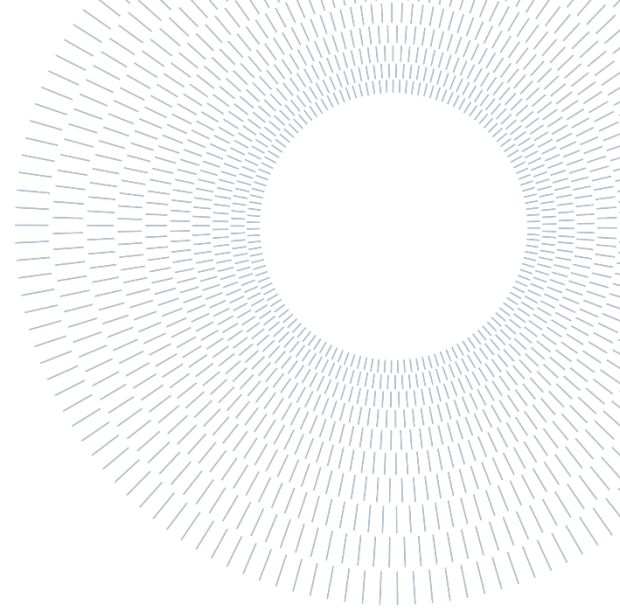




POLITECNICO
MILANO 1863

SCUOLA DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
E DELL'INFORMAZIONE



EXECUTIVE SUMMARY DELLA TESI

Effetti Aritmogeni della Penetrazione Transmurale del Fat Secretome nel Tessuto Atriale: uno Studio Computazionale

TESI MAGISTRALE IN BIOMEDICAL ENGINEERING – INGEGNERIA BIOMEDICA

AUTORE: VERONICA BERGUI

RELATORE: JOSE FELIX RODRIGUEZ MATAS

CO-RELATORE: CHIARA CELOTTO

ANNO ACCADEMICO: 2025-2026

1. Introduzione

Il tessuto adiposo epicardico (EAT) svolge funzioni cardioprotettive, come riserva energetica locale, protezione meccanica per le arterie coronarie, e termoregolazione [1]. Tuttavia, obesità, invecchiamento e malattie cardiovascolari promuovono l'espansione e il rimodellamento fenotipico dell'EAT, trasformandolo in una sorgente di segnali pro-infiammatori e pro-fibrotici [1]. L'EAT è inoltre strettamente associato alla fibrillazione atriale (AF), poiché contribuisce alla formazione di un substrato aritmogeno e al rimodellamento atriale [1].

L'EAT rappresenta anche un organo endocrino e paracrina attivo che secerne *fat secretome* (FS), un insieme di molecole il cui profilo, in condizioni patologiche, assume caratteristiche pro-infiammatorie e pro-fibrotiche [1]. Gli effetti aritmogeni dell'EAT dipendono anche da modificazioni dirette delle proprietà

elettrofisiologiche dei cardiomiociti indotte dai fattori presenti nel FS [1].

Esperimenti su cardiomiociti atriali di ratto esposti a mezzo condizionato derivato da EAT hanno evidenziato alterazioni del potenziale d'azione (AP) [2], sintetizzate nella Tabella 1.1.

	Variazione % rispetto al caso controllo
RMP	+10%
APD90	+20%
APD50	No variazione significativa
APD20	No variazione significativa
Amplitude	-15%
Velocità di upstroke	-67%

Tabella 1.1 Risultati effettuati da Ernault et al. [2] riportati come variazione % rispetto al caso controllo, ovvero per miociti atriali neonatali di ratto con mezzo condizionato da cardiomiociti.

L'esposizione al FS è associata a un aumento delle correnti I_{Na} e I_{CaL} , e a una riduzione delle correnti I_{K1} e I_{Kr} [2]. L'EAT può anche rimodellare le *gap junctions* (GJs), riducendo l'accoppiamento elettrico intercellulare e aumentando l'eterogeneità

della conduzione [1]. L'insieme di queste alterazioni, associato all'ambiente infiammatorio locale, determina una riduzione della velocità di conduzione (CV) [2].

La distribuzione non uniforme dell'EAT e dei suoi effetti biologici genera eterogeneità spaziale delle proprietà elettrofisiologiche, favorendo blocchi unidirezionali e l'instaurarsi di circuiti di rientro multipli.

2. Obiettivo dello studio

L'obiettivo di questa tesi è investigare il ruolo della penetrazione transmurale degli effetti del FS nello sviluppo e nel mantenimento dell'AF mediante simulazioni computazionali dell'attività elettrica atriale. A tal fine, vengono valutati gli effetti del *secretome* sulle proprietà elettrofisiologiche del tessuto atriale e sulla sua suscettibilità all'insorgenza e al mantenimento di aritmie.

Le simulazioni sono state eseguite utilizzando il modello elettrofisiologico atriale di Courtemanche-Ramirez-Nattel in diversi contesti computazionali: simulazioni cellulari (0D), modello monodimensionale (1D) e modello tridimensionale (3D) degli atri. In quest'ultimo, le regioni di tessuto adiposo sono state ricostruite a partire da dati anatomici derivati da pazienti.

3. Materiali e metodi

3.1. Modello cellulare

Il modello cellulare utilizzato, basato su quello atriale umano in silico descritto da Courtemanche-Ramirez-Nattel, è stato calibrato al fine di riprodurre gli effetti del modellamento elettrofisiologico dei miociti indotto dal FS riportati in letteratura [2] e sintetizzati nella Tabella 1.1.

Per simulare il rimodellamento elettrico indotto dall'AF, sulla base del modello di Courtemanche-Ramirez-Nattel, sono state ridotte le correnti I_{to} , I_{CaL} e I_{Kur} del 50%, 70% e 50%, rispettivamente.

Dunque, sono stati considerati i seguenti quattro casi: Control e Fat, entrambi con e senza rimodellamento elettrico.

Per i casi Fat sono state ridotte del 40% le correnti I_{K1} e I_{Na} , e sono state incrementate del 20% I_{Kr} e I_{Ks} . La riduzione di I_{K1} ha permesso di ottenere un incremento del RMP vicino al 10% riportato in

Tabella 1.1. La riduzione di I_{Na} è stata invece desunta dai risultati sperimentali riportati in [2]. Infine, si è reso necessario incrementare del 20% le correnti I_{Ks} e I_{Kr} , in contrasto con quanto riportato in letteratura [3], poiché l'aumento di I_{K1} e di I_{Na} determinava un allungamento eccessivo dell'AP. L'incremento di I_{Ks} e di I_{Kr} ha quindi consentito di compensare tale effetto, permettendo di ottenere caratteristiche dell'AP in accordo con quelle riportate in [2].

Al fine di raggiungere lo *steady state*, per ciascuna simulazione sono stati applicati due protocolli di stimolazione: Protocollo A, con *Basic Cycle Length* (BCL) di 0.8 s per una durata di 20 minuti; Protocollo B, con BCL=1 s per una durata di 25 minuti.

Infine, l'analisi è stata condotta considerando cellule appartenenti alle seguenti regioni atriali: Crista Terminalis e fascio di Bachmann (CT/BB), auricola sinistra (LAA), atrio sinistro (LA), vene polmonari (PV), auricola destra (RAA), atrio destro (RA), anello della valvola tricuspidale (TVR), anello della valvola mitrale (MVR).

3.2. Modello 1D

Il modello 1D è formato da un segmento di tessuto atriale lungo 2 cm, discretizzato in 100 elementi lineari, per un totale di 101 nodi, con dimensine di griglia $\Delta x=0.02$ cm.

La conduttività è stata calibrata sulla base dei risultati sperimentali riportati in [2], in cui è stata osservata una riduzione della CV del 33.5% in presenza degli effetti del FS.

Per garantire il raggiungimento dello *steady state*, sono stati applicati 100 stimoli consecutivi all'estremità iniziale del cavo con BCL pari a 800 ms. Al termine di questa fase è stato valutato il periodo refrattario (ERP) mediante un protocollo di stimolazione prematura S1-S2. In particolare, dopo il treno di stimoli S1 è stato applicato uno stimolo prematuro S2, variando progressivamente l'intervallo di accoppiamento S1-S2 tra 700 ms e 100 ms. L'ERP è stato infine definito come l'intervallo più lungo di accoppiamento per cui lo stimolo S2 non produceva una propagazione dell'attivazione in almeno uno dei 5 nodi equidistanti di osservazione considerati.

Infine, è stato applicato un protocollo di restituzione dinamico per valutare la dipendenza dell'APD dalla frequenza di stimolazione. Il protocollo consisteva nell'applicazione di treni di

100 stimoli a valori progressivamente decrescenti di BCL, compresi tra 1000 ms e 250 ms (BCL pari a 1000 ms, 800 ms, 700 ms, 600 ms, 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms, 275 ms e 250 ms). Per ciascun blocco di BCL, è stata calcolata la media e la deviazione standard delle APD90, APD80 e APD50 degli ultimi 10 stimoli. I valori ottenuti sono stati quindi utilizzati per costruire le curve di restituzione di APD90, APD80 e APD50.

3.3. Modello 3D

3.3.1. Modello computazionale

L'anatomia del modello 3D è stata definita come in [4] e discretizzata mediante una *mesh* multistrato costituita da elementi esaedrici lineari con lunghezza media dei bordi di 300 μm . Lo spessore della parete, compreso tra 600 e 900 μm , è composto da 2 o 3 strati di elementi, per un totale di 754'893 nodi e 515'010 elementi. Il modello include una descrizione dettagliata della direzione delle fibre e dell'eterogeneità funzionale, distinguendo otto regioni con differenti proprietà elettrofisiologiche: LA, RA, LAA, RAA, PV, TVR, MVR, e CT/BB. Le proprietà cellulari sono descritte mediante il modello cellulare di Courtemanche-Ramirez-Nattel, adattato alle diverse regioni attraverso variazioni delle conduttanze ioniche come riportato in [4]. Infine, sono state integrate le modifiche elettrofisiologiche cellulari e tissutali descritte nei paragrafi 3.1 e 3.2.

3.3.2. Studio clinico

Sono state utilizzate le immagini di tomografia computerizzata (CT) biatriali dei pazienti inclusi nel progetto PERSUADE. Lo studio comprendeva N=20 pazienti reclutati consecutivamente dall'Hospital Universitario Puerta del Mar (Cádiz, Spagna), tutti affetti da AF persistente (psAF) e candidati a un'ablazione transcateretere de novo, senza precedenti procedure di ablazione. Prima dell'inclusione nello studio, tutti i partecipanti hanno fornito il proprio consenso informato scritto. Il protocollo dello studio è stato approvato dal comitato etico competente ed è stato condotto in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki.

A partire dalle immagini della parte dei pazienti del campione per cui avevamo le segmentazioni sia dell'atrio destro che del sinistro, sono state calcolate le percentuali di grasso rispetto alla superficie epicardica atriale totale (Tabella 3.1).

Paziente	Percentuale di grasso [%] atrio sinistro	Percentuale di grasso [%] atrio destro
P001	9.08	11.69
P005	8.08	28.69
P006	11.57	10.33
P008	16.13	18.23
P018	19.21	29.54
P020	17.39	21.83

Tabella 3.1 Percentuale di tessuto adiposo rispetto alla superficie epicardica atriale totale dei pazienti.

L'analisi si è poi concentrata sui pazienti P001 e P018, selezionati in quanto rappresentativi, rispettivamente, della minima e della massima percentuale di tessuto adiposo in entrambi gli atri.

Successivamente, sono state estratte le regioni di grasso dei pazienti e mappate nel modello 3D degli atri. Su tale base, sono stati definiti tre diversi livelli di infiltrazione di FS: Livello 1 (nodi appartenenti alla superficie esterna); Livello 2 (Livello 1 + nodi degli elementi adiacenti); Livello 3 (ulteriore estensione del Livello 2).

3.3.3. Finestra di vulnerabilità e frequenze di attivazione locali

La finestra di vulnerabilità è stata valutata mediante un protocollo di stimolazione prematura S1-S2, per 1600 ms di simulazione in totale. Il protocollo prevede una fase iniziale di condizionamento costituita da un treno di 10 stimoli con BCL pari a 800 ms, applicati in una regione corrispondente al nodo senoatriale al fine di stabilizzare l'attivazione del tessuto. Al termine del treno di condizionamento, viene applicato uno stimolo S1 lungo una linea di stimolazione estesa, seguito da uno stimolo prematuro S2 erogato in una seconda regione di stimolazione distinta (Figura 3.1). L'intervallo di accoppiamento tra l'ultimo stimolo S1 e lo stimolo prematuro S2 è stato progressivamente variato al fine di individuare i valori in grado di indurre attività rientrante sostenuta. La finestra di vulnerabilità è stata quindi definita come l'intervallo di accoppiamento S1-S2 compreso tra il valore minimo e il valore massimo per cui si osservava l'innesco di un circuito di *reentry*.

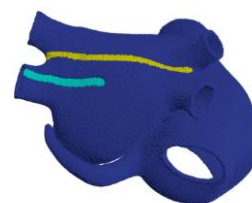


Figura 3.1 Posizione della stimolazione S1 (giallo) e della stimolazione S2 (ciano).

Nei casi di *reentry* più sostenute di ciascun caso analizzato, è stata effettuata un'analisi delle frequenze di attivazione locali, calcolate come l'inverso del Δt tra due attivazioni successive nello stesso punto, identificati come i picchi della derivata temporale del potenziale di transmembrana.

3.4. Software di simulazione

I modelli cellulare sono stati sviluppati in MATLAB (R2022b, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) e posteriormente implementati nel software ELVIRA [5] per le simulazioni monodominio 1D e 3D.

4. Risultati

4.1. Modello cellulare

Nelle Tabelle 4.1 e 4.2 vengono riportate le variazioni percentuali dei parametri dell'AP presi in esame e descritti nella sezione 3.1, calcolate nel caso Fat rispetto al caso Control per il protocollo di stimolazione A (BCL=0.8 s), sia in presenza sia in assenza di rimodellamento elettrico. I risultati nel caso di protocollo di stimolazione B (BCL = 1 s) erano comparabili.

	CT/BB	LAA	LA	PV	RAA	RA	TVR	MVR	Target
RMP	+5.4%	+4.7%	+5.5%	+5%	+5.3%	+6.3%	+6.2%	+5.7%	+10%
APD90	+28.1%	+26.8%	+34.1%	+30.9%	+31.3%	+35.7%	+41.4%	+36.3%	+20%
APD50	+29.8%	+29.7%	+41.7%	+38.3%	+32.9%	+43.5%	+52.5%	+45.3%	~ 0
APD20	+48.7%	+55.6%	+44.7%	+48.8%	+53%	+44.6%	+34.5%	+35.7%	~ 0
Amplitude	-15.1%	-14.2%	-14.9%	-14.4%	-14.8%	-15.6%	-15.4%	-14.7%	-15%
Upstroke velocity	-36.2%	-34.4%	-35.5%	-34.5%	-35.5%	-37%	-36.2%	-35.1%	-67%

Tabella 4.1 Variazioni percentuali dei parametri considerati rispetto al caso Control per il protocollo di stimolazione A nel caso senza rimodellamento elettrico.

	CT/BB	LAA	LA	PV	RAA	RA	TVR	MVR	Target
RMP	+6.1%	+5.7%	+6.3%	+5.7%	+6.3%	+7.1%	+7.9%	+7.1%	+10%
APD90	+29.5%	+23.2%	+31.9%	+26.9%	+27.6%	+36%	+34.3%	+27.4%	+20%
APD50	+31.3%	+25.5%	+35.4%	+29.6%	+30.4%	+39.9%	+38.7%	+32.7%	~ 0
APD20	+53%	+48.7%	+42%	+42.6%	+50.9%	+42.6%	+33.3%	+35.4%	~ 0
Amplitude	-15.7%	-15.2%	-15.7%	-15.1%	-15.9%	-16.4%	-18%	-17.1%	-15%
Upstroke velocity	-37%	-35.8%	-36.7%	-35.7%	-37%	-38.2%	-41.7%	-40%	-67%

Tabella 4.2 Variazioni percentuali dei parametri considerati rispetto al caso Control per il protocollo di stimolazione A nel caso con rimodellamento elettrico.

4.2. Modello 1D

Al fine di riprodurre i risultati osservati in letteratura [2] e descritti nel paragrafo 3.2, la conducibilità è stata calibrata separatamente per i casi Control e Fat. I valori finali adottati sono stati pari a 0.0038 S/m e 0.0028 S/m, rispettivamente. La riduzione della conducibilità nei casi Fat è stata introdotta per modellare gli effetti del rimodellamento strutturale, in particolare l'alterazione delle GJs.

4.2.1. CV ed ERP

A partire dalla variazione di tempo di attivazione (Δt) degli ultimi due stimoli nel secondo e penultimo nodo di output, e dal passo spaziale tra i due suddetti nodi (Δx), è stata calcolata la CV come: $CV = \frac{\Delta x}{\Delta t}$. I valori di CV ed ERP ottenuti sono riportati in Tabella 4.3.

	CV (cm/s)	ERP (ms)
Control senza rimodellamento	90.9	226
Control con rimodellamento	93.5	191
Fat senza rimodellamento	62.1	363
Fat con rimodellamento	62.5	313

Tabella 4.3 Valori di CV ed ERP ottenuti.

4.2.2. Curve di restituzione

Nella Figura 4.1 vengono riportate le curve di restituzione APD50, APD80 e APD90 per i quattro casi analizzati. Nel caso Fat in assenza di rimodellamento elettrico (Figura 4.1.C), la curva di restituzione è stata riportata fino a BCL=400 ms. Per valori inferiori di BCL non è stata osservata una propagazione 1:1 lungo il cavo, ma il blocco di un impulso ogni due stimoli; pertanto, tali punti non sono stati inclusi nell'analisi.

4.3. Modello 3D

Nella Tabella 4.4 vengono riportati i valori delle finestre di vulnerabilità relativi al caso Control e ai due pazienti P001 e P018, distinti in funzione dei diversi livelli di penetrazione trasmurale degli effetti del FS e considerati sia in presenza sia in assenza di rimodellamento elettrico.

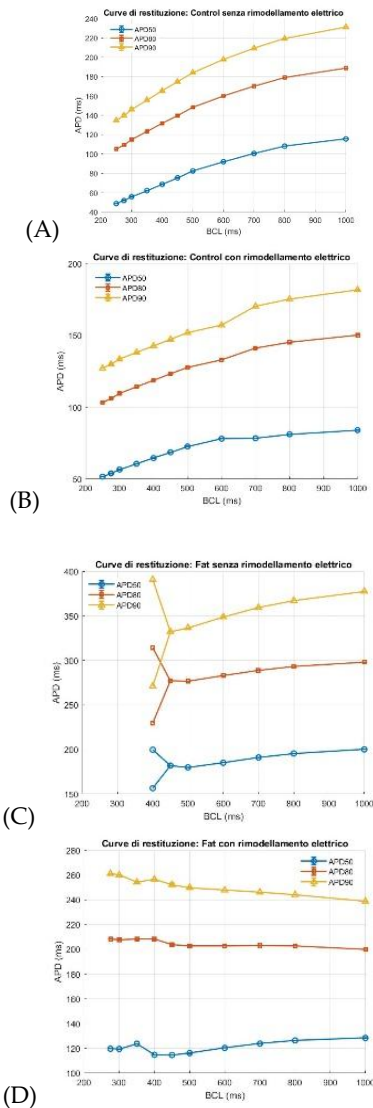


Figura 4.1 Curve di restitutione APD50, APD80 e APD90 per i casi: (A) Control senza rimodellamento elettrico; (B) Control con rimodellamento elettrico; (C) Fat senza rimodellamento elettrico; (D) Fat con rimodellamento elettrico.

	CONTROL	P001_1	P001_2	P001_3	P018_1	P018_2	P018_3
Senza rimodellamento elettrico	7 ms	0 ms	3 ms	17 ms	0 ms	13 ms	1 ms
Con rimodellamento elettrico	8 ms	0 ms	3 ms	5 ms	0 ms	0 ms	14 ms

Tabella 4.4 Risultati calcolo finestre di vulnerabilità per i casi Control e per i due pazienti (P001 e P018) suddivisi per i diversi livelli di penetrazione del FS (_1, _2 e _3), con e senza rimodellamento elettrico.

Nella Figura 4.2 vengono riportate la media e la deviazione standard delle frequenze dominanti di attivazione per ciascun caso analizzato. In generale, la frequenza dominante per il caso control è risultata leggermente inferiore rispetto ai

casi con rimodellamento elettrico e Fat con rimodellamento elettrico, anche se le differenze sono state al di sotto del 15%

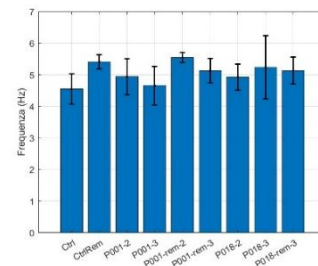


Figura 4.2 Media e deviazione standard delle frequenze di attivazione locali calcolate per i casi.

5. Discussione

Nel modello 0D, la diversa frequenza di stimolazione non ha modificato in modo sostanziale l'effetto del grasso sui markers dell'AP. Inoltre, per tutti i parametri è stato possibile riprodurre quasi correttamente il target, ad eccezione delle APD20 e APD50, la cui variazione è risultata maggiore rispetto a quella attesa.

Le modifiche indotte dal FS hanno determinato un prolungamento dell'ERP, riducendo l'eccitabilità cellulare e rendendo il tessuto più suscettibile a fenomeni di blocco della conduzione, soprattutto in presenza di eterogeneità spaziale. Tali condizioni possono favorire l'insorgenza di meccanismi di rientro, in particolare nelle regioni circostanti con proprietà elettrofisiologiche differenti.

Nel modello 1D, il FS ha determinato una riduzione della CV. Nei casi Fat è stata osservata una diminuzione della CV del 31.7% in assenza di rimodellamento elettrico e del 33.2% in presenza di rimodellamento elettrico, in accordo con la letteratura [2]. Tale effetto è stato riprodotto combinando le modifiche elettrofisiologiche indotte dal FS con una riduzione dell'accoppiamento intercellulare.

È stato osservato per i casi Fat valori di ERP maggiori rispetto ai corrispondenti casi Control, sia in presenza sia in assenza di rimodellamento elettrico. Il rimodellamento elettrico indotto dall'AF è associato invece a una diminuzione dell'ERP.

Tali differenze evidenziano come il FS e il rimodellamento elettrico influenzino in modo significativo le proprietà refrattarie del tessuto atriale. Tuttavia, l'effetto sulla vulnerabilità aritmica non dipende esclusivamente dall'ERP, ma

anche dall'interazione con altri parametri elettrofisiologici, in particolare la CV.

Dall'analisi delle curve di restituzione è emerso che, nei casi Control e nel caso Fat in assenza di rimodellamento elettrico, l'APD aumenta all'aumentare del BCL, in accordo con quanto previsto dalla teoria. Per il caso Fat senza rimodellamento, inoltre, per BCL inferiori a 400 ms si è osservata una perdita della conduzione 1:1, con propagazione di un impulso ogni due stimoli, indicativa di un recupero elettrofisiologico incompleto del tessuto. Nel caso Fat in presenza di rimodellamento elettrico, invece, la variazione dell'APD al diminuire del BCL è risultata più contenuta rispetto agli altri casi, suggerendo una ridotta capacità del tessuto di adattarsi ad elevate frequenze di stimolazione.

Nel modello 3D, la presenza di rimodellamento elettrico nel caso Control ha determinato un lieve aumento della finestra di vulnerabilità. In presenza di FS, invece, non è emerso un comportamento univoco, suggerendo che l'interazione tra rimodellamento elettrico e FS sia complessa e fortemente dipendente dalle caratteristiche anatomiche e strutturali specifiche del substrato.

Per il paziente P001 si è riscontrato un aumento della finestra di vulnerabilità all'aumentare dell'infiltrazione di FS, particolarmente evidente in assenza di rimodellamento elettrico.

Al contrario, nel paziente P018 non è emerso una tendenza specifica. In assenza di rimodellamento elettrico, è stata osservata una finestra di vulnerabilità ampia per il livello 2 di infiltrazione, andandosi poi ad assottigliare con un aumento dell'infiltrazione di FS. Per il caso con rimodellamento elettrico, invece, sono state osservate delle *reentry* sostenute esclusivamente per il livello 3 di infiltrazione.

In generale, nei casi con rimodellamento elettrico sono state osservate *reentry* più sostenute, indicando che questo contribuisce a rendere il substrato elettrico più aritmogeno.

Dall'analisi delle frequenze dominanti di attivazione locali è emerso che il rimodellamento elettrico determina un lieve incremento delle frequenze, mentre l'effetto del FS non risulta uniforme tra pazienti e livelli di infiltrazione. Complessivamente, le frequenze si sono mantenute in un intervallo relativamente ristretto, con variazioni limitate tra i diversi casi analizzati.

6. Conclusioni

In conclusione, il Fat ha determinato, a livello cellulare, un aumento del RMP e dell'APD e una riduzione dell'*amplitude* e dell'*upstroke velocity*; a livello monodimensionale ha comportato una riduzione della CV e un aumento dell'ERP. Il rimodellamento elettrico ha amplificato le differenze tra Fat e Control osservate a livello cellulare, e ne ha parzialmente compensato gli effetti a livello monodimensionale. Nel modello tridimensionale esso ha inoltre favorito, quando presenti, dinamiche di *reentry* più sostenute e frequenze di attivazione locali maggiori. Tuttavia, tali modifiche non si traducono necessariamente in un aumento della probabilità di avere effetti proaritmici a livello dell'intero atrio. I risultati ottenuti suggeriscono infatti che l'interazione tra rimodellamento elettrico e FS sia complessa e fortemente dipendente dalle caratteristiche anatomiche e strutturali specifiche del substrato, evidenziando come l'aritmogenicità emerga dall'interazione tra proprietà elettriche e organizzazione spaziale del tessuto.

Bibliografia

- [1] L. C. Cook, M. D. Perry, A. P. Hill and J. Thorpe, "Methods to model epicardial adipose tissue-mediated atrial fibrillation," 2025.
- [2] A. C. Ernault, A. O. Verkerk, J. D. Bayer, K. Aras, P. Montañés-Agudo, R. A. Mohan, M. Veldkamp, M. R. Rivaud, R. de Winter, M. Kawasaki, S. C. M. van Amersfoort, E. R. Meulendijks, A. H. G. Driessen, I. R. Efimov, J. R. de Groot and R. Coronel, "Secretome of atrial epicardial adipose tissue facilitates reentrant arrhythmias by myocardial remodeling".
- [3] A. S. Aromolaran, U. Srivastava, A. Ali, M. Chahine, D. Lazaro, N. El-Sherif, P. L. Capecchi, F. Laghi-Pasini, P. E. Lazzarini and M. Boutjdir, "Interleukin-6 inhibition of hERG underlies risk for acquired long QT in cardiac and systemic inflammation," 2018.
- [4] A. Ferrer Albero, R. Sebastian Aguilar, D. Sanchez Quintana, J. F. Rodriguez, E. J. Godoy, L. Martinez and F. J. Saiz Rodriguez, "Detailed Anatomical and Electrophysiological Models of Human Atria and Torso for the Simulation of Atrial Activation," 2015.
- [5] E. A. Heidenreich, J. M. Ferrero, M. Doblaré and J. F. Rodriguez, "Adaptive Macro Finite Elements for the Numerical Solution of Monodomain Equations in Cardiac Electrophysiology," vol. 38, pp. 2331-2345, 2010.