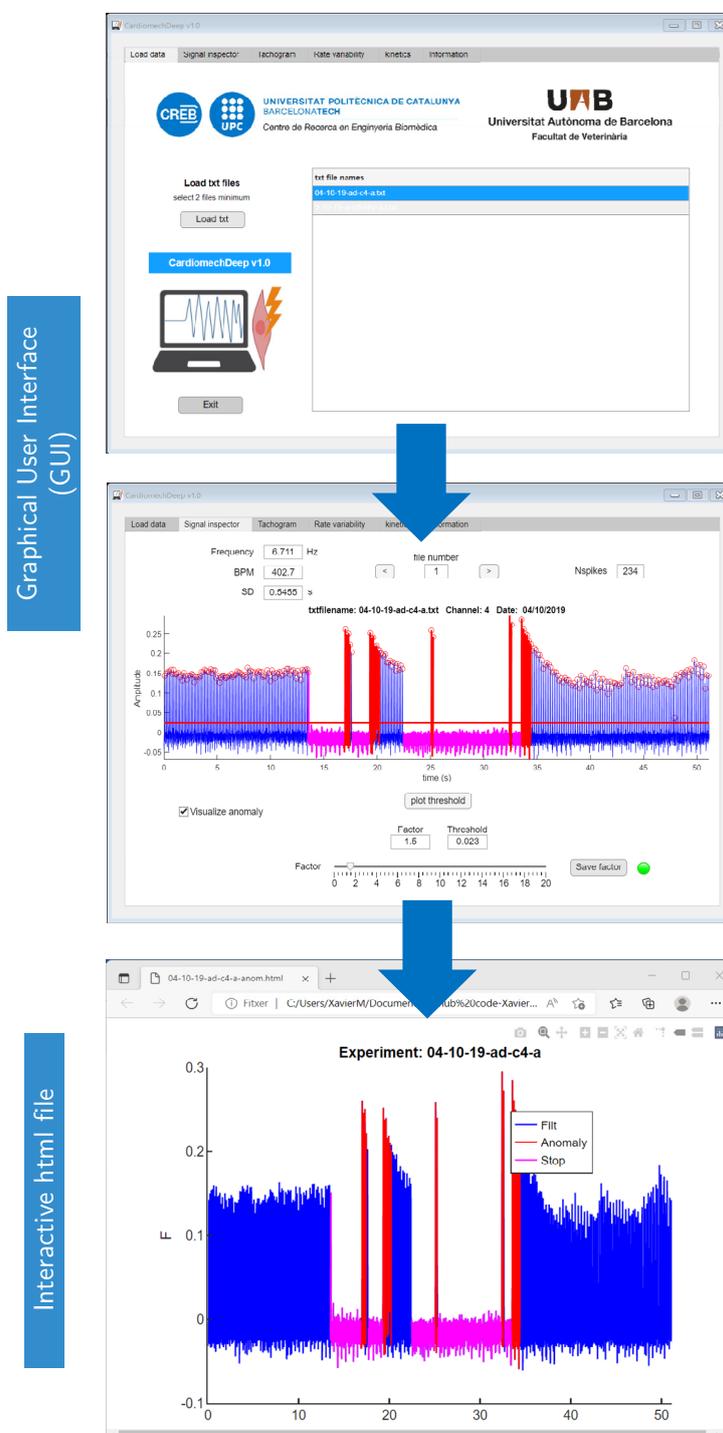


Figura. 4.60. Eina interactiva per a la detecció i exportació d' anomalies detectades en el senyal contractil del teixit cardíac.

Des del punt de vista biològic, aquesta metodologia pot ser d'interès en el camp de la fisiologia cardíaca, la farmacologia o la patologia. És important tenir en compte que l'alta freqüència de batecs cardíacs que es produeixen fisiològicament en un ratolí pot dificultar la quantificació. La detecció i classificació d'anomalies és un primer pas en la detecció de diferents patologies cardíques associades a canvis en l'amplitud de contracció (inotròpica), la freqüència (cronotròpica) o el ritme (arítmies). Aquest tipus d'enfocament experimental, juntament amb els mètodes tradicionals de càlcul dels paràmetres associats a les contraccions (amplitud, durada, freqüència, etc.) poden ser útils en futurs estudis on s'estudiïn aquestes alteracions.

Referències

- [1] D. B. Percival and A. T. Walden, *Wavelet Methods for Time Series Analysis*. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. doi: 10.1017/CBO9780511841040.
- [2] H. Mesa, “Adapted Wavelets for Pattern Detection,” 2005, pp. 933–944. doi: 10.1007/11578079_96.
- [3] D. B. Percival and H. O. Mofjeld, “Analysis of Subtidal Coastal Sea Level Fluctuations Using Wavelets,” *J Am Stat Assoc*, vol. 92, no. 439, pp. 868–880, Sep. 1997, doi: 10.1080/01621459.1997.10474042.
- [4] F. Chuah Mooi Choo and Fu, “ECG Anomaly Detection via Time Series Analysis,” in *Frontiers of High Performance Computing and Networking ISPA 2007 Workshops*, 2007, pp. 123–135.
- [5] X. Zhao, H. Yan, Z. Hu, and D. Du, “Deep spatio-temporal sparse decomposition for trend prediction and anomaly detection in cardiac electrical conduction,” *IIEE Trans Healthc Syst Eng*, vol. 12, no. 2, pp. 150–164, 2022, doi: 10.1080/24725579.2021.1982081.
- [6] A. Lis, Z. Dworakowski, and P. Czubak, “An anomaly detection method for rotating machinery monitoring based on the most representative data,” *Journal of Vibroengineering*, vol. 23, no. 4, pp. 861–876, 2021, doi: 10.21595/jve.2021.21622.
- [7] B. Lindemann, F. Fesenmayr, N. Jazdi, and M. Weyrich, “Anomaly detection in discrete manufacturing using self-learning approaches,” in *Procedia CIRP*, 2019, vol. 79, pp. 313–318. doi: 10.1016/j.procir.2019.02.073.
- [8] S. Kiranyaz, T. Ince, and M. Gabbouj, “Real-Time Patient-Specific ECG Classification by 1-D Convolutional Neural Networks,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 63, no. 3, pp. 664–675, Mar. 2016, doi: 10.1109/TBME.2015.2468589.
- [9] M. Wess, S. Manoj P.D., and A. Jantsch, “Neural Network based ECG Anomaly Detection on FPGA and Trade-off Analysis,” May 2017, pp. 1–4.
- [10] R. Bailly, M. Malfante, C. Allier, L. Ghenim, and J. Mars, “Deep anomaly detection using self-supervised learning: application to time series of cellular data,” 2021.
- [11] D. Li, J. Zhang, Q. Zhang, and X. Wei, “Classification of ECG signals based on 1D convolution neural network,” in *2017 IEEE 19th International Conference on e-Health Networking, Applications and Services (Healthcom)*, Oct. 2017, pp. 1–6. doi: 10.1109/HealthCom.2017.8210784.
- [12] S. Kiranyaz, T. Ince, and M. Gabbouj, “Personalized Monitoring and Advance Warning System for Cardiac Arrhythmias,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 9270, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-09544-z.
- [13] V. Chandola, D. Cheboli, and V. Kumar, “Detecting Anomalies in a Time Series Database.” 2009.
- [14] H. Zhou and C. Kan, “Tensor-Based ECG Anomaly Detection toward Cardiac Monitoring in the Internet of Health Things,” *Sensors*, vol. 21, no. 12, p. 4173, Jun. 2021, doi: 10.3390/s21124173.

- [15] H. Yang, “Multiscale Recurrence Quantification Analysis of Spatial Cardiac Vectorcardiogram Signals,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 58, no. 2, pp. 339–347, Feb. 2011, doi: 10.1109/TBME.2010.2063704.
- [16] H. Yang, C. Kan, G. Liu, and Y. Chen, “Spatiotemporal Differentiation of Myocardial Infarctions,” *IEEE Transactions on Automation Science and Engineering*, vol. 10, no. 4, pp. 938–947, Oct. 2013, doi: 10.1109/TASE.2013.2263497.
- [17] H. Sivaraks and C. A. Ratanamahatana, “Robust and Accurate Anomaly Detection in ECG Artifacts Using Time Series Motif Discovery,” *Comput Math Methods Med*, vol. 2015, pp. 1–20, 2015, doi: 10.1155/2015/453214.
- [18] H. Li and P. Boulanger, “A Survey of Heart Anomaly Detection Using Ambulatory Electrocardiogram (ECG),” *Sensors*, vol. 20, no. 5, p. 1461, Mar. 2020, doi: 10.3390/s20051461.
- [19] E. Keogh, J. Lin, and A. Fu, “HOT SAX: Efficiently Finding the Most Unusual Time Series Subsequence,” in *Fifth IEEE International Conference on Data Mining (ICDM’05)*, 2005, pp. 226–233. doi: 10.1109/ICDM.2005.79.
- [20] D. M. Hawkins, “Identification of Outliers. Chapman and Hall, London – New York 1980, 188,” *Biometrical Journal*, vol. 29, no. 2, pp. 198–198, 1987, doi: 10.1002/bimj.4710290215.
- [21] M. Gupta, J. Gao, C. C. Aggarwal, and J. Han, “Outlier Detection for Temporal Data: A Survey,” *IEEE Trans Knowl Data Eng*, vol. 26, no. 9, pp. 2250–2267, Sep. 2014, doi: 10.1109/TKDE.2013.184.
- [22] N. D. Pham, Q. L. Le, and T. K. Dang, “HOT aSAX: A Novel Adaptive Symbolic Representation for Time Series Discords Discovery,” 2010, pp. 113–121. doi: 10.1007/978-3-642-12145-6_12.
- [23] M. C. Chuah and F. Fu, “ECG Anomaly Detection via Time Series Analysis,” in *ISPA Workshops*, 2007.
- [24] B. Veeravalli, C. J. Deepu, and D. Ngo, “Real-Time, Personalized Anomaly Detection in Streaming Data for Wearable Healthcare Devices,” 2017, pp. 403–426. doi: 10.1007/978-3-319-58280-1_15.
- [25] I. Christov, G. Gómez-Herrero, V. Krasteva, I. Jekova, A. Gotchev, and K. Egiazarian, “Comparative study of morphological and time-frequency ECG descriptors for heartbeat classification,” *Med Eng Phys*, vol. 28, no. 9, pp. 876–887, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.medengphy.2005.12.010.
- [26] P. de Chazal and R. B. Reilly, “A Patient-Adapting Heartbeat Classifier Using ECG Morphology and Heartbeat Interval Features,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 53, no. 12, pp. 2535–2543, Dec. 2006, doi: 10.1109/TBME.2006.883802.
- [27] M. Llamedo and J. P. Martínez, “Heartbeat Classification Using Feature Selection Driven by Database Generalization Criteria,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 58, no. 3, pp. 616–625, Mar. 2011, doi: 10.1109/TBME.2010.2068048.
- [28] A. Gretton, A. Smola, J. Huang, M. Schmittfull, K. Borgwardt, and B. Schölkopf, “Covariate Shift by Kernel Mean Matching,” in *Dataset Shift in Machine Learning*, The MIT Press, 2008, pp. 131–160. doi: 10.7551/mitpress/9780262170055.003.0008.

- [29] K. Li, N. Du, and A. Zhang, “Detecting ECG abnormalities via transductive transfer learning,” in Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine - BCB '12, 2012, pp. 210–217. doi: 10.1145/2382936.2382963.
- [30] C. Ye, B. V. K. V. Kumar, and M. T. Coimbra, “Heartbeat Classification Using Morphological and Dynamic Features of ECG Signals,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 59, no. 10, pp. 2930–2941, Oct. 2012, doi: 10.1109/TBME.2012.2213253.
- [31] Z. Zhang, J. Dong, X. Luo, K.-S. Choi, and X. Wu, “Heartbeat classification using disease-specific feature selection,” *Comput Biol Med*, vol. 46, pp. 79–89, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.compbiomed.2013.11.019.
- [32] M. Thomas, M. K. Das, and S. Ari, “Automatic ECG arrhythmia classification using dual tree complex wavelet based features,” *AEU - International Journal of Electronics and Communications*, vol. 69, no. 4, pp. 715–721, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.aeue.2014.12.013.
- [33] K. N. V. P. S. Rajesh and R. Dhuli, “Classification of ECG heartbeats using nonlinear decomposition methods and support vector machine,” *Comput Biol Med*, vol. 87, pp. 271–284, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.compbiomed.2017.06.006.
- [34] H. Li and P. Boulanger, “A Survey of Heart Anomaly Detection Using Ambulatory Electrocardiogram (ECG),” *Sensors*, vol. 20, no. 5, p. 1461, Mar. 2020, doi: 10.3390/s20051461.
- [35] S. Chauhan and L. Vig, “Anomaly detection in ECG time signals via deep long short-term memory networks,” in 2015 IEEE International Conference on Data Science and Advanced Analytics (DSAA), Oct. 2015, pp. 1–7. doi: 10.1109/DSAA.2015.7344872.
- [36] S. Kiranyaz, T. Ince, and M. Gabbouj, “Real-Time Patient-Specific ECG Classification by 1-D Convolutional Neural Networks,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 63, no. 3, pp. 664–675, Mar. 2016, doi: 10.1109/TBME.2015.2468589.
- [37] P. Rajpurkar et al., “Cardiologist-level arrhythmia detection and classification in ambulatory electrocardiograms using a deep neural network,” *Nat Med*, vol. 25, no. 1, pp. 65–69, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41591-018-0268-3.
- [38] U. R. Acharya, H. Fujita, O. S. Lih, Y. Hagiwara, J. H. Tan, and M. Adam, “Automated detection of arrhythmias using different intervals of tachycardia ECG segments with convolutional neural network,” *Inf Sci (N Y)*, vol. 405, pp. 81–90, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.ins.2017.04.012.
- [39] J. Wang, J. Zhang, and X. Wang, “Bilateral LSTM: A Two-Dimensional Long Short-Term Memory Model With Multiply Memory Units for Short-Term Cycle Time Forecasting in Re-entrant Manufacturing Systems,” *IEEE Trans Industr Inform*, vol. 14, no. 2, pp. 748–758, Feb. 2018, doi: 10.1109/TII.2017.2754641.
- [40] A. Coates and A. Y. Ng, “The Importance of Encoding versus Training with Sparse Coding and Vector Quantization,” in Proceedings of the 28th International Conference on International Conference on Machine Learning, 2011, pp. 921–928.
- [41] T. P. Patel, K. Man, B. L. Firestein, and D. F. Meaney, “Automated quantification of neuronal networks and single-cell calcium dynamics using calcium

- imaging,” *J Neurosci Methods*, vol. 243, pp. 26–38, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.01.020.
- [42] H. Lee, C. Ekanadham, and A. Ng, “Sparse deep belief net model for visual area V2,” in *Advances in Neural Information Processing Systems*, 2007, vol. 20. [Online]. Available: <https://proceedings.neurips.cc/paper/2007/file/4daa3db355ef2b0e64b472968cb70f0d-Paper.pdf>
- [43] V. Nair and G. E. Hinton, “3D Object Recognition with Deep Belief Nets,” in *Advances in Neural Information Processing Systems*, 2009, vol. 22. [Online]. Available: <https://proceedings.neurips.cc/paper/2009/file/6e7b33fdea3adc80ebd648fffb665bb8-Paper.pdf>
- [44] D. J. Berndt and J. Clifford, “Using Dynamic Time Warping to Find Patterns in Time Series,” in *KDD Workshop*, 1994.
- [45] B. A. Olshausen and D. J. Field, “Sparse coding with an overcomplete basis set: A strategy employed by V1?,” *Vision Res*, vol. 37, no. 23, pp. 3311–3325, Dec. 1997, doi: 10.1016/S0042-6989(97)00169-7.
- [46] G. T. Lewith, W. B. Jonas, and H. Walach, *Clinical Research in Complementary Therapies: Principles, Problems and Solutions*. Elsevier Health Sciences, 2010.
- [47] G. R. Norman and D. L. Streiner, *Biostatistics: The Bare Essentials*. PMPH-USA, 2007.
- [48] M. H. Hayes, *Statistical Digital Signal Processing and Modeling*. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- [49] EP. Widmaier, H. Raff, and K. T. Strang, *Vander’s Human Physiology*, 13th ed. New York: McGraw-Hill Companies, 2014.
- [50] J. Tresguerres, *Fisiología Humana*, 3rd ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 2005.
- [51] L. M. Koeppen B and B. Stanton, *Principles of Physiology*, 4th Edition. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005.
- [52] Costanzo LS, *BRS Physiology*, 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2019.
- [53] L. A. Danílov, *Lecciones de dinámica no-lineal: una introducción elemental*. Editorial URSS, 2006.
- [54] A. v. Oppenheim, R. W. Schaffer, and J. R. Buck, *Discrete-Time Signal Processing*, 3rd ed. Pearson, 2010.
- [55] J. F. Kaiser, “Nonrecursive Digital Filter Design Using the I0-Sinh Window Function,” *Proceedings of the 1974 IEEE® International Symposium on Circuits and Systems*, pp. 20–23, 1974.
- [56] G. McLachlan and D. Peel, *Finite Mixture Models*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2000. doi: 10.1002/0471721182.
- [57] D. P. Kingma and J. Ba, “Adam: A Method for Stochastic Optimization,” in *3rd International Conference for Learning Representations*, Dec. 2015. Accessed: Mar. 07, 2022. [Online]. Available: <http://arxiv.org/abs/1412.6980>

- [58] K. P. Murphy, *Machine Learning: A Probabilistic Perspective*. Massachusetts: The MIT Press, Cambridge, 2012.
- [59] C. M. Bishop, *Pattern Recognition and Machine Learning*. New York: Springer New York, 2006.
- [60] S. Hochreiter and J. Schmidhuber, “Long Short-Term Memory,” *Neural Comput*, vol. 9, no. 8, pp. 1735–1780, Nov. 1997, doi: 10.1162/neco.1997.9.8.1735.
- [61] R. B. Cattell, “The Scree Test For The Number Of Factors,” *Multivariate Behav Res*, vol. 1, no. 2, pp. 245–276, Apr. 1966, doi: 10.1207/s15327906mbr0102_10.
- [62] A. Wolf, J. B. Swift, H. L. Swinney, and J. A. Vastano, “Determining Lyapunov exponents from a time series,” *Physica D*, vol. 16, no. 3, pp. 285–317, Jul. 1985, doi: 10.1016/0167-2789(85)90011-9.
- [63] F. Takens, “Detecting strange attractors in turbulence,” 1981, pp. 366–381. doi: 10.1007/BFb0091924.
- [64] W. Liebert, K. Pawelzik, and H. G. Schuster, “Optimal Embeddings of Chaotic Attractors from Topological Considerations,” *Europhysics Letters (EPL)*, vol. 14, no. 6, pp. 521–526, Mar. 1991, doi: 10.1209/0295-5075/14/6/004.
- [65] W. Liebert and H. G. Schuster, “Proper choice of the time delay for the analysis of chaotic time series,” *Phys Lett A*, vol. 142, no. 2–3, pp. 107–111, Dec. 1989, doi: 10.1016/0375-9601(89)90169-2.
- [66] A. M. Fraser and H. L. Swinney, “Independent coordinates for strange attractors from mutual information,” *Phys Rev A (Coll Park)*, vol. 33, no. 2, pp. 1134–1140, Feb. 1986, doi: 10.1103/PhysRevA.33.1134.
- [67] J. Theiler, “Efficient algorithm for estimating the correlation dimension from a set of discrete points,” *Phys Rev A (Coll Park)*, vol. 36, no. 9, pp. 4456–4462, Nov. 1987, doi: 10.1103/PhysRevA.36.4456.
- [68] K. K. L. Ho et al., “Predicting Survival in Heart Failure Case and Control Subjects by Use of Fully Automated Methods for Deriving Nonlinear and Conventional Indices of Heart Rate Dynamics,” *Circulation*, vol. 96, no. 3, pp. 842–848, Aug. 1997, doi: 10.1161/01.CIR.96.3.842.
- [69] S. M. Ryan, A. L. Goldberger, S. M. Pincus, J. Mietus, and L. A. Lipsitz, “Gender- and age-related differences in heart rate dynamics: Are women more complex than men?,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 24, no. 7, pp. 1700–1707, Dec. 1994, doi: 10.1016/0735-1097(94)90177-5.
- [70] S. M. Pincus and A. L. Goldberger, “Physiological time-series analysis: what does regularity quantify?,” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 266, no. 4, pp. H1643–H1656, Apr. 1994, doi: 10.1152/ajpheart.1994.266.4.H1643.
- [71] S. M. Pincus, “Approximate entropy as a measure of system complexity.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 88, no. 6, pp. 2297–2301, Mar. 1991, doi: 10.1073/pnas.88.6.2297.
- [72] L. S. McCue and A. W. Troesch, “Use of Lyapunov Exponents to Predict Chaotic Vessel Motions,” 2011, pp. 415–432. doi: 10.1007/978-94-007-1482-3_23.
- [73] W. Caesarendra, B. Kosasih, Kiet Tieu, and C. A. S. Moodie, “An application of nonlinear feature extraction - A case study for low speed slewing bearing condition

monitoring and prognosis,” in 2013 IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics, Jul. 2013, pp. 1713–1718. doi: 10.1109/AIM.2013.6584344.

[74] M. T. Rosenstein, J. J. Collins, and C. J. de Luca, “A practical method for calculating largest Lyapunov exponents from small data sets,” *Physica D*, vol. 65, no. 1–2, pp. 117–134, May 1993, doi: 10.1016/0167-2789(93)90009-P.

[75] P. Stoica and N. Sandgren, “Spectral analysis of irregularly-sampled data: Paralleling the regularly-sampled data approaches,” *Digit Signal Process*, vol. 16, no. 6, pp. 712–734, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.dsp.2006.08.012.

[76] A. Schuster, “On the investigation of hidden periodicities with application to a supposed 26 day period of meteorological phenomena,” *J Geophys Res*, vol. 3, no. 1, p. 13, 1898, doi: 10.1029/TM003i001p00013.

[77] W. J. Zang, L. N. Chen, X. J. Yu, P. Fang, J. Lu, and Q. Sun, “Comparison of effects of acetylcholine on electromechanical characteristics in guinea-pig atrium and ventricle,” *Exp Physiol*, vol. 90, no. 1, pp. 123–130, Jan. 2005, doi: 10.1113/expphysiol.2004.027888.

[78] M. Zaccolo, “cAMP signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies,” *Br J Pharmacol*, vol. 158, no. 1, pp. 50–60, Sep. 2009, doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00185.x.

[79] L. Staerk, J. A. Sherer, D. Ko, E. J. Benjamin, and R. H. Helm, “Atrial Fibrillation: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes.,” *Circ Res*, vol. 120, no. 9, pp. 1501–1517, Apr. 2017, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309732.

[80] J. L. Puglisi, J. A. Negroni, Y. Chen-Izu, and D. M. Bers, “The force-frequency relationship: insights from mathematical modeling,” *Adv Physiol Educ*, vol. 37, no. 1, pp. 28–34, Mar. 2013, doi: 10.1152/advan.00072.2011.

[81] J. Pinnell, S. Turner, and S. Howell, “Cardiac muscle physiology,” *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, vol. 7, no. 3, pp. 85–88, Jun. 2007, doi: 10.1093/bjaceaccp/mkm013.

[82] S. O. McMorn, S. M. Harrison, W. J. Zang, X. J. Yu, and M. R. Boyett, “A direct negative inotropic effect of acetylcholine on rat ventricular myocytes,” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 265, no. 4, pp. H1393–H1400, Oct. 1993, doi: 10.1152/ajpheart.1993.265.4.H1393.

[83] J. Layland and J. C. Kentish, “Positive force- and $[Ca^{2+}]_i$ -frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies,” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 276, no. 1, pp. H9–H18, Jan. 1999, doi: 10.1152/ajpheart.1999.276.1.H9.

[84] A. A. Lanzafame, A. Christopoulos, and F. Mitchelson, “Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors.,” *Recept Channels*, vol. 9, no. 4, pp. 241–60, 2003.

[85] J. R. BLINKS and J. KOCH-WESER, “Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon myocardial contractility.,” *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 134, pp. 373–89, Dec. 1961.

- [86] P. M. L. Janssen and M. Periasamy, "Determinants of frequency-dependent contraction and relaxation of mammalian myocardium," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 43, no. 5, pp. 523–531, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.08.012.
- [87] L. Hove-Madsen et al., "Atrial Fibrillation Is Associated With Increased Spontaneous Calcium Release From the Sarcoplasmic Reticulum in Human Atrial Myocytes," *Circulation*, vol. 110, no. 11, pp. 1358–1363, Sep. 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000141296.59876.87.
- [88] H. E. D. J. ter Keurs and P. A. Boyden, "Calcium and Arrhythmogenesis," *Physiol Rev*, vol. 87, no. 2, pp. 457–506, Apr. 2007, doi: 10.1152/physrev.00011.2006.
- [89] R. D. Harvey and A. E. Belevych, "Muscarinic regulation of cardiac ion channels," *Br J Pharmacol*, vol. 139, no. 6, pp. 1074–1084, Jul. 2003, doi: 10.1038/sj.bjp.0705338.
- [90] R. D. Harvey, "Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists: Effects on Cardiovascular Function," 2012, pp. 299–316. doi: 10.1007/978-3-642-23274-9_13.
- [91] D. Georgakopoulos and D. A. Kass, "Minimal force-frequency modulation of inotropy and relaxation of in situ murine heart," *J Physiol*, vol. 534, no. 2, pp. 535–545, Jul. 2001, doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.00535.x.
- [92] J. E. Frampton, S. M. Harrison, M. R. Boyett, and C. H. Orchard, "Ca²⁺ and Na⁺ in rat myocytes showing different force-frequency relationships," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 261, no. 5, pp. C739–C750, Nov. 1991, doi: 10.1152/ajpcell.1991.261.5.C739.
- [93] M. Endoh, "Force–frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance," *Eur J Pharmacol*, vol. 500, no. 1–3, pp. 73–86, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.013.
- [94] D. DiFrancesco and C. Tromba, "Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes," *J Physiol*, vol. 405, no. 1, pp. 493–510, Nov. 1988, doi: 10.1113/jphysiol.1988.sp017344.
- [95] D. DiFrancesco, "The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity," *Circ Res*, vol. 106, no. 3, pp. 434–446, Feb. 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208041.
- [96] S. Dhein, C. J. van Koppen, and O.-E. Brodde, "Muscarinic receptors in the Mammalian Heart," *Pharmacol Res*, vol. 44, no. 3, pp. 161–182, Sep. 2001, doi: 10.1006/phrs.2001.0835.
- [97] T. CENS, M. ROUSSET, J. LEYRIS, P. FESQUET, and P. CHARNET, "Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca²⁺ channels," *Prog Biophys Mol Biol*, vol. 90, no. 1–3, pp. 104–117, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2005.05.013.
- [98] A. Bucchi, M. Baruscotti, R. B. Robinson, and D. DiFrancesco, "Modulation of rate by autonomic agonists in SAN cells involves changes in diastolic depolarization and the pacemaker current," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 43, no. 1, pp. 39–48, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.04.017.
- [99] R. A. Bouchard and D. Bose, "Analysis of the interval-force relationship in rat and canine ventricular myocardium," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 257, no. 6, pp. H2036–H2047, Dec. 1989, doi: 10.1152/ajpheart.1989.257.6.H2036.

- [100] G. Antoons, K. Mubagwa, I. Nevelsteen, and K. R. Sipido, “Mechanisms Underlying the Frequency Dependence of Contraction and $[Ca^{2+}]_i$ Transients in Mouse Ventricular Myocytes,” *J Physiol*, vol. 543, no. 3, pp. 889–898, Sep. 2002, doi: 10.1113/jphysiol.2002.025619.
- [101] A. v. Oppenheim, “Discrete-time signal processing.” Prentice-Hall, Upper Saddle River (N.J.), 2010.
- [102] N. G. Paulter, D. R. Larson, and J. J. Blair, “The IEEE Standard on Transitions, Pulses, and Related Waveforms, Std-181-2003,” *IEEE Trans Instrum Meas*, vol. 53, no. 4, pp. 1209–1217, Aug. 2004, doi: 10.1109/TIM.2004.831470.
- [103] P. Malhotra, L. Vig, G. M. Shroff, and P. Agarwal, “Long Short Term Memory Networks for Anomaly Detection in Time Series,” in *ESANN*, 2015.
- [104] S. H. Strogatz, *Nonlinear Dynamics and Chaos*. CRC Press, 2015. doi: 10.1201/9780429492563.
- [105] M. Vidyasagar, *Nonlinear Systems Analysis*. Society for Industrial and Applied Mathematics, 2002. doi: 10.1137/1.9780898719185.
- [106] G. Deco and B. Schürmann, *Information Dynamics*. New York, NY: Springer New York, 2001. doi: 10.1007/978-1-4613-0127-1.
- [107] G. Deco and D. Obradovic, *An Information-Theoretic Approach to Neural Computing*. New York, NY: Springer New York, 1996. doi: 10.1007/978-1-4612-4016-7.

Conclusions

En aquest apartat es descriuen les conclusions i les principals aportacions de la tesis organitzades per capítols.

Capítol 2. Escala intracel·lular

Plataforma computacional

- S'ha confirmat a partir de la modelització elèctrica d'un sistema de pinçament de membrana (*patch clamp*) amb configuració de cèl·lula completa (*whole cell*), la idoneïtat de la caracterització del cardiomiòcit a partir de les mesures dels corrents iònics a través de la membrana cel·lular.
- S'ha presentat i validat una plataforma computacional completa per la caracterització d'inici a fi de registres experimentals de corrents iònics de cardiomiòcits auriculars en un muntatge experimental de pinçament de membrana (*patch clamp*) amb configuració de cèl·lula completa (*whole cell*).
- El mètode computacional permet processar els corrents iònics que circulen a través de la membrana del cardiomiòcit i poder visualitzar-los i caracteritzar-los quantitativament. El mètode inclou; a) representació gràfica dels corrents iònics, b) mesura de la inactivació dels canals iònics c) Mesura del transport de calci. d) Mesura de l'alternança batec-batec.
- S'ha presentat una nova mesura, anomenada índex d'alternança, que permet quantificar la incidència de l'alternança en la regulació batec-batec (*beat to beat*) del cardiomiòcit.
- L'aplicació de l'índex d'alternança com indicador de disfuncions en la regulació batec-batec és significatiu quan es calcula per l'àrea sota la corba del senyal de calci.

Anàlisi dels resultats

- S'ha observat que els cardiomiòcits amb un patró batec-batec alternant, tenen una disminució de l'amplitud del corrent de calci tipus-L, I_{Ca} , fet que suggereix que cardiomiòcits amb una amplitud més petita del senyal

del corrent de calci poden ser més propensos a presentar patrons alternants.

- L'ús de la farmacologia que inhibeix de forma total o parcial l'activitat del corrent de calci tipus-L, I_{Ca} , pot ser una solució per tal de regular la resposta alternant cap a una resposta uniforme.

Capítol 3. Escala cel·lular

- S'han analitzat els avantatges de la metodologia DIC aplicada a cardiomiòcits amb contracció espontània. Aportant, nova eina de caràcter clarament no invasiu, respecte als mètodes convencionals invasius basats en la instal·lació de sensors de força o desplaçament i que provoquen interferències respecte la lliure resposta del cardiomiòcit. Aquesta nova eina pot ser utilitzada en medicina regenerativa cardíaca, per avaluar el desenvolupament de cardiomiòcits amb contracció espontània.
- S'ha presentat i validat una plataforma computacional DIC completa per a la determinació del camp de desplaçaments (u i v) i deformacions (E_{xx} , E_{yy} i E_{xy}). La textura natural del cardiomiòcit ha estat suficient pel correcte seguiment dels moviments mitjançant la implementació d'un doble coeficient de correlació entre imatges consecutives
- S'ha comprovat la robustesa del sistema respecte als moviments de sòlid rígid de translació i rotació. Aquest aspecte és important, ja que la metodologia resulta insensible a l'orientació inicial de la cèl·lula al microscopi i el seu lliure moviment durant la contracció. També s'ha comprovat l'exactitud de la metodologia DIC imposant una deformació sintètica predefinida i comparant els resultats obtinguts
- S'ha aplicat la metodologia DIC a unes imatges reals de cardiomiòcits sans i s'ha comprovat que la deformació dominant és clarament una contracció sobre l'eix cel·lular. Així, es conclou que la possible distorsió angular i també la flexió són menystenibles. A més, s'ha comprovat que les deformacions són acceptablement uniformes, especialment a la fase de màxima contracció. Ara bé, s'ha detectat una certa manca d'uniformitat al principi i final del període. Addicionalment, s'ha calculat l'evolució de la longitud del sarcolemma amb independència de la seva orientació

- De forma original, s'ha treballat amb les deformacions i direccions principals, i també s'ha definit un paràmetre de deformació equivalent, E_{equiv}^{x-y} , que resulta insensible a l'orientació dels eixos de treball i que serveix per a caracteritzar el nivell de deformació global del cardiomiòcit
- Finalment, de forma original, s'ha efectuat la correlació global entre el nivell de deformació equivalent, E_{equiv}^{x-y} , i l'alliberament de calci, Ca^{2+} , durant un recull de contraccions. S'ha observat l'existència d'un retard entre senyals i una diferència rellevant respecte a les velocitats de contracció i relaxació respectives.

Capítol 4. Escala teixit

Mètode per a l'anàlisi de dades de contracció mecànica

- S'ha validat el correcte funcionament del programa sota una experiment senzill i controlable, consistent en l'augment consecutiu de la freqüència de l'estimulació elèctrica.
- La capacitat del programa per mesurar els paràmetres no s'ha vist obstaculitzada per les freqüències elevades d'estimulació.
- S'ha observat una disminució dels paràmetres del senyal de contracció relacionats amb l'amplitud de la contracció, l'interval inter-contràctil (*ICI*) i el temps fins el pic (*time-to-peak*, *ttp*) amb una situació d'augment de la freqüència cardíaca (taquicàrdia). Així, els resultats obtinguts encaixen majoritàriament amb els postulats de la teoria de la FFR negativa.
- S'ha produït un augment dels batecs per minut (BPM) en una situació de disminució de la freqüència cardíaca (bradicàrdia).

Anàlisi de resultats

A. Efecte farmacològic: activació muscarínica.

Batecs per minut (BPM)

- En les aurícules dretes, l'administració consecutiva de concentracions ascendents de carbacol (CCH) produeix una disminució de les contraccions (BPM) en les aurícules dretes dels ratolins OF1.
- En les aurícules esquerres (estimulades), l'administració de $10^{-4}M$ d'atropina (Atr) restableix ràpidament la taxa de contracció original (CON).
- En les aurícules dretes, les concentracions ascendents de carbacol (CCH) i $10^{-4}M$ d'atropina (Atr) no produeixen un efecte estadísticament significatiu sobre la freqüència de les contraccions.
- La ràpida reducció de la velocitat i la força de la contracció observada després de concentracions superiors a $10^{-7}M$ és el resultat de l'efecte acumulatiu dels canals de sodi i l'obertura dels canals potassi GIRK.
- L'estimulació elèctrica de les aurícules fa la funció d'un marcapassos artificial que manté constant la taxa de batecs malgrat l'ús de farmacologia parasimpàtica, com el carbacol (CCH).
- La reducció de l'amplitud de la contracció tant a les mostres de l'aurícula esquerra com a les mostres de l'aurícula dreta, evidencien, que tant les cèl·lules marcapassos com les no marcapassos tenen receptors muscarínics sensibles al carbacol (CCH).

Amplitud

- En les aurícules esquerra i dreta, l'administració consecutiva de concentracions ascendents de carbacol (CCH) produeix una disminució de l'amplitud de la contracció.
- L'administració de $10^{-4}M$ d'atropina (Atr) restableix ràpidament l'amplitud de la contracció original (CON).

Full Width at Half Maximum (FWHM)

- En les aurícules dretes, a partir d'una concentració de $10^{-6}M$ carbacol (CCH) produeixen una disminució sobre la duració de la contracció, aquest fet està relacionat amb l'efecte sobre les cèl·lules marcapassos de l'aurícula dreta.

- L'administració de $10^{-4}M$ d'atropina (Atr) restableix ràpidament la duració de la contracció original (CON).

B. Efecte patològic: hipòxia

Batecs per minut (BPM)

- No s'ha observat una variació estadísticament significativa dels batecs per minut (BPM) en cap de les dues aurícules dels ratolins OF1.

Amplitud

- S'ha observat una disminució de l'amplitud de la contracció deguda a l'efecte d'hipòxia tant a l'aurícula esquerra com a la dreta.

Mètode per la classificació i detecció d'anomalies

- No s'han trobat estudis previs a la literatura on la metodologia de classificació o detecció d'anomalies s'apliqui a la contracció mecànica del teixit cardíac.
- Malgrat que el senyal de contracció mecànic té una alta relació senyal-soroll i molta variabilitat biològica, obtenim una precisió màxima del 100% en el cas del classificador i un 99% en el cas de detector d'anomalies.

Mètode per a la classificació

- S'ha construït un conjunt de dades sintètiques (*dataset*) que han permès modelitzar de forma realista dades normals i 7 tipus diferents de senyals anòmals observats en el registre experimental de les aurícules cardíques del ratolí.
- S'han calculat un total de 19 característiques que inclouen característiques temporals (*temporal features*), característiques freqüencials (*freuquencial features*) i característiques no lineals basades en la teoria del caos (*non-linear features*).
- S'ha presentat una metodologia de detecció d'anomalies basada en l'extracció de característiques (*features*) i una bateria de classificadors d'aprenentatge automàtic clàssic (*Machine Learning*), i una altra basada en aprenentatge automàtic (*Deep Learning*). S'ha obtingut una millor

precisió màxima (*accuracy*) (100 %) per la metodologia basada en aprenentatge profund respecte a la precisió màxima obtinguda amb aprenentatge automàtic (99.4%).

Mètode per la detecció d'anomalies

- S'han presentat dues metodologies de detecció d'anomalies en el teixit cardíac basades en aprenentatge profund (*Deep Learning*). En el primer detector s'ha utilitzat una xarxa neuronal recurrent (RNN) de tipus memòria a curt termini (LSTM), mentre que el segon detectot utilitza un codificador automàtic (autoencoder).
- La metodologia proposada pels detectors és només normal (*normal only*), perquè en l'entrenament de l'algorisme no es requereix etiquetar tot el conjunt de dades, sinó només les dades normals.

El senyal de contracció mecànica de pols anticipat (*early pulse*) és el senyal més difícil de detectar tant amb l'autoencoder com amb la xarxa LSTM.

- S'han validat els detector d'anomalies amb dades sintètiques realistes. El detector basat amb la xarxa LSTM és el que ha obtingut la millor precisió, amb uns valors màxims de l'índex de Sørensen–Dice Index SDI=71% per l'autoencoder i SDI=99% per la xarxa LSTM pel cas de l'anomalia de canvi d'amplitud.
- S'ha aplicat el detector amb millor precisió, és a dir, el detector basat amb una xarxa LSTM a dades experimentals reals. Malgrat no disposar d'un patró de veritat (*ground truth*) s'ha obtingut una detecció satisfactoria.

Futures línies de recerca

A continuació, es descriuen un recull d'idees que es podrien desenvolupar a mig termini. Aquestes idees representen la continuació natural de l'evolució de les aportacions d'aquesta tesi doctoral i obren pas a unes futures línies de recerca.

Capítol 2. Escala intracel·lular

- **Interfície gràfica d'usuari d'electrofisiologia.** Crear una interfície gràfica d'usuari (GUI) amb un fitxer autoexecutable que permeti analitzar els senyals dels experiments dels experiments d'electrofisiologia de pinçament de membrana (*patch clamp*) de manera fàcil i immediata, sense necessitat de tenir coneixements de programació.
- **Estudi poblacional.** Utilitzar les eines d'anàlisi i el biomarcador d'identificació del grau d'alternança desenvolupat en aquest capítol en una població més gran, per tal poder extreure conclusions clíniques a nivell poblacional.

Capítol 3. Escala cel·lular

- **Estudi dels cardiomiòcits singulars.** En aquesta tesi s'ha aplicat i validat la metodologia DIC a uns cardiomiòcits estàndards de ratolí (*Mouse Ventricular Myocytes*, MVM). Es proposa l'aplicació de la mateixa metodologia als cardiomiòcits singulars de ratolí, per exemple amb patologies o dopats amb fàrmacs. També a cardiomiòcits humans. La perspectiva d'ús d'aquesta metodologia DIC obre un camp molt interessant a la recerca cardiològica.
- **Zonificació topològica del cardiomiòcit.** Les propietats de la deformació i alliberament del calci s'han tractat a les conclusions de la tesi de forma ponderada i global dins la cèl·lula. Es proposa que les mateixes conclusions siguin validades en les diferents zones del cardiomiòcit mitjançant una zonificació topològica prèvia. Per exemple, la zona central i les zones dels extrems, o altrament, la zona central i la perifèrica. És possible que es poguessin detectar uns comportaments diferenciats o un sentit de propagació preferent arran d'aquest estudi de zones.

- **DIC assistit amb el mètode dels elements finits.** Combinació de DIC convencional assistit pel mètode dels elements finits (FEM) per assegurar la compatibilitat de les deformacions i que els resultats finals E_{xx} , E_{yy} i E_{xy} siguin coherents. Aquesta metodologia ha estat validada en imatges d'escuma, material que presenta grans deformacions i és híperelàstic com el cardiomiocit.

Capítol 4. Escala teixit

- **Intel·ligència artificial generativa.** Validar el nous paradigmes d'intel·ligència artificial generativa com les arquitectures basades en transformadors (*transformers*) per la detecció d'anomalies en teixit cardíac i comprovar si millora l'eficàcia de la detecció versus als detectats basats en aprenentatge profund (*Deep Learning*) amb arquitectura d'autoencoders i xarxes LSTM.
- **Creació d'un dataset clínic.** Crear un dataset amb dades experimentals etiquetat manualment per un expert per tal de validar diferents algoritmes per la detecció d'anomalies de contracció del teixit cardíac, enlloc d'utilitzar una base de dades (*dataset*) sintètica.

Llistat de publicacions

En aquest apartat es presenten les diferents publicacions científiques en revistes i congressos associades a cadascun dels capítols de la tesi. Entre parèntesis s'indica l'estat de la publicació.

Publicacions en revistes

Capítol 2. Escala intracel·lular

Marimon, X.; Cerrolaza, M.; Tarifa, M.; Hove-Madsen, L.; Benítez, R. *A novel methodology to characterize beat-to-beat alternations in whole membrane calcium currents*. *Cells*, 2023. **(Pendent d'enviar)**

Capítol 3. Escala cel·lular

Marimon, X.; Esquinas, F.; Ferrer, M.; Benítez, R. *A Non-Invasive Optical Framework for Concomitant Analysis of Contractility and Calcium in Single-Cell Cardiomyocytes*. *Bioengineering*, 2023. **(Pendent d'enviar)**

Cantó-Navés, O.; Marimon, X.; Ferrer, M.; Cabratosa-Termes, J. *Comparison between experimental digital image processing and numerical methods for stress analysis in dental implants with different restorative materials*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2021, 113, 104092.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104092>

Capítol 4. Escala teixit

Marimon, X.; Traserra, S.; Jiménez, M.; Ospina, A.; Benítez, R. *Detection of Abnormal Cardiac Response Patterns in Cardiac Tissue Using Deep Learning*. *Mathematics*, 2022, 10(15), 2786.

DOI: <https://doi.org/10.3390/math10152786>

Publicacions en congressos

Nolla-Colomer, C.; Marimon, X.; Herrainz, A.; S. R. W. Chen; Hove-Madsen, L.; Benítez, R.; *Multi-scale characterization of calcium release patterns in cardiac physiology*. 2018. Spanish Portuguese Meeting for Advanced Optical Microscopy, Granada, Spain.

Marimon, X.; Vallmitjana, A.; Jones, P.; Benítez, R. *A New User-Friendly Tool for Localizing Spots in Fluorescence Microscopy Images*. 2015. The 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). Milano, Italia.