



Universidad de Zaragoza



Centro Politécnico Superior

# Análisis de la memoria cardiaca a través de modelos de propagación eléctrica en miocitos de corazón humano

Autor: CARLOS SÁNCHEZ TAPIA

Directora: ESTHER PUEYO PAULES

Master en Ingeniería Biomédica, Curso 2008/2009  
Programa Oficial de Posgrado en Ingenierías Transversales

Septiembre 2009

**GTC**  
Communication  
Technologies Group

Departamento de Ingeniería  
Electrónica y Comunicaciones

## AGRADECIMIENTOS:

El presente Trabajo Fin de Máster ha podido llevarse a cabo gracias a las aportaciones de:

- Beca Lanzadera de Iniciación a la Investigación, Centro de Investigación Biomédica en Red, Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN).
- Proyecto TEC-2007-68076-C02-02 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.
- Grupo de Tecnologías de las Comunicaciones, Grupo Consolidado de la Diputación General de Aragón (T-30).
- Ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador de 2008, correspondiente al Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+i) 2008-2011, Ministerio de Educación y Ciencia.
- Leif Hove-Madsen y su Grupo de Investigación en Electrofisiología Celular del Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu de Barcelona, donde se llevó a cabo la parte práctica del proyecto, aportando un esencial e inestimable apoyo experimental a las simulaciones realizadas en el presente trabajo.

De manera especial, quiero expresar mi agradecimiento a Esther, directora de este Trabajo Fin de Máster, por las horas de trabajo dedicadas, por su impagable apoyo en todo momento, y, especialmente, por todo el interés que ha puesto en mi aprendizaje y formación como investigador.

También deseo agradecerle a Pablo sus sabios consejos, sus ideas, su amplia experiencia y su gran capacidad para dirigir un grupo de investigación como el nuestro.

Igualmente doy gracias a mis compañeros del Grupo de Tecnologías de las Comunicaciones porque han despertado en mí una gran ilusión por la investigación y me han ayudado a trabajar con interés y motivación.

No puedo olvidarme de mis compañeros de curso del Máster en Ingeniería Biomédica puesto que nunca pensé que pudiese pasar tan buenos ratos con ellos y consiguieron que la dureza del curso se hiciese mucho más llevadera.

Para terminar, agradezco y dedico este trabajo a toda mi familia y amigos, porque siempre han estado a mi lado cuando los he necesitado y me han apoyado de manera incondicional, en especial mis padres Carlos y Rosa, mi hermano David, y la persona más importante en mi vida, Lorena.

A todos ellos, gracias.

# Análisis de la memoria cardiaca a través de modelos de propagación eléctrica en miocitos de corazón humano

## RESUMEN

La adaptación anormal de la duración de los potenciales de acción (APD) a cambios en el ritmo cardiaco ha sido sugerida como indicador de aumento de riesgo arrítmico. En este trabajo, se investigan los mecanismos subyacentes a la adaptación del APD (memoria cardiaca) en células auriculares humanas y su relación con la probabilidad de arritmogénesis. Para la realización del trabajo se utiliza una metodología que combina simulaciones mediante modelos computacionales de potenciales de acción (AP) con registros experimentales. Los resultados de las simulaciones se validan con datos experimentales tanto disponibles en la literatura como registrados específicamente para este proyecto.

Se demuestra que la adaptación del APD en respuesta a cambios en el ritmo cardiaco (de 1 Hz se cambia a 1.67 Hz y, posteriormente, se vuelve a 1 Hz) tarda varios minutos en completarse, pudiendo identificar dos fases en la adaptación: una fase rápida inicial (cuya constante de tiempo asociada,  $\tau_{fast}$ , es de 7 s) relacionada con la corriente de calcio de tipo L ( $I_{CaL}$ ) y el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , seguida de una fase de acomodación lenta (constante de tiempo,  $\tau_{slow}$ , de 6 minutos) determinada por la dinámica intracelular de sodio. Los mecanismos de adaptación del APD son independientes del modelo de aurícula humana empleado y los resultados de simulación son consistentes con los obtenidos en estudios experimentales.

Alteraciones en los mecanismos iónicos que implican un mayor grado de memoria cardiaca están asociadas con un aumento del riesgo proarrítmico, cuantificado a través de biomarcadores electrofisiológicos preclínicos que describen: la probabilidad de reactivación de calcio, la triangulación del AP y las pendientes de restitución del APD evaluadas con diferentes protocolos. Se demuestra que una acomodación retardada del APD en respuesta a cambios en el ritmo cardiaco, como la descrita en pacientes que presentan insuficiencia cardiaca o daño isquémico, va acompañada de una reactivación más rápida de la corriente de calcio así como de APs con formas más triangulares, lo que conlleva un riesgo elevado de que se produzcan despolarizaciones que podrían dar lugar a la generación de arritmias cardiacas. Asimismo, se observa también una estrecha relación entre retardos en la adaptación del APD y alteraciones en las pendientes de las curvas de restitución que podrían favorecer la estabilidad de las arritmias cardiacas una vez que éstas se han iniciado.

En resumen, en este estudio se ha caracterizado la adaptación del APD, tanto en células individuales como en fibras unidimensionales de aurícula humana, y se han dilucidado los mecanismos subyacentes a este proceso de adaptación. Además se ha asociado la acomodación retardada del APD con la dinámica lenta de sodio intracelular, que a su vez se ha relacionado con un mayor riesgo proarrítmico, principalmente debido a una probabilidad más alta de generar posdespolarizaciones.

# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
1.1. ANTECEDENTES Y ESTUDIOS PREVIOS . . . . .	6
1.1.1. ACTIVIDAD ELÉCTRICA CELULAR . . . . .	6
1.1.2. MODELADO CARDIACO COMPUTACIONAL . . . . .	8
1.1.3. ARRITMIAS CARDIACAS . . . . .	9
1.1.4. MEMORIA CARDIACA . . . . .	9
1.2. OBJETIVOS . . . . .	10
<b>2. MÉTODOS</b>	<b>11</b>
2.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL . . . . .	11
2.1.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y MATERIAL . . . . .	11
2.1.2. ESTIMULACIÓN CELULAR . . . . .	14
2.1.3. OBTENCIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES . . . . .	14
2.2. MODELOS COMPUTACIONALES DE ELECTROFISIOLOGÍA CELULAR . . . . .	15
2.3. MODELO CELULAR DE AURÍCULA HUMANA . . . . .	16
2.4. MODELO DE TEJIDO AURICULAR HUMANO . . . . .	17
2.5. PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN CELULAR . . . . .	18
2.5.1. PERIÓDICO . . . . .	18
2.5.2. PACING . . . . .	18
2.5.3. S1-S2 . . . . .	18
2.5.4. DINÁMICO . . . . .	19
2.6. CUANTIFICACIÓN DE LA MEMORIA CARDIACA . . . . .	19
2.7. CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOFISIOLÓGICAS SIMULADAS . . . . .	20
2.8. MARCADORES PRECLÍNICOS DE RIESGO ARRÍTMICO . . . . .	21
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>22</b>
3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ADAPTACIÓN DEL APD . . . . .	22
3.2. MECANISMOS IÓNICOS DE LA ADAPTACIÓN . . . . .	24
3.3. VALIDACIÓN CON DATOS EXPERIMENTALES DE MIOCITOS DE AURÍCULA HUMANA . . . . .	27
3.4. COMPARACIÓN AURÍCULA-VENTRÍCULO . . . . .	29

3.5. RELACIÓN ENTRE MEMORIA CARDIACA Y RIESGO ARRÍTMICO . . . . .	30
3.6. RESULTADOS EN SIMULACIONES UNIDIMENSIONALES . . . . .	31
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
4.1. LIMITACIONES DEL ESTUDIO . . . . .	35
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>37</b>
<b>6. LÍNEAS FUTURAS</b>	<b>38</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. ANTECEDENTES Y ESTUDIOS PREVIOS

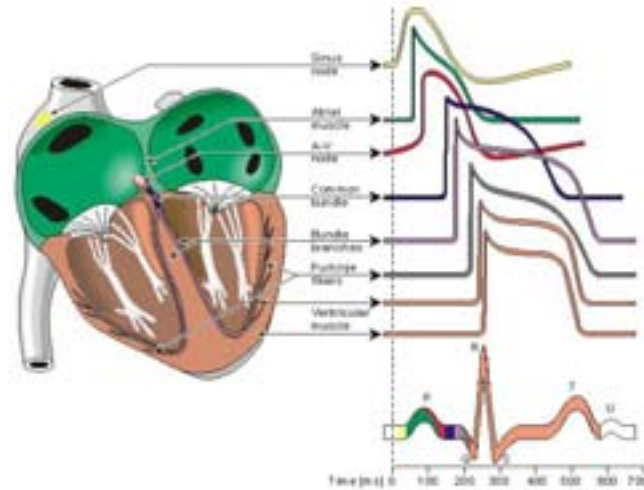
Las afecciones cardíacas y cardiovasculares constituyen hoy día una de las principales causas de muerte en España y Europa. En la Comunidad Autónoma de Aragón el 33.4% de los fallecimientos se deben a causas cardiovasculares, según el Instituto Nacional de Estadística, y cada año se producen más de 100.000 muertes en toda España por problemas relacionados con el corazón, como pueden ser la obstrucción de arterias coronarias principales o fallos en el sistema de conducción eléctrica del corazón que pueden implicar un bombeo inadecuado de sangre al resto del cuerpo. Es por ello que resulta de gran interés social y tecnológico desarrollar nuevos métodos que ayuden al diagnóstico y eventual terapia de las patologías cardíacas como las arritmias auriculares y ventriculares, que pueden desembocar en la muerte repentina del sujeto que las sufre.

El corazón es un músculo del tamaño de un puño cuya principal función es bombear sangre rica en oxígeno a todo el cuerpo. Su anatomía se divide en dos partes “espejadas”, izquierda y derecha, que a su vez se subdividen en otros dos compartimentos llamados aurícula y ventrículo, cavidades por las cuales entra y sale la sangre, respectivamente, en cada ciclo cardíaco.

Desde el punto de vista eléctrico, en el ciclo cardíaco se distinguen dos fases: despolarización y repolarización celular. Durante la primera, las células del miocardio manifiestan una rápida variación de su potencial eléctrico transmembrana (aproximadamente desde -85 hasta 20 mV en 1 ms de tiempo), el cual se define como la diferencia de potencial medida entre el medio intracelular y el medio extracelular. Inmediatamente después, se sucede la fase de repolarización mediante la cual el potencial transmembrana de las células recupera su valor de reposo inicial. Esta evolución del potencial transmembrana celular durante un ciclo cardíaco es lo que se denomina potencial de acción (AP). El AP posee diferentes características de morfología y duración dependiendo de la localización de la célula dentro del corazón. Además, a nivel de la superficie corporal, utilizando electrodos, es posible medir de forma conjunta la onda eléctrica que se genera, el electrocardiograma (ECG), el cual se obtiene debido a la propagación de los APs generados en el nodo sinoauricular, que lleva a la despolarización, en primer lugar, de los miocitos auriculares y, posteriormente, de los miocitos ventriculares. El resultado global de la activación (despolarización) y posterior recuperación (repolarización) de las distintas células del corazón puede representarse a través de un vector dominante que describe la dirección principal del impulso eléctrico. La proyección de este vector dominante, cuya amplitud y dirección varían en el tiempo, es directamente proporcional al ECG registrado en una derivación, la cual queda definida a partir de las posiciones de los electrodos utilizados para el registro (Figura 1) [1].

### 1.1.1. ACTIVIDAD ELÉCTRICA CELULAR

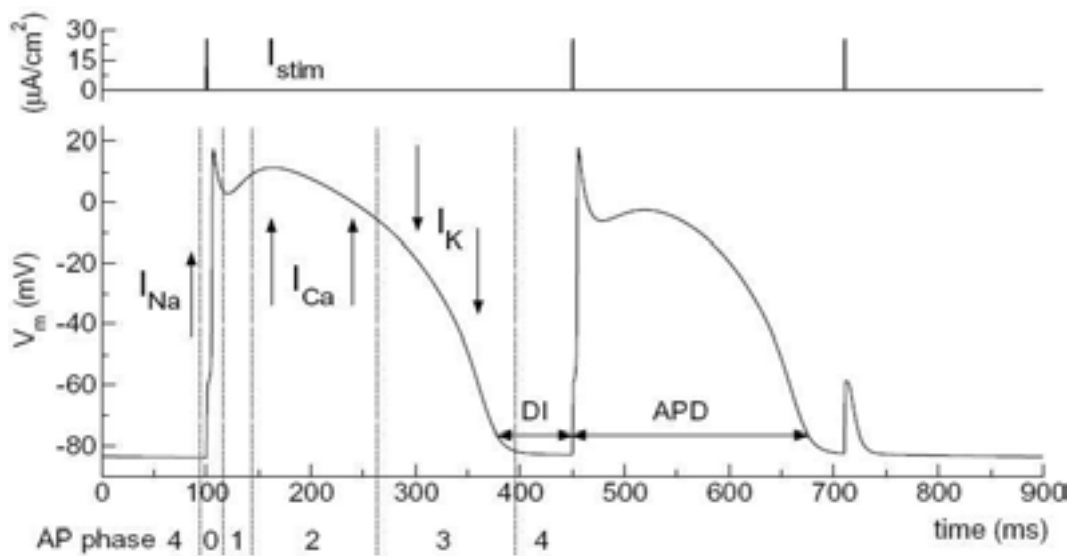
La actividad eléctrica cardíaca celular viene determinada por los intercambios de iones entre el interior de la célula y el medio extracelular, que inducen la existencia de un potencial eléctrico transmembrana, denotado por AP. A grandes rasgos y en función de los iones que permiten pasar, existen tres tipos de canales iónicos: canales de sodio ( $Na^+$ ), canales de potasio ( $K^+$ ) y canales de calcio ( $Ca^{2+}$ ). En cada AP se diferencian cinco fases: fase 0, impulso inicial debido al flujo de iones sodio, debido a la apertura de los correspondientes canales iónicos, generando  $I_{Na}$ ; fase 1, corrientes rápidas transitorias de iones potasio,  $I_K$ , que tienden a llevar el potencial al estado de reposo; fase 2, flujo de iones calcio hacia el interior de la célula creando corrientes lentas de calcio,  $I_{Ca}$ , compensando las de potasio; fase 3, cese de actuación de las corrientes de calcio y actuación de las corrientes lentas de potasio llegando el voltaje al estado de reposo (fase 4). Los APs tienen una duración temporal determinada que se denota como APD. El período temporal de recuperación de las corrientes iónicas



**Figura 1:** Electrofisiología del corazón. Potenciales de acción de diferentes células especializadas, y su contribución al electrocardiograma (tomado de [2]).

desde que termina un AP hasta que ocurre el siguiente estímulo se denomina intervalo diastólico (DI) (Figura 2).

Debido a las fuertes limitaciones éticas y prácticas que representa la experimentación *in vivo* sobre células de corazón humano, resulta de interés buscar formas de estudiar dichos comportamientos celulares esquivando estas dificultades. El modelado cardiaco computacional surge como una alternativa a la experimentación, tanto en especies animales como en humano, para el estudio de la electrofisiología celular.

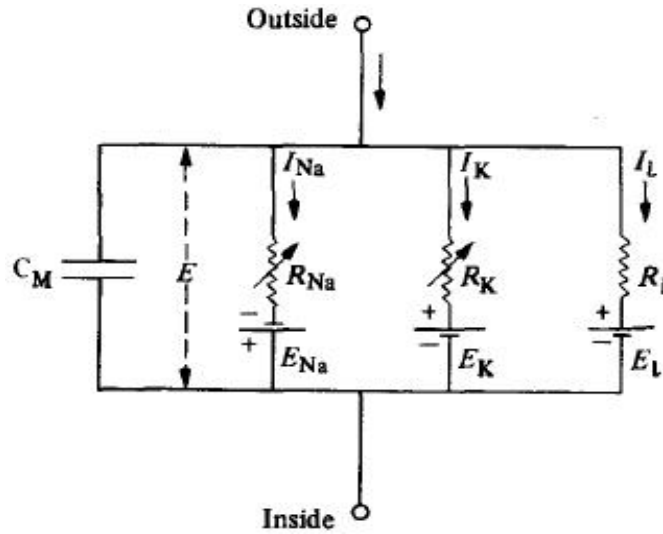


**Figura 2:** Secuencia de impulsos y potencial transmembrana en miocitos ventriculares de coballa. En el primer AP representado se indican las fases del potencial de acción (tomado de [3]).

### 1.1.2. MODELADO CARDIACO COMPUTACIONAL

El modelado cardiaco computacional representa una valiosa herramienta para comprender el funcionamiento del corazón a distintos niveles (molecular, iónico, celular, en tejido, en órgano) y dar respuesta al porqué de determinadas alteraciones fisiopatológicas cuyos mecanismos subyacentes están poco claros en la actualidad. Además, mediante esta herramienta se pueden comprobar múltiples hipótesis sin incurrir en ningún tipo de riesgo para el paciente. En este proyecto se ha trabajado con modelos que describen la actividad eléctrica cardiaca en miocitos de corazón humano, tanto en aurícula como en ventrículo.

La denominación de modelado proviene de la posibilidad de representar mediante un circuito eléctrico simple el comportamiento iónico de la membrana celular. En 1952, Alan Lloyd Hodgkin y Andrew Fielding Huxley realizaron un estudio sobre células nerviosas de calamar (utilizadas debido a su gran tamaño), gracias al cual lograron describir las corrientes iónicas que atraviesan la membrana celular mediante formulaciones que incluían detalles de las compuertas de activación e inactivación de las corrientes, potenciales de equilibrio y conductancias variables en el tiempo [4]. El circuito eléctrico equivalente de la membrana celular es una malla compuesta por varias ramas en paralelo que representan, por una parte, los diferentes tipos de canales iónicos (de  $Na^+$ , de  $K^+$ , y del resto de iones) descritos mediante fuentes de voltaje en serie con sus respectivas conductancias, y, por otra parte, un condensador que modela el comportamiento capacitivo de la membrana (Figura 3). Hodgkin y Huxley llevaron a cabo el estudio sobre neuronas, pero este trabajo sentó las bases para estudiar y modelar cualquier tipo de célula en el cuerpo, sin importar su naturaleza.



**Figura 3:** Modelo circuital de una membrana celular. Resistencias de Na y K variables, dependientes del tiempo y del potencial transmembrana, e inversas a las conductancias correspondientes [4].

La ecuación matemática que caracteriza este modelo circuital se puede escribir de la forma dada por :

$$C_m \frac{dV}{dt} + I_{Na} + I_K + I_L + I_{st} = 0, \quad (1)$$

donde  $V$  es la diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula;  $I_{Na}$ ,  $I_K$  e  $I_L$  son las diferentes corrientes iónicas, que en el modelo de Hodgkin y Huxley corresponden a la corriente total de sodio, la corriente total de potasio y la corriente total debida a otros iones, respectivamente;  $I_{st}$  es la corriente de estimulación; y  $C_m$  es el valor capacitivo de la membrana.



### 1.1.3. ARRITMIAS CARDIACAS

Las arritmias cardiacas, definidas como irregularidades en el ritmo natural del corazón, representan un serio problema clínico, especialmente en los países desarrollados. Existen diferentes tipos de arritmias clasificables atendiendo a su frecuencia (taquicardias o bradicardias) o a su origen en el corazón (auriculares o ventriculares).

Entre todas las variantes existentes, las generadas en la aurícula (fibrilación auricular, flutter auricular, ...) son las diagnosticadas en un mayor porcentaje de la población: entre el 0.4 y el 1% de la población en general, llegando a superar el 8% en pacientes mayores de 80 años. Es por esto que se prevé que su incidencia aumente progresivamente en este siglo, debido al envejecimiento de la población mundial gracias a los avances médicos. La consecuencia directa de la fibrilación auricular (AF) sobre el ECG es la desaparición de la onda P en la mayoría de los latidos, como puede verse en la Figura 4.



**Figura 4:** ECG de pacientes con fibrilación auricular (flecha roja) y con ritmo sinusal (flecha azul).

A pesar de su mayor incidencia, las arritmias auriculares se consideran menos peligrosas que las ventriculares, siendo la fibrilación ventricular y la taquicardia ventricular las más comunes entre las arritmias ventriculares. Existe un amplio número de estudios en la literatura en los que se ha utilizado el modelado cardiaco computacional para describir y caracterizar comportamientos arrítmicos, tanto en aurícula como en ventrículo [3, 5].

### 1.1.4. MEMORIA CARDIACA

En general, la memoria cardiaca hace referencia al tiempo que tardan las células en adaptarse completamente ante cambios bruscos en el ritmo cardiaco (HR). Se distinguen dos tipos de memoria cardiaca: memoria a corto plazo, que hace referencia a la adaptación celular que sucede durante los minutos posteriores al cambio en el HR, y memoria a largo plazo, que se refiere al proceso de recuperación celular que tiene lugar tras un cambio en el HR que se mantiene durante varios días. A nivel de superficie, la no adaptación instantánea del intervalo QT (intervalo temporal asociado a la despolarización y repolarización ventricular) a cambios en el intervalo RR (medida inversa del ritmo cardiaco) [6], o las variaciones en magnitud y duración de la onda T tras aplicar marcapaseado ventricular [7], son ejemplos de manifestaciones de la memoria cardiaca en el ECG.

Este proyecto se centra en el estudio a nivel celular y fibrilar (unidimensional) de la memoria cardiaca a corto plazo, analizando la adaptación de la duración de los potenciales de acción (APD)

ante cambios en el HR. El valor de APD depende fuertemente del tiempo transcurrido entre estímulos consecutivos, denominado longitud de ciclo ( $CL = 1/HR$ ). Aunque existen trabajos previos que han estudiado esta dependencia tanto en miocitos ventriculares [8], como en tejido de aurícula canina [9, 10], no hay referencias de investigaciones de la memoria cardiaca en miocitos y tejidos auriculares humanos. En el estudio de este aspecto está focalizado el presente trabajo.

## 1.2. OBJETIVOS

La investigación llevada a cabo en este proyecto tiene como propósito principal el análisis de la memoria cardiaca, estudiando para ello la adaptación de los potenciales de acción de células y fibras auriculares de corazón humano frente a cambios bruscos en el ritmo cardiaco. Se han investigado los mecanismos iónicos que subyacen al fenómeno de la memoria cardiaca y se ha estudiado su relación con la probabilidad de generación de arritmias en aurícula. En la realización de este proyecto se han fijado los siguientes objetivos y tareas:

- Amplia revisión bibliográfica con el fin tanto de comprender de manera detallada la electrofisiología celular en aurícula como de conocer los estudios previos relacionados con los objetivos de este proyecto (según se describen a continuación).
- Estudio de los dos modelos de aurícula humana existentes en la literatura, observando las diferencias existentes entre ambos y la adecuación de utilizar uno u otro para las simulaciones llevadas a cabo en el proyecto.
- Dilucidación de los mecanismos iónicos celulares subyacentes a la adaptación del APD en miocitos auriculares humanos, observando la contribución de las distintas corrientes iónicas (tanto sus conductancias como las cinéticas de sus compuertas de activación e inactivación) y las concentraciones de iones  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  a las diferentes fases de la adaptación.
- A partir de los mecanismos de la memoria establecidos en el punto anterior, comprobación de su independencia del modelo estudiado, es decir, determinación de si los mecanismos influyentes en la memoria cardiaca son los mismos utilizando diferentes modelos de aurícula humana.
- Validación cualitativa y cuantitativa de los resultados de adaptación del APD con estudios experimentales realizados en aurícula humana, tomando algunos de ellos de la literatura y otros de los experimentos realizados específicamente para este estudio en colaboración con el Hospital Sant Pau de Barcelona.
- Comparación exhaustiva entre los resultados y las conclusiones obtenidas en este artículo para aurícula humana con los correspondientes a trabajos centrados en la memoria cardiaca en células de ventrículo humano, con el fin de caracterizar de forma completa la adaptación del APD en las células de cualquiera de las cavidades del miocardio.
- Evaluación del riesgo proarrítmico, mediante biomarcadores preclínicos, asociado a variaciones en los mecanismos de la memoria cardiaca que implican alteraciones sustanciales en los tiempos de adaptación del APD.

## 2. MÉTODOS

Hasta la fecha existen muy pocos modelos computacionales que describan matemáticamente el comportamiento eléctrico celular en aurícula humana. Uno de los más completos y recientes para simulación de APs es el desarrollado por Courtemanche *et al.* en el año 1998 (CRN98) [11], el cual se ha empleado en este trabajo para simular los diferentes protocolos de estimulación necesarios para el estudio de la memoria cardíaca y su relación con el riesgo arrítmico (descritos detalladamente en el apartado 2.5). Existe otro modelo celular de aurícula humana desarrollado por Nygren *et al.* (N98) también en 1998 [12], cuya utilización en el proyecto ha tenido la finalidad de verificar que los resultados obtenidos son independientes del modelo con el que se realizan las simulaciones. La utilización de estos modelos en el estudio de simulación llevado a cabo en este proyecto se describe más adelante en este capítulo. A continuación se describe el estudio experimental realizado también como parte de este proyecto y que complementa al estudio de simulación.

### 2.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL

La parte experimental de este proyecto se llevó a cabo en cooperación con el Grupo de Investigación en Electrofisiología Celular del Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu de Barcelona. El motivo del establecimiento de dicha colaboración fue la necesidad de realizar una validación experimental de los resultados obtenidos mediante las simulaciones computacionales desarrolladas en este trabajo. El citado grupo posee una amplia experiencia en el estudio y tratamiento de células cardíacas, así como en los protocolos necesarios para la visualización y extracción de información de potenciales de acción y corrientes iónicas implicadas [13, 14, 15, 16].

Actualmente en España existe un número reducido de grupos dedicados a investigar experimentalmente la electrofisiología en cardiomiocitos auriculares y/o ventriculares debido, entre otras causas, a la gran inversión económica que supone poseer un equipo completo de preparación, estimulación, y análisis posterior de las muestras. Además, la disponibilidad de células aprovechables de corazón humano es bastante limitada (en otras especies animales este problema no es tan acusado) debido a todas las connotaciones éticas que conlleva su obtención, lo que se convierte en una dificultad importante y decisiva para la realización de este tipo de investigaciones.

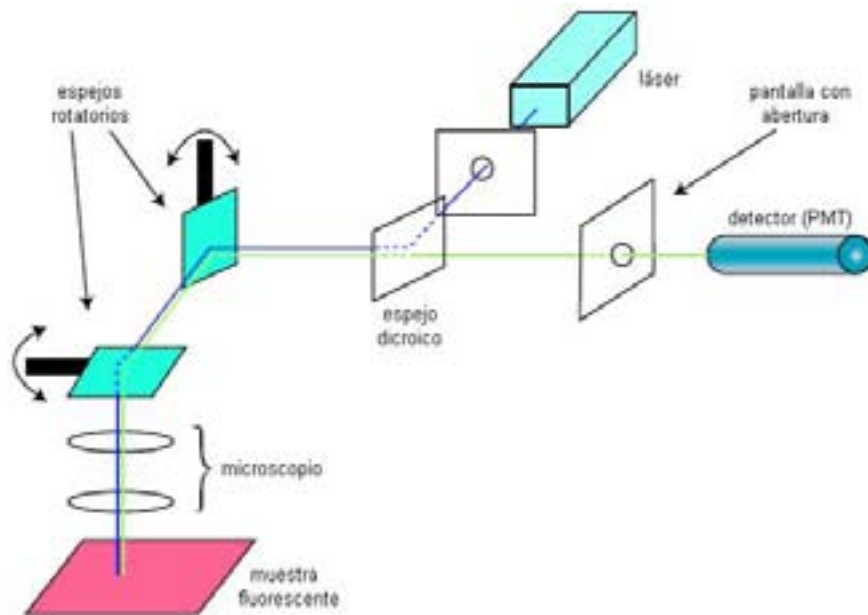
El proceso seguido en la experimentación se puede dividir en tres partes: preparación previa de las muestras y el material, excitación de una célula bajo determinadas condiciones según un protocolo de estimulación predefinido, y análisis y representación de los valores de corrientes o voltajes que se desean medir. Cada una de estas etapas requiere la utilización de dispositivos que se describirán detalladamente a continuación.

#### 2.1.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y MATERIAL

Pequeñas muestras de tejido cardíaco auricular derecho son recogidas cuidadosamente de pacientes que van a someterse a algún tipo de cirugía cardiovascular, generalmente mediante canulación auricular para bypass cardiopulmonar. Con el fin de prolongar la vida de las células obtenidas, se almacenan a baja temperatura hasta el momento de la experimentación. Las muestras de tejido son teñidas y posteriormente divididas en pequeños trozos en una solución libre de  $Ca^{2+}$  que contiene 30 mmol/l de butanodiona monoxima, y después son incubadas a 35°C en otra solución sin  $Ca^{2+}$  que contiene 0.5 mg/ml de colagenasa y 0.5 mg/ml de proteinasa. A excepción de los compuestos citados, ambas soluciones libres de  $Ca^{2+}$  contienen (en mmol): NaCl (88), sacarosa (88), KCl (5.4), NaHCO<sub>3</sub> (4), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.3), MgCl<sub>2</sub> (1.1), HEPES (10), taurina (20), glucosa (10), y piruvato de sodio (5) (con

pH de 7.4 a temperatura ambiente). Tras 45 minutos, el tejido se extrae de la solución enzimática y algunas células se desagregan en la solución con una pipeta Pasteur. El resto de tejido que queda con células sin desagregar se digiere durante 15 minutos en una solución fresca sin  $Ca^{2+}$  que contiene 0.4 mg/ml de colagenasa. Este procedimiento se repite tres veces. Las soluciones que contienen las células desagregadas se centrifugan a 600 rpm durante un minuto. Tras esto, los tejidos se resuspenden en la solución libre de  $Ca^{2+}$ , y se incrementa el  $Ca^{2+}$  gradualmente hasta 1 mmol/l. Las células resultantes varían dependiendo del tamaño y la calidad de la muestra de tejido, sin embargo únicamente células alargadas con claras estrías cruzadas y sin granulación se usan para los experimentos [13, 14, 15, 16].

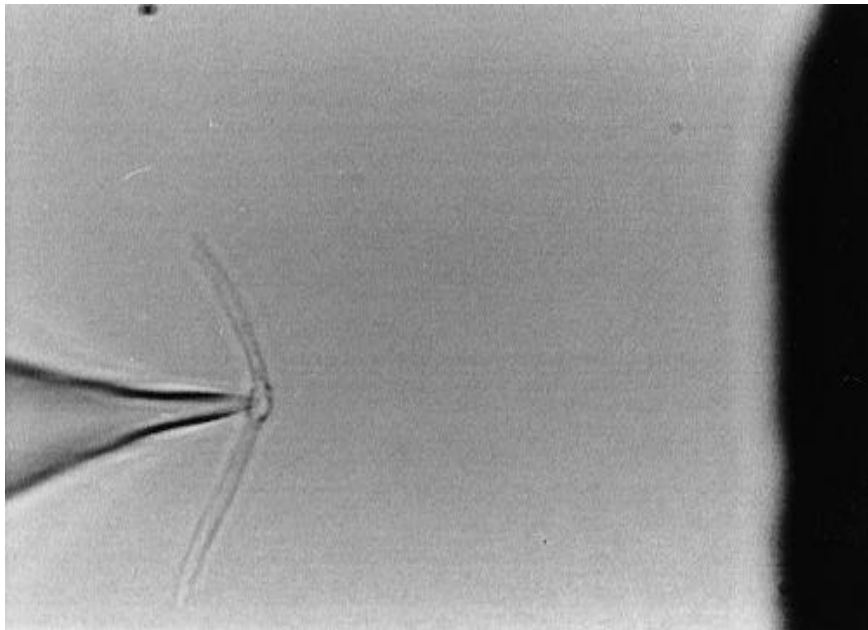
La obtención de una única célula de características adecuadas para el posterior análisis electrofisiológico es un proceso complicado puesto que existe una alta probabilidad de que la célula muera durante el desarrollo del estudio, siendo la causa principal la perforación no intencionada de la membrana celular. Para llevar a cabo esta etapa de la experimentación es necesario utilizar un microscopio confocal y una micropipeta. La microscopía confocal se basa en la emisión de un haz de luz de determinada longitud de onda (en nuestro caso, la fuente de luz es un láser) que irradie la muestra y, mediante reflexiones en espejos, refracciones en lentes y filtros adecuados, se puedan visualizar las células que “fluorescen” en la muestra [17, 18]. Para ello, el esquema general empleado es el siguiente (Figura 5):



**Figura 5:** Configuración típica de un microscopio confocal con radiación láser.

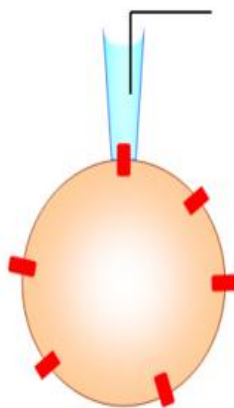
Una vez localizada una célula útil para su análisis, se utiliza una micropipeta para capturarla. Dicha micropipeta se fabrica instantes antes del experimento con una abertura determinada, mediante calentamiento y estiramiento durante un tiempo concreto con un dispositivo diseñado para tal efecto, denominado *micropipette puller*. Posteriormente se comprueba que la punta de la micropipeta tiene una resistencia entre 1.5 y 4  $M\Omega$  para estar seguros de que el registro de las corrientes iónicas a través de los canales iónicos individuales de la célula sea suficientemente preciso, haciendo mínima la corriente de fuga y elevada la relación señal a ruido [19]; en caso contrario no sería adecuada para realizar Patch-Clamp y habría que fabricar otra nueva (ver Figura 6).

Para llevar a cabo la técnica Patch-Clamp, dentro de la micropipeta se introduce, mediante finos capilares, una solución adecuada (en mmol: ácido aspártico (109), CsCl (47),  $Mg_2ATP$  (3),  $MgCl_2$  (1),  $Na_2$  fosfocreatina (5),  $Li_2GTP$  (0.42), HEPES (10), y 250  $\mu g/mL$  anfotericina B (pH = 7.2)). Tras



**Figura 6:** Captura de un cardiomiocito de trucha con una micropipeta [16].

esto, se acerca cuidadosamente la pipeta a la célula tratando de no dañarla y se aspira suavemente mediante un tubito hasta que se forma el “gigasello” en la punta de la micropipeta (ver Figura 7). Este sello aumenta considerablemente la resistencia en la abertura de la pipeta y, tras estabilizarse, se puede empezar la estimulación de la célula. La variante de Patch-Clamp empleada en este experimento se denomina *perforated patch*, ya que añade una nueva solución al electrodo que contiene bajas cantidades de algún antibiótico para producir pequeñas perforaciones en la membrana unida a él. Con este método se consigue disminuir la diálisis celular aunque, por contra, la resistencia es mayor que en técnicas *whole cell* y la probabilidad de ruptura de la membrana es bastante elevada [20].



**Figura 7:** Esquema de la técnica Patch-Clamp.

### 2.1.2. ESTIMULACIÓN CELULAR

En función de la magnitud que deseemos medir (corriente o voltaje), se opta por una de las siguientes dos posibilidades: a) los electrodos se utilizan para mantener el voltaje de la membrana celular a un valor determinado y se miden las corrientes iónicas de interés (Voltage-Clamp) [21], siendo dichas corrientes dependientes del voltaje en la membrana, ya que, entre otros, sus compuertas de activación e inactivación son función de tal voltaje; b) la corriente en los electrodos se mantiene a un valor concreto y se mide el correspondiente potencial transmembrana (Current-Clamp) [20].

Para llevar a cabo la estimulación de la célula con unos parámetros concretos (longitud de ciclo, amplitud del estímulo, tiempo de estimulación...), se necesita un amplificador de Patch-Clamp controlado por software. El empleado en este estudio fue un EPC 10-HEKA.

El ordenador conectado al amplificador de Patch-Clamp muestra el valor de la resistencia medida en la abertura de la micropipeta, gracias al cual se puede verificar si el sello se ha estabilizado o si por el contrario la célula ha muerto (es relativamente frecuente que esto último suceda). Además, se pueden definir programas de estimulación que den como resultado la evolución de los picos máximos de una corriente concreta variando la amplitud del potencial transmembrana durante un breve período de tiempo, es decir, se aplican pulsos de duración fija y cuya amplitud se va modificando (por ejemplo de 10 en 10 mV), y se miden los máximos de la corriente bajo estudio (habiendo inhibido el resto de corrientes mediante diversas sustancias).

Respecto al protocolo experimental de estimulación de la célula empleado para registrar corrientes o APs, se utilizó un protocolo dinámico en el que se consideraron distintos valores de CL y un número de estímulos para cada uno de tales CLs según se describe a continuación:

- 12 pulsos de estimulación con  $CL = 5$  s.
- 30 pulsos de estimulación con  $CL = 2$  s.
- 30 pulsos de estimulación con  $CL = 1.5$  s.
- 30 pulsos de estimulación con  $CL = 1$  s.
- 30 pulsos de estimulación con  $CL = 0.75$  s.
- 30 pulsos de estimulación con  $CL = 0.5$  s.
- 12 pulsos de estimulación con  $CL = 5$  s.

### 2.1.3. OBTENCIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

En la pantalla del ordenador conectado a los electrodos se pueden visualizar los valores que toma el potencial transmembrana o la corriente iónica que estamos midiendo en función del tiempo y de la corriente de estimulación o el voltaje, dependiendo del caso, que se inserta a la célula. Además, con el ordenador también se puede mostrar la imagen enfocada con el microscopio, hacer zoom sobre ella o rotarla. Esto es útil para aprovechar óptimamente el tamaño de la pantalla y hacer comparativas de corrientes en distintos espacios de la célula, puesto que se pueden seleccionar zonas y comparar la corriente que las atraviesa y los instantes temporales donde es máxima, de tal forma que es posible calcular la velocidad de conducción del estímulo en la célula.

Para tener resultados de una corriente concreta, se utilizan inhibidores conocidos del resto de corrientes quedando como corriente iónica total la que se desea obtener. Mediante técnicas de Voltage-Clamp (las cuales fijan el potencial existente entre los medios intracelular y extracelular a valores

concretos durante un lapso de tiempo) se pueden obtener relaciones entre la amplitud de la corriente deseada y el potencial transmembrana en un amplio rango de éstos. Gracias a estas relaciones se puede deducir la evolución temporal de cada corriente conociendo la evolución del voltaje [16].

En la obtención de resultados de potencial transmembrana se emplea la técnica Current-Clamp, lo que conlleva gran dificultad debido a que la corriente externa (*holding current*) que es necesario inyectar puede influir en las características del potencial transmembrana. En nuestro caso concreto, la obtención de un potencial de reposo adecuado y estable para que las mediciones de los APs fuesen fiables se consiguió con una *holding current* igual a  $-24$  pA. El problema de estabilización del potencial de reposo tiene gran relevancia en miocitos auriculares debido a su baja conductancia iónica en valores de voltaje alrededor del citado potencial, hecho que no ocurre en miocitos ventriculares. Así, en células de aurícula un pequeño cambio en la *holding current* puede provocar un cambio importante en el potencial de membrana [15].

El esquema completo de los aparatos que intervienen en el experimento y en el análisis de los resultados se refleja en la Figura 8:



**Figura 8:** Equipos de un laboratorio de microscopía confocal.

## 2.2. MODELOS COMPUTACIONALES DE ELECTROFISIOLOGÍA CELULAR

La utilización de modelos computacionales permite investigar los mecanismos iónicos involucrados en determinados comportamientos electrofisiológicos sin necesidad de disponer de muestras experimentales. Asimismo, permite la corroboración de hipótesis realizadas a partir de estudios experimentales previos. En los modelos utilizados en el presente estudio, la célula se representa como un circuito eléctrico cuyas ramas en paralelo modelan el comportamiento de los distintos canales iónicos, tal como se ha detallado en el capítulo 1.1.2.

El modelo de axón de calamar gigante desarrollado por Hodgkin-Huxley en 1952 fue el primero en simular el comportamiento eléctrico de una célula. En él se utilizaron las denominadas ecuaciones de Hodgkin-Huxley para describir las distintas corrientes iónicas. La formulación de Hodgkin-Huxley incluye una descripción de las compuertas de activación/inactivación de cada corriente, que son función del potencial transmembrana y, en consecuencia, varían a lo largo del tiempo de duración del AP. El flujo total de corriente que traspasa la membrana celular se divide en dos componentes, una capacitiva,  $I_C$ , debida a la actuación de la membrana como un condensador, y otra iónica,  $I_{ion}$ , que es la suma de todas las corrientes a través de los distintos tipos de canales iónicos [4] (ver Figura 3).

Una década después, Noble desarrolló el primer modelo de células cardiacas, en particular de fibras de Purkinje, basándose en las ecuaciones de Hodgkin-Huxley [22]. En la actualidad, existen diferentes modelos que reflejan el comportamiento electrofisiológico de miocitos humanos ventriculares, estudiados y comparados en [3], y auriculares [11, 12]. El modelo propuesto por Ten Tusscher *et al.*, inicialmente publicado en 2004 [23] y posteriormente mejorado en 2006 [24], es el modelo electrofisiológicamente más detallado que existe en la actualidad para describir la actividad eléctrica celular en ventrículo humano. Dicho modelo ha sido utilizado en [25] para estudiar la memoria cardiaca y analizar su relación con la generación de arritmias ventriculares. Sin embargo, hasta el presente trabajo no se habían empleado modelos para el estudio de los mecanismos de la memoria cardiaca en células auriculares.

### 2.3. MODELO CELULAR DE AURÍCULA HUMANA

El modelo empleado en el presente estudio es el publicado por Courtemanche, Ramírez y Nattel (modelo CRN98). Este modelo fue generado tomando como base el modelo de Luo y Rudy de 1994, en el que se describe el comportamiento de las células ventriculares de un corazón de coballa [26, 27]. Partiendo de expresiones similares para las corrientes iónicas y concentraciones intracelulares, éstas se adaptaron a mediciones experimentales directas de corrientes iónicas en aurícula humana. El objetivo principal que se plantearon Courtemanche *et al.* cuando desarrollaron el modelo CRN98 fue idear un modelo útil del AP en aurícula, a partir del cual poder comprender de forma más completa las observaciones experimentales hechas en células y tejidos de aurícula humana, y realizar predicciones respecto al comportamiento de este tipo de células en condiciones no probadas previamente [11].

En la descripción del modelo, se detallan las razones de la elección de cada uno de los parámetros que intervienen en las distintas formulaciones, la forma de obtenerlos y, en algunos casos, si han tenido que modificarse respecto a los derivados directamente de datos experimentales de corrientes iónicas con el objetivo de mejorar la representación del AP. Una vez desarrollado el modelo, se mide la dependencia del AP con el ritmo cardiaco una vez que éste se encuentra en estado estacionario y los cambios en la forma del AP en presencia de agentes bloqueadores de determinadas corrientes. Además, se compara el resultado del modelo con la variabilidad experimental observada en la morfología y duración del AP [11].

Como se ha comentado en la introducción, la membrana celular se modela mediante un condensador conectado en paralelo a resistencias variables y generadores de voltaje. Matemáticamente las variaciones del potencial transmembrana asociado a cada miocito auricular individual (V) se calculan según la siguiente ecuación diferencial ordinaria:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{-(I_{ion} + I_{st})}{C_m}, \quad (2)$$

donde  $I_{ion}$  e  $I_{st}$  son, respectivamente, la corriente iónica total (suma de todas las corrientes de  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $K^+$ ) y la corriente externa de estimulación que atraviesan la membrana, y  $C_m$  es la capacitancia total de la membrana (con un valor de 100 pF en el modelo CRN98). En el presente estudio, la corriente de estimulación se especifica como un pulso cuadrado de 2 ms de duración y 2 nA de amplitud (dos veces el umbral diastólico) aplicado de acuerdo con un protocolo específico (según se detalla en 2.5), mientras que la corriente iónica total viene dada por la siguiente expresión (3):

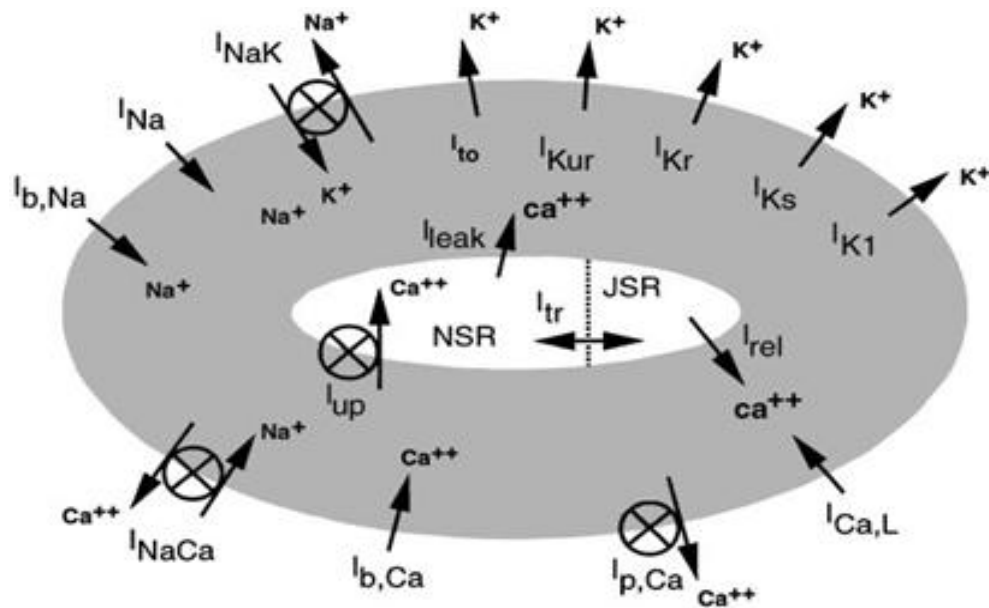
$$\begin{aligned} I_{ion} = & I_{Na} + I_{K1} + I_{to} + I_{Kur} + I_{Kr} + I_{Ks} + I_{CaL} \\ & + I_{pCa} + I_{NaK} + I_{NaCa} + I_{bNa} + I_{bCa}. \end{aligned} \quad (3)$$

La ecuación diferencial ordinaria (2) se resuelve, en cada instante de tiempo, mediante el método de Forward Euler con una resolución temporal  $dt = 0.02$  ms. Esta resolución es adecuada para el estudio,



como demuestra el hecho de que reduciendo el valor de  $dt$  en un orden de magnitud los resultados obtenidos son prácticamente idénticos.

El esquema representativo general de las corrientes, bombas e intercambiadores iónicos del modelo se muestra en la Figura 9.



**Figura 9:** Representación esquemática de las corrientes presentes en el modelo celular de aurícula humana. Compartimentos intracelulares diferenciados: mioplasma y retículo sarcoplásmico [11].

En la descripción del modelo, las corrientes se definen mediante funciones dependientes del potencial transmembrana ( $V$ ), del potencial de equilibrio para el ión en cuestión ( $E_i$ ,  $i = Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ), y del estado de las compuertas de activación e inactivación correspondientes a cada flujo de iones. A su vez, cada una de estas compuertas está determinada por el valor que alcanza en estado estacionario y por una constante de tiempo, ambos dependientes de  $V$ .

Courtemanche *et al.* realizaron investigaciones con su modelo en las que analizaban la respuesta del AP tras la aplicación de un pequeño número de estímulos con un determinado CL, pero no estudiaron la capacidad de adaptación celular (memoria cardiaca) tras varios minutos de estimulación [11]. Esta adaptación se estudia en este proyecto caracterizando la evolución del APD (medido siempre al 90% de repolarización, a menos que se especifique lo contrario) considerando cambios en el CL de marcapaseado y simulando distintas condiciones de cambio en los parámetros del modelo, con el fin de obtener resultados y conclusiones acerca de los mecanismos subyacentes a la memoria cardiaca a corto plazo en células y tejido auricular.

## 2.4. MODELO DE TEJIDO AURICULAR HUMANO

Los experimentos y simulaciones llevados a cabo en células individuales son útiles hasta cierto punto, puesto que en corazones reales las células se encuentran formando parte de fibras musculares cardiacas, y éstas a su vez de tejido cardiaco. Por esta razón en este trabajo se utilizan los dos modelos de miocitos auriculares humanos, tanto el de Courtemanche como el de Nygren, extendidos al caso unidimensional (fibra o cable) para el estudio de la adaptación del APD ante cambios en el ritmo cardiaco, análogamente a como se llevó a cabo el estudio en células individuales.

Para ello, se modifica la ecuación (1) considerando ahora un término relacionado con la propagación espacial de los APs, de forma que la ecuación queda:

$$\frac{\partial V}{\partial t} = \frac{-I_{ion}}{C_m} + D \frac{\partial^2 V}{\partial x^2}, \quad (4)$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión isotrópico, dependiente de factores como la resistencia de las uniones intercelulares, la relación superficie/volumen y la capacitancia de la membrana celular, que, de acuerdo con datos experimentales disponibles en la literatura, se toma de valor  $0.001 \text{ cm}^2/\text{ms}$  [28, 29]. La resolución temporal empleada para resolver la ecuación (4) es la misma que la empleada en el caso unicelular ( $dt = 0.02 \text{ ms}$ ), mientras que la resolución espacial considerada es  $dx = 0.025 \text{ cm}$  [28, 29]. También en este caso se comprobó que ambas resoluciones son adecuadas, pues reduciendo cada una de ellas en un orden de magnitud no se aprecian apenas cambios en los resultados obtenidos.

El tamaño de cable simulado es de  $5 \text{ cm}$  (cable unidimensional de 200 células). La estimulación externa celular se aplica sobre la primera célula del cable, mientras que las restantes son excitadas mediante propagación de los APs. La duración del estímulo aplicado es de  $2 \text{ ms}$  (igual que en el caso unicelular), mientras que su amplitud tiene que ser considerablemente mayor que en células individuales para conseguir generar un potencial de acción debido a la interacción con las células adyacentes. En este estudio se considera una amplitud igual a  $410 \text{ nA}$  para cable de  $5 \text{ cm}$ , lo que equivale a dos veces el umbral diastólico.

## 2.5. PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN CELULAR

### 2.5.1. PERIÓDICO

En este protocolo se marcapasea la célula cada cierto período temporal (CL) prefijado durante toda la simulación. En un principio se empleó este protocolo para comprobar que la evolución del APD varía notablemente en función del CL con el que se realiza la estimulación periódica. Sin embargo, en este trabajo el objetivo principal de utilizar un protocolo de marcapaseado periódico es obtener los valores de las variables del modelo cuando se alcanza un estado estacionario, tras 30 minutos de estimulación periódica, para valores específicos de CL. Éstos se usan para inicializar variables en los protocolos pacing, S1-S2 y dinámico que se describen a continuación.

### 2.5.2. PACING

Puesto que en este trabajo se pretende estudiar el tiempo de adaptación de los miocitos y fibras auriculares ante cambios repentinos en el ritmo cardiaco, en este estudio se utilizó un protocolo, que denominamos *pacing*, en el cual se marcapasea durante 10 minutos a un CL determinado ( $CL_1$ ). Transcurrido este tiempo se acorta bruscamente el CL ( $CL_2$ ), marcapaseando otros 10 minutos. Finalmente se vuelve a marcapasear al CL inicial ( $CL_1$ ) durante 10 minutos más. Se emplearon diferentes configuraciones de  $CL_1$  y  $CL_2$  a partir del caso por defecto, el cual está definido por  $CL_1 = 1000 \text{ ms}$  y  $CL_2 = 600 \text{ ms}$  (ver gráficas en apartado 3.1).

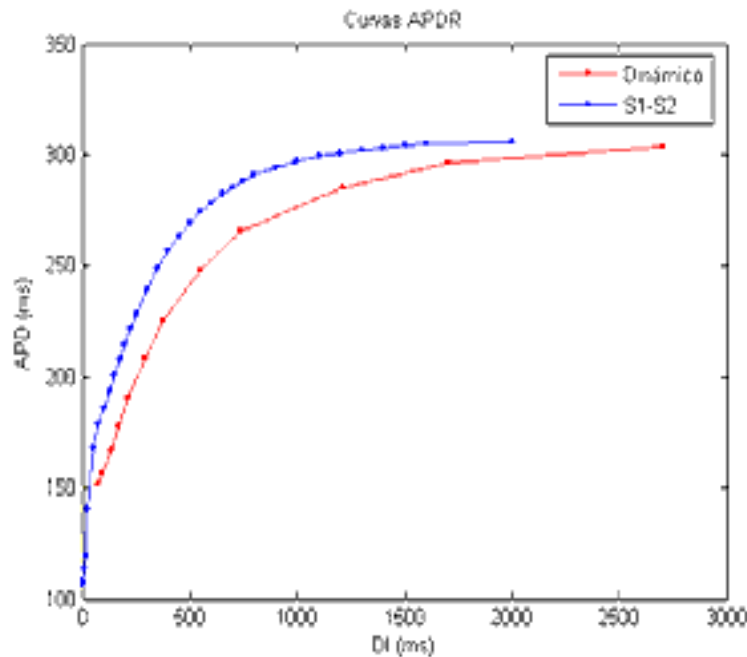
### 2.5.3. S1-S2

Un protocolo de estimulación característico para estudiar la restitución del APD en célula o en fibra es el S1-S2. La restitución hace referencia a la recuperación del APD tras un latido precedente y es una propiedad que se considera de gran importancia para la generación y estabilidad de arritmias

[30, 31, 32]. En este protocolo se estimula durante diez latidos a un CL determinado (estímulos S1, en este estudio cada 1000 ms) y después se aplica un estímulo S2 transcurrido un cierto intervalo diastólico (DI) tras el AP generado por el último de los estímulos S1. El procedimiento se repite para diferentes DIs fijados y se obtiene una curva de restitución (APDR) de valores que representan el APD del estímulo S2 frente al correspondiente DI que le precede (ver Figura 10). Los valores prefijados de DI considerados en este estudio son: 2000, 1600, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 4, 3 y 2 ms.

#### 2.5.4. DINÁMICO

Mediante este protocolo se pretende caracterizar desde un punto de vista diferente la restitución del APD, así como relacionar sus resultados con el riesgo arritmico. Se marcapasea a un CL inicial de 3000 ms durante 100 latidos, se disminuye el CL y se marcapasea con este nuevo CL durante otros 100 latidos, repitiendo el proceso hasta un CL de 225 ms. Los valores de CL considerados son: 3000, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 500, 400, 350, 300, 250 y 225 ms. La curva APDR se obtiene representando el valor del último APD de cada serie de latidos frente al correspondiente valor previo de DI [33] (ver Figura 10).



**Figura 10:** Curvas de restitución del APD frente a DI con los protocolos S1-S2 y dinámico.

## 2.6. CUANTIFICACIÓN DE LA MEMORIA CARDIACA

En el estudio de la memoria cardíaca y los mecanismos que subyacen a ella se consideran variaciones en ciertos parámetros del modelo respecto al caso control. Las variaciones consideradas pueden agruparse en dos tipos: inhibición/sobreexpresión de las conductancias asociadas a las corrientes iónicas, y modificación de las constantes de tiempo correspondientes a las compuertas de activación e inactivación de las corrientes. Las variaciones máximas se fijaron en un 30% por encima y por debajo del valor por defecto en el modelo original, excepto en los casos señalados explícitamente en el texto.

Para estimar el grado de memoria cardiaca, se cuantifica el tiempo requerido por el APD para completar el 90% de su adaptación tras un cambio abrupto y mantenido del HR. Dicho tiempo se denota por  $t_{90}$  y se expresa en segundos.

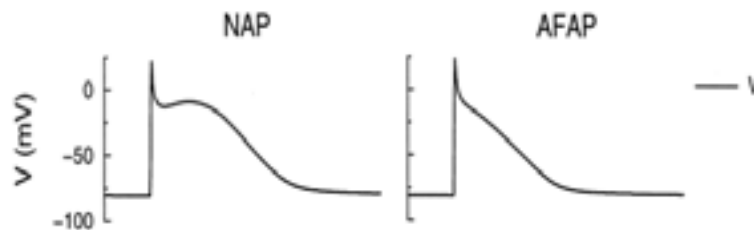
Además, en la adaptación del APD ante cambios en el HR se observan dos fases bien diferenciadas: un primera fase rápida, que ocurre durante los primeros segundos tras el cambio en el HR y durante la cual el APD cambia de manera muy abrupta; y una segunda fase lenta, en la que el APD va acomodándose de forma gradual hasta alcanzar su nuevo valor estacionario correspondiente al nuevo CL. En las dos etapas del marcapaseado del protocolo pacing utilizado en este estudio para evaluar la memoria cardiaca (correspondientes a aceleración de HR y deceleración de HR) y, dentro de ellas, para cada fase rápida o lenta, se ajustan funciones de tipo exponencial mediante el método de mínimos cuadrados, quedando así cada fase de la adaptación caracterizada por una constante de tiempo  $\tau_{fast}$  o  $\tau_{slow}$ , evaluada tras aceleración y deceleración del HR. Las funciones utilizadas en el ajuste son de la forma:

$$f(t) = a + be^{-\frac{t-c}{\tau}}. \quad (5)$$

## 2.7. CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOFISIOLÓGICAS SIMULADAS

El modelo de Courtemanche *et al.* reproduce el comportamiento eléctrico de miocitos auriculares en condiciones fisiológicas control, basando la formulación del modelo en medidas experimentales obtenidas de sujetos sanos [11]. Sin embargo, este modelo resulta útil para estudiar las variaciones en el AP y en las corrientes iónicas que algunas patologías, como la fibrilación auricular, pueden producir.

Una vez desarrollado su modelo, Courtemanche *et al.* analizaron el caso de miocitos extraídos de pacientes que sufrían fibrilación auricular e introdujeron varias modificaciones en el modelo para simular dicho comportamiento patológico [34]. En los experimentos se observó que la morfología de los APs se hacía más triangular y se acortaba significativamente su duración. Esto era debido a cambios importantes en algunas corrientes que trasladaron a la formulación del modelo: reducción de  $I_{to}$  (corriente transitoria de potasio) e  $I_{Kur}$  (corriente rectificadora retardada ultrarrápida de potasio) al 50%, basada en los experimentos llevados a cabo en [35], e inhibición al 70% de  $I_{CaL}$  (corriente de calcio de tipo L), de acuerdo con las mediciones experimentales descritas en [36]. En la Figura 11 se pueden comparar los APs del modelo en control (NAP) y en fibrilación auricular (AFAP):



**Figura 11:** Potenciales de acción obtenidos tras 12 latidos con estimulación periódica cada 1000 ms utilizando el modelo CRN98 por defecto y en condiciones de fibrilación auricular, respectivamente (tomado de [34]).

En este proyecto se ha considerado el análisis de la adaptación del APD ante cambios en el ritmo cardiaco en condiciones de fibrilación auricular puesto que resulta de interés estudiar la memoria cardiaca no sólo en condiciones fisiológicas sino también patofisiológicas.

## 2.8. MARCADORES PRECLÍNICOS DE RIESGO ARRÍTMICO

Puesto que resulta de gran importancia relacionar los mecanismos iónicos de la adaptación del APD con el riesgo arrítmico, se cuantificaron los siguientes biomarcadores preclínicos ampliamente utilizados en la literatura para la evaluación del riesgo proarrítmico:

1. *Pendientes de las Curvas de Restitución del APD*: existe controversia en la literatura acerca de la relación entre las pendientes de la curva de restitución y el riesgo arrítmico. Algunos estudios relacionan pendientes elevadas de las curvas de restitución ( $> 1$ ) con un mayor riesgo de sufrir arritmias, así como de que éstas se mantengan una vez iniciadas [30, 31]. Sin embargo, otros estudios señalan que pendientes acusadas en la curva de restitución pueden ser indicativas de protección frente al riesgo arrítmico y, por el contrario, pendientes más planas pueden favorecer la estabilidad de la actividad arrítmica [32]. Las curvas APDR obtenidas mediante los protocolos S1-S2 y dinámico se ajustan con funciones exponenciales de la forma:

$$APD = a(1 - e^{-bDI}) + c, \quad (6)$$

en el rango de DIs entre 0 y 400 ms. Una vez realizado el ajuste, se evalúa la pendiente de dichas curvas en un punto del citado rango, que se toma como  $DI = 100$  ms, por ser el menor DI no asociado a la aparición de alternancias en el APD para ninguno de los casos simulados en el estudio. Para la evaluación de la pendiente se utiliza la derivada de (6):

$$S_{DI} = abe^{-bDI}, \quad (7)$$

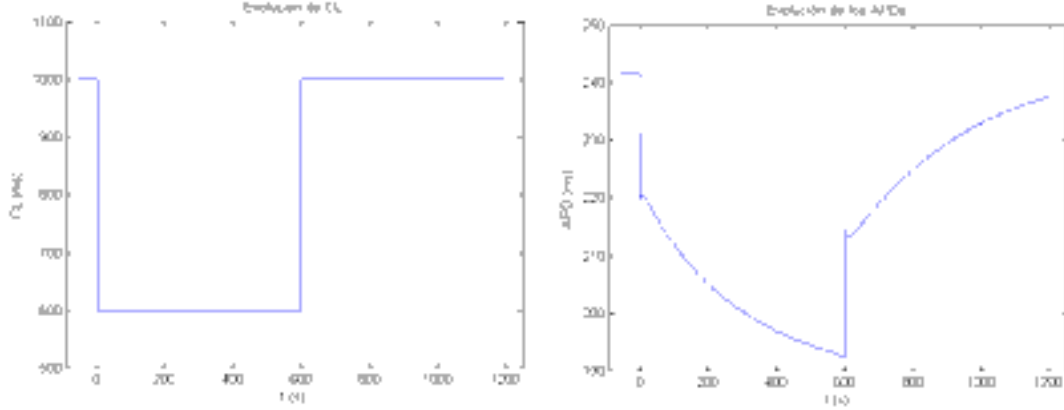
obteniendo así valores de pendiente  $S_{S1S2}$  y  $S_{din}$  para los protocolos S1-S2 y dinámico, respectivamente, cuando  $DI = 100$  ms.

2. *Reactivación de la Corriente de Calcio*: un indicador de la probabilidad de generación de arritmias es la magnitud de inactivación y recuperación tras inactivación de  $I_{CaL}$  [37]. En el modelo CRN98 utilizado en este estudio se definen dos compuertas de inactivación de  $I_{CaL}$  de diferente naturaleza: la compuerta  $f$  dependiente del potencial (V), y la compuerta  $f_{Ca}$  dependiente de la concentración intracelular de iones calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ). El producto de ambas se calcula en el instante en el que se alcanza el 90% de repolarización del AP en estado estacionario con marcapaseado a 1000 ms y dicho producto se denota por  $\rho$ . Valores de este marcador cercanos a 1 implican una alta probabilidad de que se produzca una reactivación de la corriente de calcio y por tanto de formación de posdespolarizaciones tempranas que podrían eventualmente desembocar en la generación de arritmias [37].
3. *Triangulación del AP*: Hondegem *et al.* mostraron una estrecha relación entre la triangulación del AP y el riesgo proarrítmico [38]. Un método para la descripción de la triangulación de los APs es la relación entre  $APD_{90}$  y  $APD_{50}$  (APD medido al 90% y al 50% de la repolarización, respectivamente) evaluada en estado estacionario. Esta relación se halla en forma de cociente entre ambos valores y se denota por  $\delta$ . Valores cercanos a la unidad implican una forma más cuadrada del AP, mientras que valores mayores se corresponden con una morfología triangular de los APs.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ADAPTACIÓN DEL APD

En la Figura 12 se muestra la gráfica de adaptación del APD en aurícula humana (derecha de la figura). La gráfica mostrada corresponde al caso control (parámetros por defecto del modelo) cuando la estimulación se realiza de acuerdo con el protocolo  *pacing*  a 1000-600-1000 ms de marcapaseado (izquierda de la figura), tal como se describió en el apartado 2.5.2:



**Figura 12:** Evolución del CL cuando se aplica el protocolo  *pacing*  a 1000-600-1000 ms (izquierda) y correspondiente curva de evolución del APD en condiciones control (derecha).

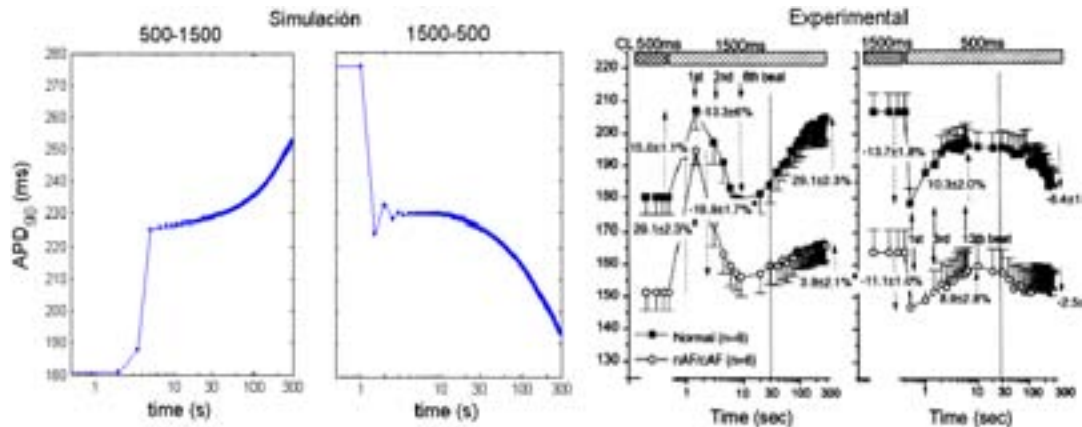
Observando la Figura 12 se puede observar que una aceleración en el ritmo cardiaco (disminución de CL) conlleva inicialmente una disminución brusca en el valor de APD (fase rápida de la adaptación) seguida de una disminución de éste más paulatina (fase lenta de la adaptación). Del mismo modo, una deceleración del ritmo cardiaco implica una prolongación de los APs, de manera brusca al principio y más suave en los siguientes.

Una forma de cuantificar el tiempo de adaptación celular es calcular los segundos que tarda el APD en alcanzar el 90% de la diferencia absoluta entre los valores inicial y final de cada etapa, correspondientes a estados estacionarios. Dicho tiempo se denomina  $t_{90}$ , como ya se describió en la sección 2.6. En la Figura 12 se puede ver que en células de aurícula humana no llega a alcanzarse el estado estacionario tras 10 minutos de estimulación en cada etapa por lo que  $t_{90}$  se midió en nuevas simulaciones alargando 5 minutos cada etapa. En estas nuevas simulaciones se comprobó que el APD sí que alcanzaba un valor estable tras 15 minutos de marcapaseado. El valor de  $t_{90}$  medido tras aceleración de HR resulta  $t_{90} = 487$  s, mientras que tras deceleración de HR es  $t_{90} = 564$  s.

Además de calcular una medida global del tiempo de adaptación del APD a cambios en el ritmo cardiaco, para estimar la velocidad en la adaptación del APD se propuso el método de ajuste exponencial aplicado separadamente sobre cada una de las dos fases de la adaptación (rápida y lenta), tal como se describió en el apartado 2.6. A partir de dichos ajustes exponenciales se obtienen estimaciones de las constantes de tiempo asociadas,  $\tau_{fast}$  y  $\tau_{slow}$ , que miden el tiempo requerido para alcanzar el 63.2% de la diferencia absoluta entre el valor inicial y el valor final de las fases rápida y lenta de la adaptación, respectivamente. En el caso control mostrado en la Figura 12, las constantes de tiempo que caracterizan cada una de las fases de la adaptación toman los siguientes valores: tras aceleración de HR,  $\tau_{fast} = 6.4$  s y  $\tau_{slow} = 297.2$  s; tras deceleración de HR,  $\tau_{fast} = 7.3$  s y  $\tau_{slow} = 404.3$  s.

Con el fin de validar los resultados de las simulaciones, se comparan éstos con los correspondientes obtenidos en trabajos experimentales. En la Figura 13 se muestran los resultados de adaptación del

APD tras deceleración y aceleración de HR obtenidos de simulaciones llevadas a cabo en este proyecto y de experimentos realizados sobre tejido auricular canino [9]. Para comparar los dos casos, en el presente proyecto se utiliza el mismo protocolo de estimulación que el empleado en [9]. Los resultados de la simulación son consistentes cualitativamente con los experimentales puesto que un cambio repentino y mantenido de HR induce una gran variación inicial del APD seguida de una acomodación más lenta, al final de la cual el APD alcanza su nuevo valor estacionario. Cuantitativamente se aprecian algunas diferencias cuyas causas radican en que las simulaciones están basadas en un modelo celular de aurícula humana y los experimentos son llevados a cabo sobre tejidos multicelulares de aurícula canina, debido a la imposibilidad de obtener este tipo de datos en humano.



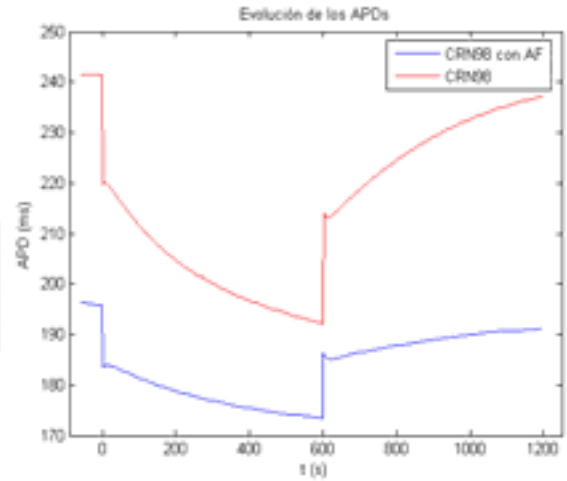
**Figura 13:** Comparación entre adaptación del APD a cambios en HR de simulación en células de aurícula humana frente a los correspondientes obtenidos experimentalmente en tejido auricular canino (tomados de [9]).

En este estudio se ha investigado la memoria cardiaca no sólo en condiciones control (corazones sanos) sino también en condiciones patológicas, tales como AF. Para la simulación de la electrofisiología celular de miocitos auriculares bajo condiciones de AF se ha utilizado una versión modificada del modelo CRN98 (ver apartado 2.7 y referencia [34]). Se observa que bajo AF los APs poseen una morfología mucho más triangular y los valores de APD son notablemente menores para los mismos CLs de estimulación en ambos casos (ver apartado 2.7). Kim *et al.* midieron experimentalmente APs en la pared auricular humana en pacientes con AF, corroborando los cambios morfológicos descritos previamente [31]. En lo referente a la memoria cardiaca, las constantes de tiempo de la fase rápida de adaptación del APD medidas bajo AF resultan similares a las obtenidas en el caso control (ver Figura 14). Sin embargo, las constantes de tiempo de la fase lenta son sustancialmente mayores en corazones con AF que en corazones sanos, lo que permite asociar AF con un mayor grado de memoria cardiaca (ver Figura 14).

En este estudio, se realizó además un análisis de sensibilidad para evaluar cómo las características de la adaptación del APD, en condición control, dependen del valor de CL inicial y de la magnitud de cambio en el CL. Los resultados se muestran en la Figura 15. Puede observarse que ambos factores influyen notablemente en las dos fases de adaptación celular, concluyendo que:

- El CL inicial influye considerablemente en los valores de  $\tau_{fast}$  y  $\tau_{slow}$ , siendo estos cambios estadísticamente significativos (análisis de varianza, p-valor < 0.05). Por una parte,  $\tau_{fast}$  aumenta gradualmente desde valores menores de 8 s cuando el CL inicial es 1000 ms hasta valores mayores de 100 s cuando el CL inicial es 2000 ms. Por otra parte,  $\tau_{slow}$  decrece con CL inicial pasando de  $\tau_{slow} > 300$  s para CL inicial = 1000 ms hasta  $\tau_{slow} = 240$  s para CL inicial = 2000 ms.
- La magnitud de variación entre CLs de las distintas etapas del protocolo *pacing* no tiene un efecto

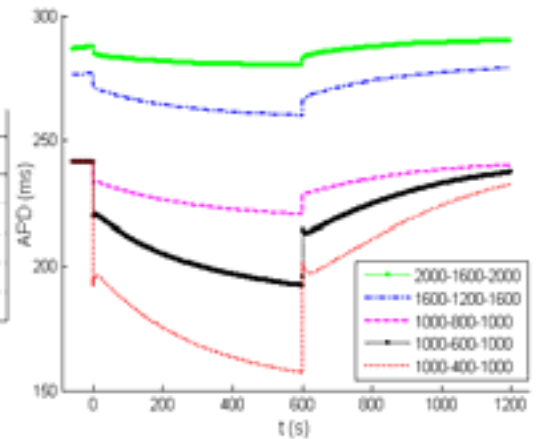
	HRacceleration		HRdeceleration	
	$\tau_{fast}(s)$	$\tau_{slow}(s)$	$\tau_{fast}(s)$	$\tau_{slow}(s)$
CRN98	6.4	297.2	7.3	404.3
CRN98 con AF	10.8	358.8	7.2	484.8



**Figura 14:** Comparación entre constantes de tiempo y adaptación del APD en condiciones control y bajo AF.

claro sobre  $\tau_{slow}$ , puesto que tanto aumentando como disminuyendo la magnitud de cambio el valor de  $\tau_{slow}$  aumenta, siendo estos cambios estadísticamente significativos (análisis de varianza, p-valor  $< 0.05$ ); las variaciones que sufre  $\tau_{fast}$  van desde valores mayores de 12 s a menores de 5 s cuando la magnitud de cambio en el CL varía de 200 a 600 ms, siendo tales variaciones estadísticamente significativas solamente tras aceleración de HR (análisis de varianza, p-valor  $< 0.05$ ).

	HRacceleration		HRdeceleration	
	$\tau_{fast}(s)$	$\tau_{slow}(s)$	$\tau_{fast}(s)$	$\tau_{slow}(s)$
1000-600-1000	6.4	297.2	7.3	404.3
1600-1200-1600	58.8 (p<0.05)	239.8 (p<0.05)	33.4 (p<0.05)	274.1 (p<0.05)
2000-1600-2000	176.2 (p<0.05)	231.0 (p<0.05)	99.4 (p<0.05)	240.3 (p<0.05)
1000-800-1000	23.2 (p<0.05)	190.6 (p<0.05)	12.0 (p>0.05)	449.6 (p<0.05)
1000-400-1000	1.6 (p<0.05)	245.2 (p<0.05)	4.4 (p>0.05)	593.2 (p<0.05)



**Figura 15:** Evolución de los APDs con diferentes configuraciones de protocolo *pacing* y sus respectivas constantes de tiempo. En la tabla y la gráfica se muestran el caso control por defecto (1000-600-1000ms), dos casos con diferente CL inicial (2000-1600-2000ms, 1600-1200-1600ms), y dos casos con diferente magnitud de cambio de CL (1000-800-1000ms, 1000-400-1000ms).

### 3.2. MECANISMOS IÓNICOS DE LA ADAPTACIÓN

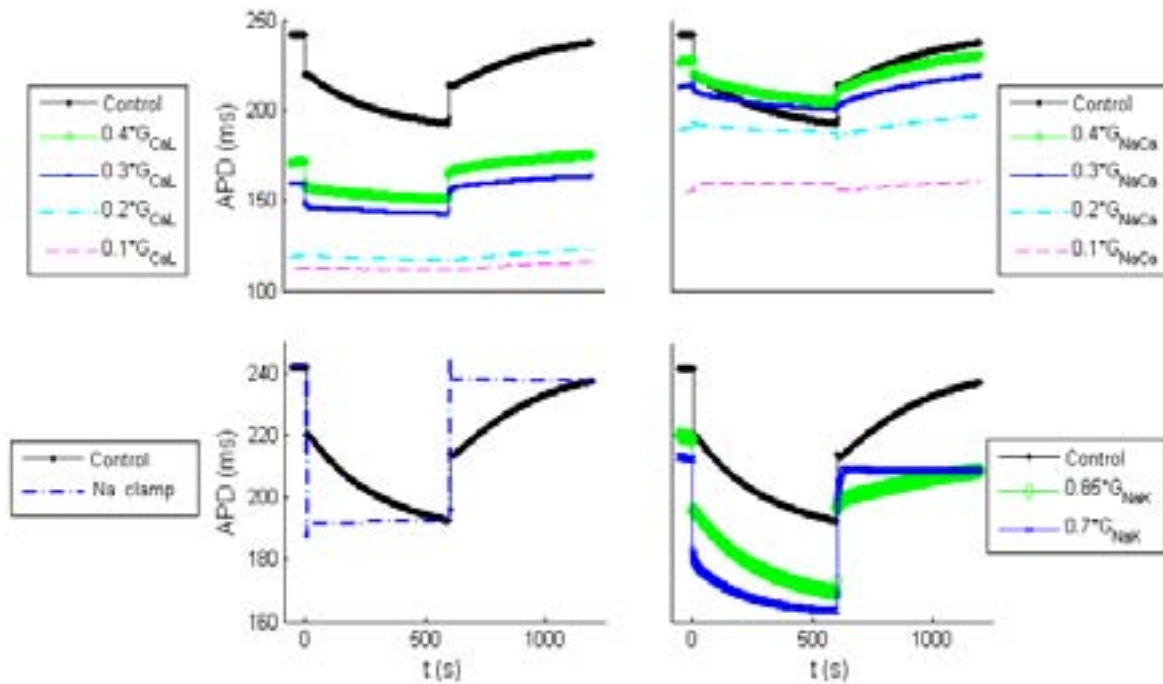
Uno de los principales objetivos de este proyecto ha radicado en la obtención de los principales mecanismos iónicos que hacen posible la adaptación del APD en las células de aurícula. Aunque todas las concentraciones y corrientes iónicas descritas en el modelo computacional de aurícula humana



utilizado en este estudio tienen influencia en la determinación del AP, no todas tienen una relevancia significativa en el proceso de adaptación del APD frente a cambios en HR.

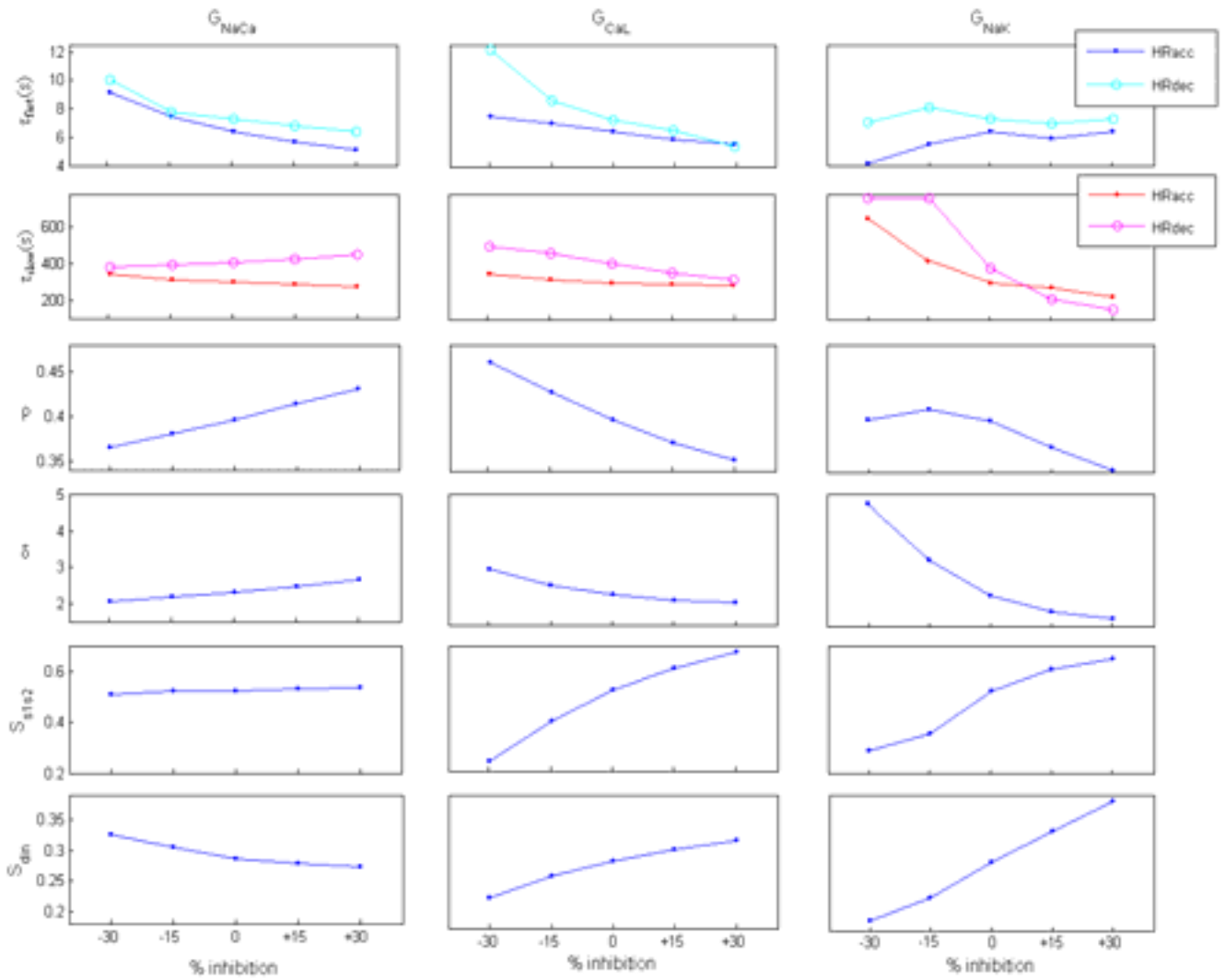
Para dilucidar los mecanismos iónicos implicados en la adaptación, se comparan los valores de las constantes de tiempo,  $\tau_{fast}$  y  $\tau_{slow}$ , que caracterizan el proceso de adaptación del APD, para distintas condiciones en las que se simulan variaciones en los parámetros del modelo de +30 %, +15 %, 0, -15 % y -30 % respecto de sus valores por defecto, tal como se describió en el apartado 2.6. Una primera identificación de los mecanismos que influyen decisivamente en la adaptación del APD, se llevó a cabo a través de la evaluación de los valores de  $\tau_{fast}$  y  $\tau_{slow}$  para los distintos porcentajes de variación simulados para cada parámetro. Para corroborar la actuación sobre la memoria cardiaca de los parámetros identificados, se realizaron simulaciones específicas que se detallan en los siguientes párrafos.

Respecto a los mecanismos que afectan a la fase rápida de la adaptación, se comprueba que los valores de  $\tau_{fast}$  únicamente se alteran de forma significativa al modificar las conductancias máximas de dos corrientes iónicas: la corriente de calcio de tipo L,  $I_{CaL}$ , y el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ ,  $I_{NaCa}$ . Para confirmar este hecho, se realizan simulaciones en las que se disminuyen tales conductancias,  $G_{CaL}$  y  $G_{NaCa}$ , en grados mayores (hasta un 90 %) y se constata que en estas circunstancias la fase rápida de la adaptación del APD prácticamente desaparece (ver fila superior de la Figura 16). La cuantificación de lo anterior se presenta en la primera fila de la Figura 17, donde se muestra que inhibiciones del 30 % en  $G_{CaL}$  y  $G_{NaCa}$  causan un incremento sustancial de  $\tau_{fast}$  (tras la aceleración de HR  $\tau_{fast} = 7.5$  s y 9.2 s bajo un 30 % de reducción de  $G_{CaL}$  y  $G_{NaCa}$ , respectivamente, mientras que en control  $\tau_{fast} = 6.4$  s; los valores de  $\tau_{fast}$  tras deceleración de HR son, respectivamente, 12.1, 10.1 y 7.3 s).



**Figura 16:** Evolución del APD bajo condiciones control, inhibición de  $G_{CaL}$  (panel superior izquierdo), inhibición de  $G_{NaCa}$  (panel superior derecho), “clamping” de  $[Na^+]_i$  (panel inferior izquierdo), e inhibición de  $G_{NaK}$  (panel inferior derecho).

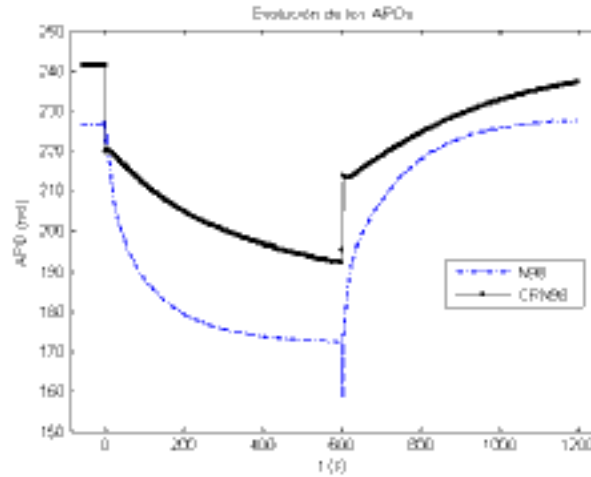
Analizando los resultados correspondientes a la fase lenta, se deduce que ésta está fuertemente caracterizada por la dinámica de  $[Na^+]_i$ . Simulando la condición Na clamp, en la que el valor de  $[Na^+]_i$  se fija en cada una de las etapas del protocolo *pacing* al valor que tomaría dicha concentración en el caso control al final de cada una de las etapas (14.9 mM en la etapa de CL = 600 ms, y 14.0



**Figura 17:** Resultados de diferentes marcadores ( $\tau_{fast}$ ,  $\tau_{slow}$ ,  $\rho$ ,  $\delta$ ,  $S_{S1S2}$  y  $S_{din}$ ) con los tres mecanismos más influyentes en la adaptación ( $G_{NaCa}$ ,  $G_{CaL}$  y  $G_{NaK}$ ), con porcentajes de inhibición de -30 %, -15 %, 0, +15 % y +30 % respecto a los valores por defecto del modelo.

mM en la etapa con CL = 1000 ms), se observa que tal condición conlleva la abolición de la fase lenta de la adaptación, ocurriendo ésta únicamente en los primeros segundos tras el cambio de CL (ver fila inferior de la Figura 16, panel izquierdo). La inhibición de la actividad de la bomba  $Na^+/K^+$  afecta considerablemente a la dinámica de  $[Na^+]_i$  y, por consiguiente, al valor de  $\tau_{slow}$ , como se muestra en el panel derecho de la segunda fila de la Figura 17 (tras aceleración de HR  $\tau_{slow} = 601.9$  y  $453.6$  s con inhibiciones de  $Na^+/K^+$  del 30 % y 15 %, respectivamente, mientras que el valor en control es  $297.2$  s; después de la aceleración de HR  $\tau_{slow} = 780.1$ ,  $734.5$  y  $404.3$  s, respectivamente).

Con el propósito de confirmar que los mecanismos iónicos de la adaptación identificados en este estudio son independientes del modelo empleado para describir la actividad electrofisiológica celular en aurícula humana, las mismas simulaciones anteriormente descritas (realizadas utilizando el modelo CRN98) se llevaron también a cabo utilizando el modelo descrito por Nygren *et al.* (N98) [12]. En la Figura 18 puede observarse que la evolución temporal del APD con este modelo presenta algunas diferencias respecto a la obtenida con el modelo CRN98, las cuales se discuten más detalladamente en el capítulo 4. Analizando la Figura 18, se observa que, utilizando el modelo N98, en la fase rápida tras aceleración de HR se produce un aumento inicial del APD, que no aparece al emplear el modelo



**Figura 18:** Resultados de evolución temporal del APD mediante protocolo *pacing* 1000-600-1000 ms con los modelos celulares de aurícula de Nygren y Courtemanche.

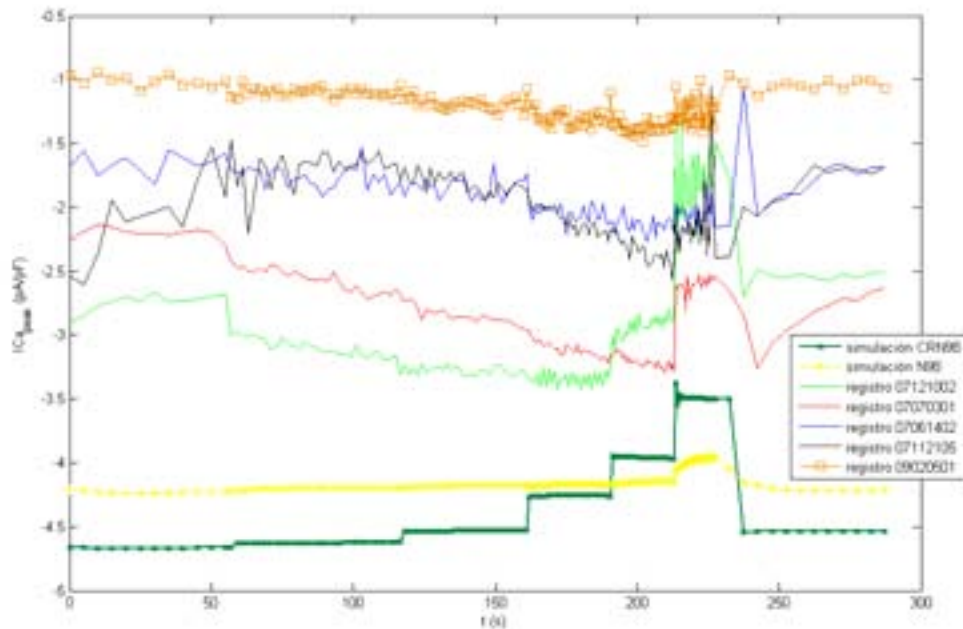
CRN98, seguido de una disminución significativa de los valores de APD. Tras deceleración de HR los valores de APDs disminuyen inicialmente para después experimentar un aumento significativo durante los minutos posteriores. Empleando el modelo N98, el ajuste exponencial realizado sobre la fase rápida para dilucidar los mecanismos iónicos de ésta no resulta adecuado debido al tipo de evolución no monótona que sufre el APD instantes después de producirse el cambio en HR. Por esta razón, se inhiben fuertemente las corrientes iónicas del modelo y se observan los casos que más atenúan la fase rápida de la adaptación. Los mecanismos iónicos dilucidados subyacentes a la fase rápida de la adaptación del APD son, de la misma manera que utilizando el modelo CRN98, las conductancias máximas asociadas al intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  y a  $I_{CaL}$ .

Respecto a la fase lenta de la adaptación, la diferencia principal radica en el menor tiempo que tarda el APD en llegar a un valor estacionario cuando se utiliza el modelo de Nygren ( $t_{90} = 288.7$  y  $329.6$  s, tras aceleración y deceleración de HR, respectivamente). A pesar de las citadas diferencias, los mecanismos iónicos implicados en la adaptación del APD ante cambios en HR, estudiados con los mismos métodos descritos para CRN98, resultaron ser los mismos usando cualquiera de los dos modelos. Reduciendo  $G_{NaK}$  al 30 %, el valor de la constante de tiempo de la fase lenta,  $\tau_{slow}$ , aumenta desde 145.0 s en condiciones control hasta 261.2 s cuando se inhibe  $G_{NaK}$ , tras aceleración de HR; y desde 131.1 s hasta 316.4 s, tras deceleración de HR. Estos resultados corroboran que la actividad de la bomba  $Na^+/K^+$  es un mecanismo que juega un papel muy importante en la memoria cardiaca en miocitos auriculares.

### 3.3. VALIDACIÓN CON DATOS EXPERIMENTALES DE MIOCITOS DE AURÍCULA HUMANA

El Grupo de Investigación en Electrofisiología Celular del Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu de Barcelona tienen gran experiencia en la obtención y el estudio del  $Ca^{2+}$  celular y sus corrientes asociadas [13, 14, 16]. Mediante el protocolo experimental descrito en 2.1.2, se obtuvieron registros de la corriente de calcio de tipo L,  $I_{CaL}$ , en diferentes miocitos auriculares humanos. Los valores de pico de dicha corriente, que toman valores negativos, son comparados con los que se obtienen a partir de las simulaciones llevadas a cabo utilizando los modelos CRN98 y N98 aplicando el mismo protocolo de estimulación que en los registros experimentales. Los resultados de esta comparación se muestran en la Figura 19. Se observa claramente una variabilidad muy alta entre los resultados de miocitos

diferentes, aunque hay tendencias similares en la mayoría de ellos. Por ejemplo, en las primeras etapas de marcapaseado, con CLs largos ( $CL > 1000$  ms), se observan pocas variaciones en la amplitud de  $I_{CaL}$  según va disminuyendo el valor de CL y no se observa una tendencia clara de aumento/disminución de dicha amplitud. En las etapas de CLs más cortos ( $CL \leq 750$  ms) se produce una disminución notable del valor absoluto de pico asociado a  $I_{CaL}$ , siendo tal observación aplicable a muchos de los registros experimentales así como a las simulaciones con los modelos auriculares humanos.



**Figura 19:** Evolución de la amplitud de los picos de  $I_{CaL}$  obtenida de registros experimentales y a partir de los modelos CRN98 y N98, mediante el protocolo de estimulación descrito en el apartado 2.1.2.

En la mayoría de los registros experimentales, el valor de pico de  $I_{CaL}$  es en valor absoluto menor que el que se obtiene a partir de los modelos CRN98 y N98 debido a que la configuración de Patch-Clamp empleada (*perforated patch*) permite una realimentación negativa del calcio intracelular que influye notablemente en la amplitud total de la corriente de calcio entrante que se registra.

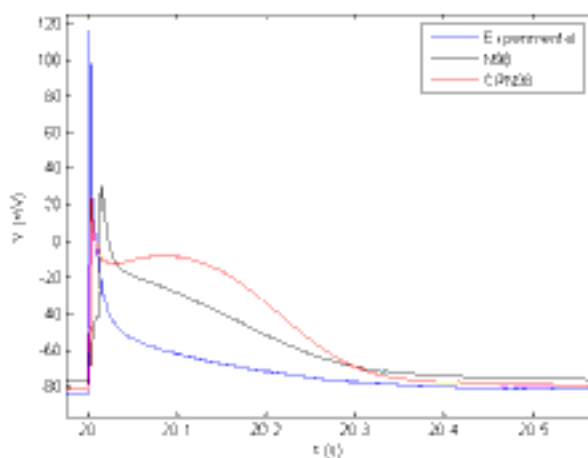
Por otra parte, también se hicieron experimentos con la técnica de Current-Clamp para obtener medidas de potencial transmembrana en células de aurícula humana en función del tiempo siguiendo el mismo protocolo de estimulación descrito en el apartado 2.1.2. Los resultados se muestran en la Figura 20. La fiabilidad de los resultados experimentales no es muy elevada debido a diferentes motivos:

- La configuración de *perforated patch* empleada hace que la densidad de corriente de calcio suele ser de 2 a 4 veces inferior a valores obtenidos con otro tipo de configuraciones *whole cell* como *ruptured patch*, conllevando una fase de meseta en el AP inexistente.
- El *overshoot* inicial del AP es anormalmente elevado debido a que coincide con el pulso de estimulación aplicado (de duración 2 ms y amplitud 1 nA), haciendo que el registro no sea fiable durante los primeros 2-2.5 ms.
- Después del pulso de estimulación, la corriente externa (*holding current*) se fija a -24 pA, tal como se describe en el apartado 2.1.3, valor que teóricamente debería ser igual a 0 ó a la corriente de

fuga. Puesto que no se puede conocer con exactitud la corriente de fuga real, se fijó a dicho valor para la célula bajo estudio, condicionando el potencial de reposo registrado y, potencialmente, también el AP [15].

- Los registros dependen también de la técnica empleada, es decir Current-Clamp (como la usada en este estudio) o microelectrodos convencionales, produciendo diferentes resultados en función de cuál se utilice.
- La temperatura a la que se realizan los experimentos también afecta a muchos parámetros, siendo de 22-25°C en los experimentos frente a los 36°C de temperatura corporal en la que se basan los modelos computacionales [11, 12].

Como consecuencia de los motivos aquí mencionados, no se han considerado los registros de potencial transmembrana grabados en el hospital Sant Pau y sólo se han utilizado los registros de  $I_{CaL}$  para la validación.



**Figura 20:** Comparación entre un AP obtenido experimentalmente estimulando periódicamente con  $CL = 5000$  ms y los correspondientes APs obtenidos con los modelos CRN98 y N98.

### 3.4. COMPARACIÓN AURÍCULA-VENTRÍCULO

Las analogías y diferencias entre aurícula y ventrículo en la memoria cardiaca se investigaron comparando los resultados del presente trabajo con los obtenidos en [25] para células ventriculares humanas. Aunque los APs auriculares y ventriculares son sustancialmente diferentes en forma y duración, puesto que en aurícula su forma es más triangular y su duración es significativamente menor (unos 100 ms más corta), en este estudio se observa que el APD se adapta de manera muy similar en los dos casos, ambos con fases rápida y lenta caracterizando su adaptación. No obstante, mientras que el tiempo de adaptación en ventrículo es de alrededor de 3-4 minutos, en aurícula dicho tiempo de adaptación supera los 8 minutos (ver Figura 21).

Los mecanismos iónicos subyacentes a la fase rápida de adaptación del APD son diferentes, recayendo sobre las cinéticas de inactivación de  $I_{CaL}$  y activación de  $I_{Ks}$  (corriente rectificadora lenta retardada de potasio) en ventrículo [25], y sobre las conductancias máximas  $G_{NaCa}$  y  $G_{CaL}$  en aurícula, como se mostró previamente. Por otro lado, los mecanismos iónicos implicados en la fase lenta de la adaptación del APD a cambios en HR son comunes en aurícula y ventrículo, y están principalmente determinados por la dinámica de la concentración intracelular de sodio,  $[Na^+]_i$ .

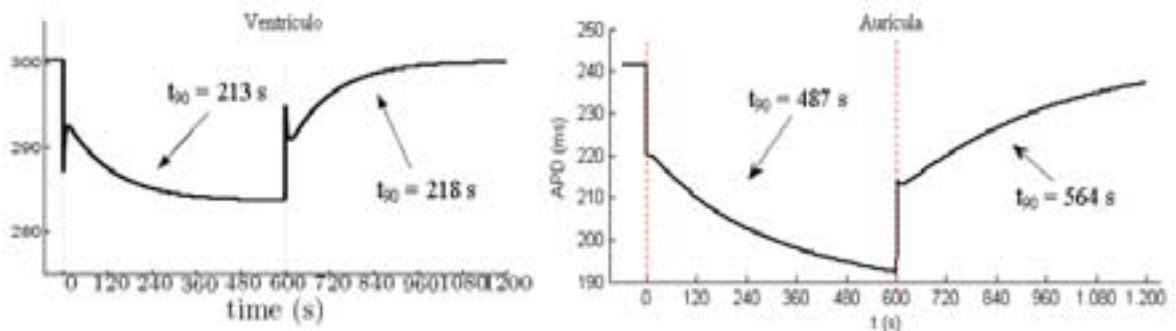
Otra diferencia importante radica en la aparición de posdespolarizaciones tempranas (EADs) bajo determinadas condiciones en cardiomiocitos ventriculares. Las EADs se muestran como incrementos del potencial transmembrana durante la fase 3 del AP, generalmente provocados por una recuperación temprana de los canales de activación de la corriente de calcio. Utilizando los modelos de aurícula humana, no se obtienen EADs sea cual sea la condición estudiada, aunque sí es posible observar posdespolarizaciones retardadas (DADs) con el modelo de Nygren *et al.* Las DADs se caracterizan por la generación de un AP cuando la célula está en reposo y no se ha aplicado ningún estímulo externo, y suelen deberse a la apertura de suficientes canales de iones calcio entrantes para despolarizar la célula.

### 3.5. RELACIÓN ENTRE MEMORIA CARDIACA Y RIESGO ARRÍTMICO

Otro de los objetivos esenciales de este proyecto consiste en el estudio de la relación entre un mayor grado de memoria cardiaca, es decir, valores de  $\tau_{fast}$  o  $\tau_{slow}$  mayores, que implican una adaptación más lenta del APD, y el riesgo proarrítmico. Para ello, los marcadores  $\rho$ ,  $\delta$ ,  $S_{S1S2}$  y  $S_{din}$  descritos en el apartado 2.8 se examinan en diferentes condiciones simuladas para las que previamente se había demostrado que alteraban las dinámicas de adaptación del APD.

Con respecto a la relación entre la ralentización de la fase rápida de la adaptación y el riesgo arrítmico, la Figura 17 muestra que un incremento en  $\tau_{fast}$  causado por inhibición de  $I_{NaCa}$  de hasta un 30 % no está relacionado con un aumento del riesgo, como puede verse en la cuantificación de cualquiera de los biomarcadores estudiados. Sin embargo, un aumento de  $\tau_{fast}$  inducido por la inhibición de  $I_{CaL}$  se asocia con una mayor probabilidad de generación de posdespolarizaciones, inducida por la mayor probabilidad de reactivación de la corriente de calcio ( $\rho$  toma un valor de 0.46 cuando se inhibe  $I_{CaL}$  al 30 %, mientras que en control  $\rho = 0.39$ ), y a una mayor triangulación del AP ( $\delta = 2.99$  tras inhibir  $I_{CaL}$  al 30 %, y 2.33 en condiciones control). En lo que respecta a las pendientes de la curva de restitución,  $S_{S1S2}$  y  $S_{din}$ , cuando se inhibe  $I_{CaL}$ , se observa que éstas toman valores sustancialmente más suaves que en el caso control ( $S_{S1S2} = 0.24$  frente a 0.52;  $S_{din} = 0.23$  frente a 0.29; ambos casos en inhibición de  $I_{CaL}$  al 30 % y control, respectivamente). Una disminución en las pendientes de restitución se ha asociado en ocasiones a una mayor estabilidad de arritmias de reentrada ([25]).

Además, la Figura 17 muestra que la inhibición de la bomba  $Na^+/K^+$  contribuye a retardar notablemente la fase lenta de la adaptación del APD utilizando el modelo CRN98, tal como se ha descrito en el apartado 3.2. Analizando la fase lenta de la adaptación tras aceleración de HR usando el modelo N98, se obtiene que  $\tau_{slow} = 131.1$  s en condiciones control, 144.5 s inhibiendo  $Na^+/K^+$  al 15 %, y 316.4 s con inhibición al 30 %. Relacionando los resultados obtenidos para  $\tau_{slow}$  en condiciones



**Figura 21:** Comparación de los resultados de simulaciones de adaptación del APD en células del epicardio ventricular [25] y en células de aurícula, ambos en humano, mostrando además los valores del tiempo de adaptación  $t_{90}$  para las diferentes etapas.

control y tras inhibir la bomba  $Na^+/K^+$  en un 30%, puede concluirse que esta última condición lleva a un mayor riesgo proarrítmico, según se manifiesta a través de: una mayor probabilidad de reactivación de la corriente de calcio ( $\rho = 0.40$ ), triangulación de los APs mucho más acusada ( $\delta = 4.73$ ), y pendientes de APDR menos pronunciadas ( $S_{S1S2} = 0.29$ ;  $S_{din} = 0.20$ ).

### 3.6. RESULTADOS EN SIMULACIONES UNIDIMENSIONALES

En simulaciones de cable unidimensional, la morfología de los APs cambia de una célula a otra debido a la diferente influencia de las vecinas en cada instante de tiempo. En la Figura 22 se muestran los APs que se obtienen con el modelo CRN98 a partir del tercer estímulo aplicado sobre la primera célula de un cable de 200 células con un CL de 1000 ms; el retardo temporal medido entre los extremos del cable es de aproximadamente 93 ms, lo que implica una velocidad de conducción de 53.5 cm/s, que es sólo ligeramente mayor que el obtenido en algunos registros experimentales en fibras auriculares humanas (41-44 cm/s) [39].

En el estudio de la adaptación del APD en el cable de células se obtuvieron diferentes resultados con cada uno de los dos modelos empleados (CRN98 y N98). Los APs con el modelo de Courtemanche se vuelven significativamente alternantes en su duración tras unos minutos de marcapaseado en todas las células del cable debido a que la interacción con células vecinas lleva a un alargamiento en la fase de repolarización que sucede de manera alternativa en uno de cada dos latidos. Sin embargo, utilizando el modelo de Nygren la adaptación del APD es mucho más suave y similar al caso unicelular (ver Figura 23).

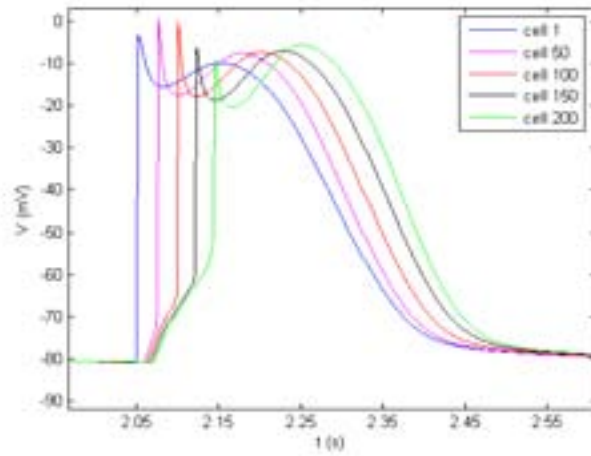
En la siguiente Tabla se muestran los valores de  $t_{90}$  y  $\tau_{slow}$  para tres células diferentes (la número 1, la número 100 y la número 200) pertenecientes al cable unidimensional de 200 células empleando dos valores distintos del coeficiente de difusión:  $D = 0.001$  y  $0.01 \text{ cm}^2/\text{ms}$  ( $\tau_{fast}$  no se muestra puesto que los DADs, que se generan con el modelo de Nygren en los primeros latidos tras el cambio repentino de HR, hacen inviable su cálculo):

1D fibra (D=0.001)	célula 1	célula 100	célula 200
$t_{90}$ (s) (acc/dec)	174.2/290.4	249.5/296.6	283.7/304.3
$\tau_{slow}$ HRacc (s)	112.5	129.3	136.4
$\tau_{slow}$ HRdec (s)	177.4	181.3	178.6

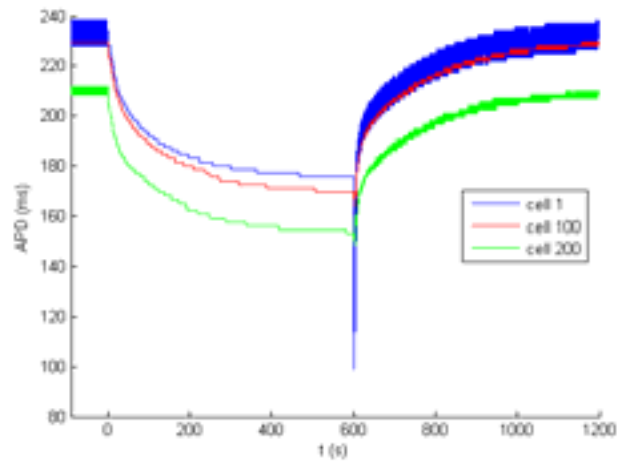
1D fibra (D=0.01)	célula 1	célula 100	célula 200
$t_{90}$ (s) (acc/dec)	288.3/342.0	263.1/324.5	159.6/232.6
$\tau_{slow}$ HRacc (s)	113.8	117.2	120.9
$\tau_{slow}$ HRdec (s)	175.8	179.2	175.8

Como puede verse en la Tabla anterior, las constantes de tiempo de las funciones ajustadas en las distintas células toman valores muy similares en ambos casos con distinto D, por lo que puede concluirse que la adaptación del APD es un fenómeno a nivel celular, ya que la memoria cardiaca no resulta apenas afectada por cambios en los parámetros de propagación de los APs en la fibra unidimensional.





**Figura 22:** APs resultantes tras el tercer estímulo con modelo CRN98 cada 1000 ms en células de un cable unidimensional de 200 células de longitud.



**Figura 23:** Evolución del APD en distintas células de un cable unidimensional de 200 células de longitud marcapseando a 1000-600-1000ms con el modelo N98.



## 4. DISCUSIÓN

El presente trabajo se centra en investigar la respuesta del APD en células auriculares tras cambios repentinos y mantenidos en HR. No tenemos constancia de que esta dependencia dinámica haya sido investigada previamente en aurícula humana, aunque sí que existen algunos estudios experimentales que analizan la memoria cardiaca en tejido de aurícula canina [9, 10]. A pesar de las diferencias existentes entre especies, se demuestra en este estudio que la memoria cardiaca comparte las mismas características y mecanismos iónicos en perro y humano. Concretamente, nuestras simulaciones con modelos de células de aurícula humana y los experimentos realizados en [9, 10] muestran que el proceso completo de adaptación del APD al ritmo cardiaco tarda varios minutos en completarse y comprende dos fases bien diferenciadas, rápida y lenta. En ambas especies, la adaptación rápida se relaciona con cambios en el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ ,  $I_{NaCa}$ , y en la corriente de calcio de tipo L,  $I_{CaL}$ , aunque el papel de  $I_{CaL}$  es más notorio en humano que en perro, mientras que la fase lenta de la adaptación está invariablemente determinada por la dinámica intracelular de sodio,  $[Na^+]_i$ .

En la literatura pueden encontrarse estudios diversos donde se analiza el papel de  $I_{NaCa}$  e  $I_{CaL}$ , la mayoría de ellos trabajos experimentales en diferentes especies animales y un número muy limitado de ellos en humano. Respecto al intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , es una molécula que intercambia tres iones  $Na^+$  del exterior de la célula con un ion  $Ca^{2+}$  del interior. Su función principal estriba en el transporte de iones de  $Ca^{2+}$  al exterior de la célula para compensar la mayor parte de los entrantes vía la corriente  $I_{CaL}$  [40]. Un ejemplo de estudio del intercambiador es el realizado por Watano *et al.* [41] donde relacionan el efecto del fármaco KB-R7943, inhibidor del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , con la protección arrítmica en corazones de coballa, concluyendo que dicho fármaco actúa más notablemente sobre el intercambiador en modo inverso (sacando  $Na^+$  de la célula e introduciendo  $Ca^{2+}$ ) y suprime las arritmias inducidas previamente con otras sustancias. Sin embargo, estudios experimentales llevados a cabo en perro, como el de Miyamoto *et al.* [42], demuestran que el efecto de inhibición del modo inverso del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  no es útil para prevenir arritmias por isquemia o reperfusión, por lo que el papel de este mecanismo puede ser controvertido y dependiente de la especie. Por otra parte, en el trabajo desarrollado por Pott *et al.* [43] se muestra que el efecto de la supresión del intercambiador en cardiomiocitos de ratón, que a su vez conlleva una reducción en  $I_{CaL}$ , influye muy ligeramente en la repolarización y duración del AP.

Respecto a la corriente de calcio de tipo L, Klein *et al.* [44] investigan la relación entre la actividad de los canales iónicos asociados a esta corriente y la fibrilación auricular en seres humanos concluyendo que la probabilidad de que los canales se encuentren abiertos es más alta en condiciones de fibrilación auricular, implicando una mayor actividad de cada canal individual, aunque globalmente la corriente se vea reducida debido a la regulación del mRNA en las subunidades  $\alpha_{1c}$  de los canales de calcio de tipo L. Otros estudios experimentales sobre fibrilación auricular, como el llevado a cabo por Bosch *et al.* [45] en humano o el realizado por Laszlo *et al.* [46] en conejo, concluyen que  $I_{CaL}$  se reduce en un porcentaje considerable ( $> 35\%$ ) en situación de fibrilación, lo que conlleva un acortamiento de la duración de los APs y una reducida respuesta al HR en la repolarización auricular. Por otro lado, Yue *et al.* [47] estudiaron los efectos de marcapasear rápidamente durante largo tiempo sobre aurícula canina y obtuvieron que la corriente de calcio juega un papel importante sobre la fase de meseta de los APs, la cual se ve fuertemente atenuada en situaciones de fibrilación. Además,  $I_{CaL}$  es la responsable de desencadenar la liberación de iones  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico [40]. En estudios que trataron de identificar la contribución de  $I_{CaL}$  en cardiomiocitos de aurícula humana sobre el valor de APD, como el desarrollado por Li *et al.* [48], concluyen que esta corriente contribuye de manera importante en el control autónomo del APD y en su dependencia con HR.

El último de los mecanismos implicados en la adaptación del APD, según se ha demostrado en el presente estudio, es la bomba  $Na^+/K^+$ . Ésta también ha sido objeto de numerosas investigaciones.

Esta bomba electrogénica se encarga de intercambiar tres iones de  $Na^+$  del interior celular con dos iones de  $K^+$  externos a la membrana celular utilizando energía proporcionada por moléculas de ATP. Carmeliet [40, 49] describe la relevancia sobre la memoria cardiaca en aurícula de este mecanismo, que principalmente está regulado por la concentración intracelular de sodio ( $[Na^+]_i$ ); esta dependencia explica el hecho de que la tasa de bombeo sea muy sensible a la frecuencia de estimulación (si ésta aumenta considerablemente se produce un incremento en  $[Na^+]_i$  resultando en una mayor corriente hacia el exterior). Según los trabajos de Wang *et al.* [50] y Bers *et al.* [51], la bomba  $Na^+/K^+$  tiene menor actividad en las células de las aurículas que en las correspondientes a los ventrículos (alrededor de un 50% menor) debido a los niveles más bajos de algunas de las subunidades que componen las proteínas que realizan la función de la bomba electrogénica ( $Na^+/K^+$ -ATPasa); además, en el último de los estudios citados, el de Bers *et al.* [51], se detallan los numerosos mecanismos de transporte que afectan al sodio intracelular en células cardiacas y se explica que una inhibición de la bomba  $Na^+/K^+$  influye indirectamente en los transitorios de la concentración intracelular de calcio, aumentando su pico máximo, debido a una menor necesidad de intercambiar sodio externo con calcio interno mediante el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ . En lo referente a la memoria cardiaca, la influencia de la bomba  $Na^+/K^+$  en la adaptación del APD a diferentes HR ya fue previamente investigada experimentalmente en cardiomiocitos ventriculares caninos por Boyett *et al.* [52], los cuales observaron que inhibiendo la bomba con estrofantidina la fase lenta de la adaptación prácticamente desaparecía. Drake *et al.* [53] también describieron la relevancia de la bomba  $Na^+/K^+$  en el acortamiento de la duración del AP en células cardiacas de perro al aumentar la frecuencia cardiaca, afirmando que debido a la mayor actividad de la bomba se produce una mayor densidad de corriente saliente de la célula que lleva a valores menores de APD.

Además de caracterizar los mecanismos iónicos de la memoria cardiaca, otro punto importante de este estudio se centra en investigar cómo difiere esta memoria entre células pertenecientes a las aurículas y a los ventrículos. Se demuestra que la memoria cardiaca tiene un efecto más prolongado en las aurículas, donde las constantes de tiempo de las fases rápida y lenta de adaptación del APD son:  $\tau_{fast} = 6.4$  y  $7.3$  s,  $\tau_{slow} = 297.2$  y  $404.3$  s tras aceleración y deceleración de HR, respectivamente. En cambio, en células ventriculares del epicardio las constantes de tiempo evaluadas mediante el mismo protocolo resultan:  $\tau_{fast} = 10.8$  y  $22.0$  s,  $\tau_{slow} = 128.3$  y  $120.9$  s, respectivamente, tras aceleración y deceleración, como se detalla en [6] y puede observarse en la Figura 21. Los mecanismos iónicos de la memoria cardiaca son similares en las dos cavidades con respecto a la fase lenta de la adaptación, pero no en la fase rápida, tal y como se explicó anteriormente en el apartado 3.4.

Por otro lado, uno de los principales objetivos del presente estudio consiste en establecer una relación entre la memoria cardiaca en aurícula humana y el riesgo proarrítmico. Hemos expuesto que una respuesta retardada del APD ante cambios en HR se asocia con un mayor riesgo de generación y perpetuación de arritmias debido a una probabilidad más alta de desarrollar posdespolarizaciones y, posiblemente, de favorecer la estabilidad de las ondas reentrantres en el corazón, aunque este último mecanismo requiere un estudio en mayor profundidad para su corroboración. Nuestros resultados están en concordancia con las observaciones hechas en los estudios llevados a cabo en [9], donde la adaptación del APD al HR en las aurículas se evalúa en condiciones normales y en condiciones inducidas de fibrilación auricular, y se demuestra que una prolongación en la adaptación está estrechamente relacionada con un incremento en la probabilidad de reactivación de arritmias. Además, las pendientes de las curvas de restitución en condiciones que retardan la memoria cardiaca son notablemente menos pronunciadas, favoreciendo la estabilidad de las reentradas (impulsos eléctricos que viajan por el corazón en círculos cerrados en lugar de iniciarse en un extremo y acabar deteniéndose en el otro), tal y como se detalla en otros estudios, como el experimental realizado por Frame y Simson en [33]. En dicho trabajo se estudian oscilaciones de CL en tejido y sus efectos sobre el APD, y se concluye que pendientes elevadas de la curva de restitución del APD frente a DI favorecen la aparición de taquicardias muy inestables, que pueden acabarse cuando el CL es suficientemente pequeño, mientras que pendientes suaves están relacionadas con taquicardias más estables.

En relación a las investigaciones previas llevadas a cabo en tejidos multicelulares cardiacos, Xie *et al.* [28] emplean el modelo de Courtemanche para estudiar la restitución de diferentes parámetros como el APD, el período refractario efectivo (intervalo temporal tras un AP en el que no se puede generar un nuevo AP debido al estado de las compuertas iónicas), o la velocidad de conducción (CV) en cable 1-D y tejido 2-D, obteniendo que en condiciones control existe una clara dependencia de las curvas de restitución con el CL de estimulación tanto en casos unicelulares (0-D) como en fibras multicelulares (1-D). Por otra parte, Cherry *et al.* también realizan diferentes investigaciones basadas en simulaciones 1-D y 2-D [29, 54, 55, 56] donde estudian la restitución de APD y CV con los modelos CRN98 y N98. Además, en esos mismos estudios analizan las variaciones de los APs y APDs en configuraciones 1-D en anillo mediante el modelo CRN98, obteniendo que existe periodicidad en la evolución del APD y diferentes CLs de estimulación en 1-D mediante el modelo N98, concluyendo que se produce un bloqueo en la propagación de algunos APs para CLs menores de 300 ms. También investigan la propagación de frentes de onda en tejidos 2-D, resultando estables con el modelo de Nygren e inestables con el de Courtemanche. Todo ello resulta concordante con los resultados obtenidos en este trabajo en el que se ha probado mediante simulaciones de fibras 1-D homogéneas (coeficiente de difusión,  $D$ , es constante) que la adaptación del APD ante cambios en HR se produce a nivel celular, ya que las diferencias en la memoria cardiaca caracterizada en las diferentes células de la fibra son mínimas.

#### 4.1. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las simulaciones computacionales llevadas a cabo en este estudio se realizan con dos modelos distintos de células de aurícula humana: el modelo de Courtemanche *et al.* [11] y el de Nygren *et al.* [12]. Cada uno de ellos posee una formulación específica para cada corriente y concentración iónica, lo que implica que los resultados obtenidos en simulaciones de APs varían en función del modelo que se utilice. Puesto que ambos fueron desarrollados casi simultáneamente, estas diferencias nacen de la diferente localización en la aurícula de las células empleadas en los experimentos en los que se basa cada modelo, así como de los distintos métodos de extracción, estimulación y registro de las corrientes. En consecuencia, esto influye en la importancia relativa que se da en cada modelo a cada corriente iónica respecto del resto de corrientes, y afecta directamente a los valores que toma el potencial transmembrana. Así, por ejemplo, en el modelo de Nygren la morfología del AP es más triangular y tanto el APD como el potencial de reposo son menores. En un exhaustivo estudio llevado a cabo por Nygren *et al.* [57] se analizan las causas de las diferencias entre los dos modelos, comparando ambos corriente a corriente, llegando a la conclusión de que ponderando de manera adecuada las conductancias iónicas asociadas a cada corriente, pueden obtenerse resultados prácticamente iguales en los APs de ambos modelos. Cherry *et al.* [54] también estudian ambos modelos y comparan los resultados que se obtienen tras aplicar los mismos protocolos de estimulación en cada modelo, concluyendo que ambos difieren notablemente en algunos aspectos. Esto explica que, en el análisis de la memoria cardiaca realizado en el presente estudio, se obtengan resultados cuantitativos diferentes en función del modelo que se emplee. No obstante, los resultados cualitativos referidos a la memoria cardiaca obtenidos con ambos modelos han resultado ser concordantes, ya que los mecanismos iónicos subyacentes son los mismos en uno y otro modelo

Por otro lado, en este trabajo se ha estudiado la memoria cardiaca en cardiomiocitos aislados y también en un cable unidimensional, esto es, una sucesión de células que representa una fibra muscular cardiaca. Sin embargo, en la realidad las fibras musculares se encuentran formando parte de tejidos bidimensionales y éstos a su vez del corazón completo, por lo que las consecuencias sobre el desarrollo de arritmias o la perpetuación de reentradas puede variar en función de la dimensionalidad del estudio [58]. Para superar esta limitación existen métodos que simulan dinámicas cardiacas más complejas y de mayor dimensionalidad, como los descritos en [55, 56], donde se proponen y evalúan métodos de refinamiento espacio-temporal adaptativo en 2-D y 3-D, que permiten realizar las simulaciones de

forma muy eficiente, haciendo que la resolución sea más fina en ciertas zonas que en otras.

El registro experimental de APs en miocitos auriculares supone una gran limitación debido a las grandes dificultades para obtener mediciones estables, puesto que es necesario aplicar una *holding current* para contrarrestar la corriente de fuga que aparece en las experimentaciones (ver explicación en apartado 3.3). Cada uno de los métodos existentes para registrar potenciales de acción, como los microelectrodos o la técnica Current-Clamp, posee ciertas limitaciones para la obtención de resultados fiables.

Debido a la escasa disponibilidad en la literatura de datos de corrientes iónicas en humano, surgió la necesidad de registrar corrientes de Ca ante cambios súbitos mantenidos en la frecuencia cardiaca. El número de registros disponibles para el análisis experimental es bastante reducido como consecuencia de todas las connotaciones éticas que conllevan estas investigaciones.

A pesar de todas las limitaciones mencionadas, las simulaciones realizadas en este estudio suponen un riguroso intento de análisis de los mecanismos implicados en la adaptación del APD ante cambios en el HR en células individuales de aurícula humana, así como en fibras auriculares cardiacas. Además, se ha establecido una relación entre la velocidad de adaptación del APD y el riesgo proarrítmico. Es por ello que, aunque los resultados cuantitativos dependen en cierta medida del modelo y de las condiciones de simulación, los resultados cualitativos descritos en este trabajo deben ser tenidos en consideración en futuros estudios.

## 5. CONCLUSIONES

A modo de resumen de todos los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo puede concluirse que:

- La memoria cardiaca en miocitos auriculares, esto es, la adaptación de la duración del potencial de acción, APD, ante cambios súbitos mantenidos en el ritmo cardiaco, tarda varios minutos en completarse y tiene dos fases bien diferenciadas: una primera fase rápida de unos segundos de duración (constante de tiempo  $\tau_{fast}$  entre 6 y 8 s en condiciones control) seguida de otra lenta que dura varios minutos (constante de tiempo  $\tau_{slow}$  entre 4 y 7 minutos en condiciones control).
- Los mecanismos iónicos subyacentes a ambas fases de la adaptación del APD son diferentes. En la fase rápida, las conductancias máximas del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  y de la corriente  $I_{CaL}$  son las responsables del abrupto cambio del valor de APD en los primeros segundos tras una aceleración o deceleración de HR. Respecto a la fase lenta, la dinámica intracelular de sodio,  $[Na^+]_i$ , es la encargada de la acomodación lenta del APD. La bomba  $Na^+/K^+$ , que tiene un papel importante sobre la dinámica  $[Na^+]_i$ , resulta, por tanto, clave en la modulación de dicha acomodación.
- Los mecanismos implicados en la memoria cardiaca son independientes del modelo computacional empleado para su análisis, aunque sí que se aprecian ligeras diferencias cuantitativas en los valores de APD,  $\tau_{fast}$  y  $\tau_{slow}$  entre los distintos modelos para las diferentes condiciones fisiológicas y patofisiológicas estudiadas.
- Los mecanismos de adaptación elucidados en cardiomiocitos auriculares humanos son diferentes a los obtenidos en células de ventrículo humano en lo que respecta a la fase rápida de la adaptación del APD. Sin embargo, los mecanismos implicados en la adaptación lenta son consistentes en las células de ambas cavidades cardiacas. Esto se explica porque los mecanismos que tienen una mayor influencia sobre  $\tau_{fast}$  en ventrículo corresponden a las dinámicas de activación de  $I_{CaL}$  y de inactivación de  $I_{Ks}$ , mientras que  $\tau_{slow}$  está principalmente afectado por  $Na^+/K^+$  tanto en aurícula como en ventrículo.
- Una ralentización en el tiempo de adaptación del APD ante cambios en el ritmo cardiaco se asocia con un mayor grado de riesgo arritmico. Condiciones que supongan constantes de tiempo más elevadas, tanto para la fase rápida como para la fase lenta, pueden ser indicativas de una mayor probabilidad de generación de arritmias auriculares cardiacas, tal como indican los valores de los diferentes biomarcadores preclínicos utilizados en este estudio.

## 6. LÍNEAS FUTURAS

Existen varias líneas de investigación que podrían complementar los estudios realizados en este proyecto:

- Extensión de los resultados de caracterización de memoria cardiaca y sus mecanismos subyacentes en células de aurícula a tejidos bidimensionales de aurícula, y, finalmente, a la cavidad completa en tres dimensiones.
  
- Simulación de situaciones patológicas, como la isquemia de miocardio o la insuficiencia cardiaca, determinando su influencia en los mecanismos de adaptación del APD y en la relación con el riesgo arrítmico.
  
- Investigación de los efectos de fármacos antiarrítmicos, modelizando la acción de éstos sobre la aurícula, analizando su eficacia en la prevención de arritmias, y las consecuencias sobre el APD y las fases de la adaptación de éste ante cambios en el HR.

## Referencias

- [1] L. Sörnmo, y P. Laguna, “Bioelectrical signal processing in cardiac and neurological applications”, *Amsterdam: Elsevier (Academic Press)*.2005;cap.6:408-410.
- [2] J. Malmivuo, y R. Plonsey, “Bioelectromagnetism: principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields”. *New York: Oxford University Press*.1995;cap.6. (<http://www.bem.fi/book/>).
- [3] A. Bueno-Orovio, “Mathematical modelling and spectral simulation of genetic diseases in the human heart”. Ph.D. Dissertation, Departamento de Matemáticas, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España. Mayo 2007.
- [4] A. L. Hodgkin, y A. F. Huxley, “A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve”. *J. Physiol.* 1952;117:500-544.
- [5] K. H. W. J. ten Tusscher, “Spiral wave dynamics and ventricular arrhythmias”. Ph.D. Dissertation, Universiteit Utrecht, Nederlands. Noviembre 2004.
- [6] E. Pueyo, P. Smetana, P. Caminal, A. Bayes de Luna, M. Malik, y P. Laguna, “Characterization of QT interval adaptation to RR interval changes and its use as a risk-stratifier of arrhythmic mortality in amiodarone-treated survivors of acute myocardial infarction”. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. Septiembre 2004;51(9):1511-1520.
- [7] A. Shvilkin, P. Danilo, J. Wang, D. Burkhoff, E. P. Anyukhovsky, E. A. Sosunov, M. Hara, y M. R. Rosen, “Evolution and restitution of long-term cardiac memory”. *Circulation*. 1998;97:1810-1817.
- [8] M. R. Franz, C. D. Swerdlow, L. B. Liem, y J. Schaefer, “Cycle length dependence of human action potential duration in vivo. Effects of single extrastimuli, sudden sustained rate acceleration and deceleration, and different steady-state frequencies”. *J. Clin. Invest.* Septiembre 1998;82:972-979.
- [9] M. Hara, A. Shvilkin, M. R. Rosen, P. Danilo Jr., y P. A. Boyden, “Steady-state and nonsteady-state action potentials in fibrillating canine atrium: abnormal rate adaptation and its possible mechanisms”. *Cardiovascular Research*. 1999;42:455-469.
- [10] K. Hoshiyama, M. Hara, K. Yasui, H. Mitamura, F. Ohsuzu, I. Kodama, y S. Ogawa, “Altered action potential dynamics in electrically remodeled canine atria. Evidence for altered intracellular  $Ca^{2+}$  handling”. *Circ. J.* 2006;70:1488-1496.
- [11] M. Courtemanche, R. J. Ramirez, y S. Nattel, “Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model”. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1998;275:301-321.
- [12] A. Nygren, C. Fiset, L. Firek, J. W. Clark, D. S. Lindblad, R. B. Clark, y W. R. Giles, “Mathematical model of an adult human atrial cell: the role of  $K^+$  currents in repolarization”. *Circ. Res.* 1998;82:63-81.
- [13] L. Hove-Madsen, A. Llach, A. Bayes-Genís, S. Roura, E. Rodríguez, A. Arís, y J. Cinca, “Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes”. *Circulation*. 2004;110:1359-1363.
- [14] L. Hove-Madsen, C. Prat-Vidal, A. Llach, F. Ciruela, V. Casadó, C. Lluís, A. Bayes-Genis, J. Cinca, y R. Franco, “Adenosine A2A receptors are expressed in human atrial myocytes and modulate spontaneous sarcoplasmic reticulum calcium release”. *Cardiovascular Research*. 2006;72:292-302.
- [15] C. E. Molina, H. Gesser, A. Llach, L. Tort, y L. Hove-Madsen, “Modulation of membrane potential by an acetylcholine-activated potassium current in trout atrial myocytes”. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;292:R388-R395.

- [16] L. Hove-Madsen, y L. Tort, “L-type  $Ca^{2+}$  current and excitation-contraction coupling in single atrial myocytes from rainbow trout”. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1998;275:2061-2069.
- [17] D. Semwogerere, y E. R. Weeks, “Confocal microscopy”. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Emory University, Atlanta, Georgia, U. S. A.* 2005;1-10.
- [18] N. S. Claxton, T. J. Fellers, y M. W. Davidson, “Laser scanning confocal microscopy”. *Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University, Tallahassee, Florida 32310.* 2006;1-37.
- [19] M. Malboubi, H. Ostadi, S. Wang, Y. Gu, y K. Jiang, “The effect of pipette tip roughness on giga-seal formation”. *World Congress on Engineering 2009 Vol II.*
- [20] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, y F. J. Sigworth, “Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches”. *Pflügers Archiv, European Journal of Physiology.* 1981;391:85-100.
- [21] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, y T. M. Jessell, “Principles of neural science”. 4<sup>a</sup> Ed., *McGraw-Hill.* 2000;152-153.
- [22] D. Noble, “A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potential”. *J. Physiol.* 1962;160:317-352.
- [23] K. H. W. J. Ten Tusscher, D. Noble, P. J. Noble, y A. V. Panfilov, “A model for human ventricular tissue”. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004;286:H1573–H1589.
- [24] K. H. W. J. Ten Tusscher, y A. V. Panfilov, “Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model”. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006;291:H1088–H1100.
- [25] E. Pueyo, Z. Husti, T. Hornyik, I. Baczkó, P. Laguna, A. Varró, y B. Rodríguez, “Mechanisms of ventricular rate adaptation as a predictor of arrhythmic risk”. Submitted to journal, 2009.
- [26] C. H. Luo, y Y. Rudy, “A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes”. *Circ. Res.* 1994;74:1071-1096.
- [27] C. H. Luo, y Y. Rudy, “A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. II. Afterdepolarizations, triggered activity, and potentiation”. *Circ. Res.* 1994;74:1097-1113.
- [28] F. Xie, Z. Qu, A. Garfinkel, y J. N. Weiss, “Electrical refractory period restitution and spiral wave reentry in simulated cardiac tissue”. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002;283:H448–H460.
- [29] E. M. Cherry, y S. J. Evans, “Properties of two human atrial cell models in tissue: restitution, memory, propagation and reentry”. *Journal of Theoretical Biology.* 2008;254:674-690.
- [30] S. M. Narayan, D. Kazi, D. E. Krummen, y W.-J. Rappel, “Repolarization and activation restitution near human pulmonary veins and atrial fibrillation initiation”. *Journal of the American College of Cardiology.* 2008;52(15):1222-1230.
- [31] B.-S. Kim, Y.-H. Kim, G.-S. Hwang, H.-N. Pak, S. C. Lee, W. J. Shim, D. J. Oh, y Y. M. Ro, “Action potential duration restitution kinetics in human atrial fibrillation”. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002;39:1329-1336.
- [32] M. R. Franz, “The electrical restitution curve revisited: steep or flat slope—which is better?”. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2003;14:S140-S147, Suppl. 10.



- [33] L. H. Frame, y M. B. Simson, “Oscillations of conduction, action potential duration, and re-factoriness. A mechanism for spontaneous termination of reentrant tachycardias”. *Circulation*. 1988;78:1277-1287.
- [34] M. Courtemanche, R. J. Ramírez, y S. Nattel, “Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling: insights from a mathematical model”. *Cardiovascular Research*. 1999;42:477-489.
- [35] D. R. Van Wagoner, A. L. Pond, P. M. McCarthy, J. S. Trimmer, y J. M. Nerbonne, “Outward  $K^+$  current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation”. *Circ. Res.* 1997;80:772-781.
- [36] D. R. Van Wagoner, A. L. Pond, M. Lamorgese, S. S. Rossie, P. M. McCarthy, y J. M. Nerbonne, “Atrial L-type  $Ca^{2+}$  currents and human atrial fibrillation”. *Circ. Res.* 1999;85:428-436.
- [37] P. C. Viswanathan, y Y. Rudy, “Pause induced early afterations in the long QT syndrome: a simulation study”. *Cardiovascular Research*. 1999;42:530-542.
- [38] L. M. Hondeghem, L. Carlsson, y G. Duker, “Instability and triangulation of the action potential predict serious proarrhythmia, but action potential duration prolongation is antiarrhythmic”. *Circulation*. 2001;103:2004-2013.
- [39] H. Gelband, H. L. Bush, M. R. Rosen, R. J. Myerburg, y B. F. Hoffman, “Electrophysiologic properties of isolated preparations of human atrial myocardium”. *Circ. Res.* 1972;30:293-300.
- [40] E. Carmeliet, “Intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and rate adaptation of the cardiac action potential”. *Cell Calcium*. 2004;35:557-573.
- [41] T. Watano, Y. Harada, K. Harada, y N. Nishimura, “Effect of  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange inhibitor, KB-R7943 on ouabain-induced arrhythmias in guinea-pigs”. *British Journal of Pharmacology*. 1999;127:1846-1850.
- [42] S. Miyamoto, B.-M. Zhu, K. Kamiya, Y. Nagasawa, y K. Hashimoto, “KB-R7943, a  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange inhibitor, does not suppress ischemia/reperfusion arrhythmias nor digitales arrhythmias in dogs”. *Jpn. J. Pharmacol.* 2002;90:229-235.
- [43] C. Pott, X. Ren, D. X. Tran, M.-J. Yang, S. Henderson, M. C. Jordan, K. P. Roos, A. Garfinkel, K. D. Philipson, y J. I. Goldhaber, “Mechanism of shortened action potential duration in  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger knockout mice”. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007;292:C968-C973.
- [44] G. Klein, F. Schröder, D. Vogler, A. Schaefer, A. Haverich, B. Schieffer, T. Korte, y H. Drexler, “Increased open probability of single cardiac L-type calcium channels in patients with chronic atrial fibrillation: role of phosphatase 2A”. *Cardiovascular Research*. 2003;59:37-45.
- [45] R. F. Bosch, X. Zeng, J. B. Grammer, K. Popovic, C. Mewis, y V. Kühlkamp, “Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atria fibrillation”. *Cardiovascular Research*. 1999;44:121-131.
- [46] R. Laszlo, C. Eick, N. Rueb, S. Weretka, H.-J. Weig, J. Schreieck, y R. F. Bosch, “Inhibition of the renin-angiotensin system: effects on tachycardia induced early electrical remodeling in rabbit atrium”. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2008;9(3):125-132.
- [47] L. Yue, J. Feng, R. Gaspo, G.-R. Li, Z. Wang, y S. Nattel, “Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation”. *Circ. Res.* 1997;81:512-525.
- [48] G. Li, y S. Nattel, “Properties of human atrial I $Ca$  at physiological temperatures and relevance to action potential”. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1997;272:H227-H235.

- [49] E. Carmeliet, “Action potential duration, rate of stimulation, and intracellular sodium”. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2006;17:S2-S7,Suppl. 1.
- [50] J. Wang, R. H. G. Schwinger, K. Frank, J. Müller-Ehmsen, P. Martin-Vasallo, T. A. Pressley, A. Xiang, E. Erdmann, y A. A. McDonough, “Regional expresion of sodium pump subunit isoforms and  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger in the human heart”. *J. Clin. Invest.* 1996;98(7):1650-1658.
- [51] D. M. Bers, W. H. Barry, y S. Despa, “Intracellular  $Na^+$  regulation in cardiac myocytes”. *Cardiovascular Research.* 2003;57:897-912.
- [52] M. R. Boyett, y D. Fedida, “Changes in the electrical activity of dog cardiac Purkinje fibres at high heart rates”. *J. Physiol.* 1984;350:361-391.
- [53] A. J. Drake, M. I. Noble, V. Schouten, A. Seed, H. E. J. Ter Keurs, y B. Wohlfart, “Is action potential duration of the intact dog heart related to contractility or stimulus rate?”. *J. Physiol.* 1982;331:499-510.
- [54] E. M. Cherry, H. M. Hastings, y S. J. Evans, “Dynamics of human atrial cell models: restitution, memory, and intracellular calcium dynamics in single cells”. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 2008;98:24-37.
- [55] E. M. Cherry, H. S. Greenside, y C. S. Henriquez, “A space-time adaptive method for simulating complex cardiac dynamics”. *Physical Review Letters.* 2000;84(6):1343-1346.
- [56] E. M. Cherry, H. S. Greenside, y C. S. Henriquez, “Efficient simulation of three-dimensional anisotropic cardiac tissue using an adaptive mesh refinement method”. *Chaos.* 2003;13(3):853-865.
- [57] A. Nygren, L. J. Leon, y W. R. Giles, “Simulations of the human atrial action potential”. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2001;359:1111-1125.
- [58] B. Trénor, L. Romero, J. M. Ferrero Jr., J. Sáiz, G. Moltó, y J. M. Alonso, “Vulnerability to reentry in a regionally ischemic tissue: a simulation study”. *Annals of Biomedical Engineering.* 2007;35(10):1756-1770.