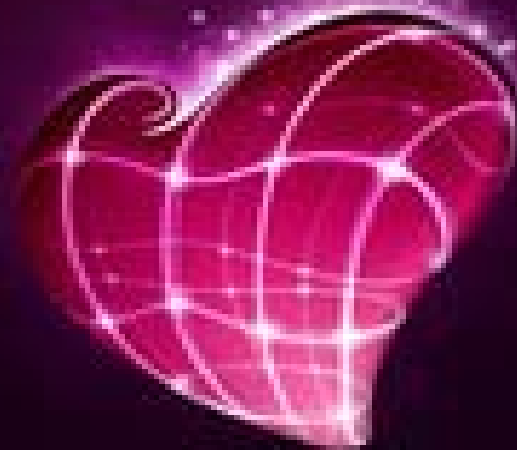


# Homeostasis del calcio en miocitos auriculares humanos: Papel del remodelado de los receptores de adenosina $A_{2A}$ en la fibrilación auricular

Cristina E. Molina



Memoria de la Tesis Doctoral presentada por Cristina Espinosa Molina para optar al Grado de Doctor en Biología Celular por la Universitat Autònoma de Barcelona

Director: Dr. Leif Hove-Madsen  
Barcelona, Diciembre de 2009

El Director de Tesis, el **Dr. Leif Hove Madsen**, certifica que:

La memoria titulada "Homeostasis del calcio en miocitos auriculares humanos: Papel del remodelado de los receptores de adenosina A2A en la fibrilación auricular" presentada por Cristina Espinosa Molina, para optar al Grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección y considerándola finalizada, autorizan su presentación.

Para que así conste, firma este certificado

Dr. Leif Hove-Madsen  
Director del Laboratorio de Fisiología Celular  
ICCC, Hospital de la Santa Creu y Sant Pau



## AGRADECIMIENTOS

A todo el Servicio de Cirugía Cardíaca, por su acogida, su predisposición y su ayuda. Me proporcionaron las muestras de tejido y por tanto, son los pilares de este estudio. Espero que cada vez que oigáis un taconeo os acordéis de mí.

A mi buena amiga Anna Llach, con un gusto exquisito en lámparas, que cargó con la ardua tarea de enseñarme todo lo que sé acerca de las técnicas experimentales utilizadas en esta Tesis.

A los autores que me han precedido y que he tomado como referencia, sin cuyo esfuerzo y dedicación no hubiera sido posible.

Especial agradecimiento al Dr. Leif Hove-Madsen, Director de esta Tesis, cuyo rigor científico, capacidad y paciencia (“estás segura de esto...”) me han empujado a superarme con cada paso en mi trabajo.

Al Dr. Juan María Cinca Cuscollola, por su permanente interés en la investigación y sus experimentadas opiniones desde un punto de vista médico y científico, algunas veces no es fácil hermanar las dos cosas.

Al ICCC, por abrirnos las puertas de sus instalaciones y cobijarnos. En particular, quiero mostrar mi agradecimiento a la directora del centro, la Dra. Lina Badimon, por procurar una tamaño infraestructura para la investigación en el campo de la Cardiología.

Al personal del Institut de Recerca y especialmente a “mis niñas”: suerte que he podido contar con vosotras porque ya sabéis que la burocracia no es lo mío.

A todos los demás miembros del Laboratorio de Fisiología Celular (Santi, Cris, Jordi, Carol, Jose, Jackie y Toni), con los que he compartido los años de mi trabajo en el Hospital de San Pau; juntos hemos crecido en conocimientos, compartido risas y experiencias.

También tengo mucho que agradecer al *Laboratoire de Signalisation et Physiopathologie Cardiaque*, y digo el laboratorio por no mencionar a todos, que son muchos, los que me han ayudado y apoyado este último año de mi Tesis, incluyendo, por supuesto, a su director el Dr. Rodolphe Fischmeister (quiero comprarme un coche, pero me cuesta encontrar uno rosa...).

A mi Paulita, que siempre me ha apoyado; no te hagas ilusiones porque aún tendrás que enseñarme y ayudarme en muchas cosas... igual que tú, Carlos!

Y por supuesto a mi MAMÁ, creo que el mérito de este trabajo es tan tuyo como mío, así que felicidades!!

## ÍNDICE

I. RESUMEN.....	5
II. ABREVIATURAS .....	13
III. INTRODUCCIÓN .....	17
1. La contracción cardíaca .....	20
1.1. Activación de la contracción .....	22
1.2. Relajación de la contracción .....	25
2. La excitación eléctrica .....	26
2.1. Gradientes iónicos .....	26
2.2. Potencial de acción .....	28
3. Homeostasis del calcio intracelular. Mecanismos reguladores del calcio 31	
3.1. Regulación del calcio por la corriente de calcio ( $I_{Ca}$ ).....	34
3.1.1. Los canales de calcio de la membrana plasmática.....	34
3.1.2. Caracterización de la $I_{Ca}$ .....	37
3.2. Regulación del calcio por la corriente de $I_{NCX}$ .....	41
3.3. Regulación del calcio por la bomba de calcio del SR .....	43
3.4. Regulación del calcio por el canal de calcio del SR (el receptor de rianodina).....	46
4. Modulación neurohormonal .....	50
4.1. Los receptores adrenérgicos .....	52
4.2. Los receptores muscarínico colinérgicos .....	56
4.3. Los receptores serotoninérgicos .....	57
4.4. Los receptores purinérgicos .....	58
4.5. Regulación neurohormonal del calcio intracelular en cardiomiocitos 63	
5. Arritmogénesis auricular y regulación del calcio intracelular.....	65
5.1. Mecanismos de arritmogénesis.....	66
5.1.1. Automaticidad anormal.....	66
5.1.2. Actividad repetitiva .....	67
5.1.3. Mecanismos de reentrada.....	69
5.2. Alternancia electro-mecánica.....	70
IV. OBJETIVOS .....	73
V. MATERIAL Y MÉTODOS .....	77
1. Caracterización clínica/ Obtención de tejido auricular humano .....	79

2. Electroforesis en gel e inmunoblotting.....	79
3. Extracción de RNA y cuantificación por PCR a tiempo real .....	80
4. Aislamiento de cardiomiocitos.....	81
5. Técnica de patch-clamp .....	82
5.1. Descripción de la técnica .....	82
5.2. Protocolos electrofisiológicos .....	84
6. Microscopía confocal.....	87
7. Análisis de datos y estadística.....	89
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>91</b>
<b>1. La regulación anormal del calcio intracelular en la FA se asocia a la sobre-regulación de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub>.....</b>	<b>93</b>
1.1. Introducción .....	93
1.2. Métodos.....	94
1.2.1. Muestras de tejido auricular humano .....	94
1.2.2. Electroforesis en gel e inmunoblotting .....	94
1.2.3. Extracción de RNA y cuantificación por PCR a tiempo real.....	94
1.2.4. Medición de las liberaciones espontáneas de calcio y de las corrientes iónicas en miocitos aislados .....	95
1.2.5. Análisis de datos y estadística .....	95
1.3. Resultados.....	95
1.3.1. Incremento de la expresión de los A <sub>2A</sub> R en pacientes con FA .....	95
1.3.2. Efecto de la activación de los A <sub>2A</sub> R en la liberación espontánea de calcio.....	97
1.3.3. La activación de los A <sub>2A</sub> R incrementa la fosforilación del receptor de rianodina en aurículas fibriladas .....	100
1.3.5. Efecto de la inhibición de los A <sub>2A</sub> R sobre la dinámica del calcio del SR.....	101
1.3.6. La adenosina endógena modula la dinámica del calcio del SR a través de la activación de los A <sub>2A</sub> R .....	103
1.4. Discusión .....	106
1.4.1. Remodelado de los A <sub>2A</sub> R en fibrilación auricular .....	106
1.4.2. El remodelado de los A <sub>2A</sub> R está relacionado con la anormal dinámica anormal del calcio.....	106
1.4.3. Implicaciones clínicas.....	108

1.4.4. Consideraciones del modelo.....	108
<b>2. Regulación de la respuesta del calcio latido-latido por el calcio en miocitos auriculares humanos .....</b>	<b>111</b>
2.1. Introducción .....	111
2.2. Métodos.....	112
2.2.1. Miocitos auriculares humano.....	112
2.2.2. Imágenes de calcio por confocal .....	112
2.2.3. Técnica de patch-clamp.....	113
2.2.4. Análisis de datos y estadística .....	113
2.3. Resultados.....	113
2.3.1. Dinámica del calcio intracelular latido-latido en miocitos auriculares humanos .....	113
2.3.2. Efecto de la frecuencia de estimulación sobre la respuesta latido-latido en miocitos auriculares humanos.....	114
2.3.3. Efecto de la frecuencia de estimulación sobre la dinámica del calcio subcelular en miocitos auriculares humanos .....	117
2.4. Discusión .....	124
2.4.1. Origen de la alternancia latido-latido en miocitos auriculares humanos .....	124
2.4.2. Dependencia de la respuesta latido-latido del calcio.....	125
2.4.3. Implicaciones clínicas.....	126
<b>3. Los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> regulan la respuesta latido-latido a frecuencias crecientes en miocitos auriculares humanos .....</b>	<b>129</b>
3.1. Introducción .....	129
3.2. Métodos.....	130
3.2.1. Miocitos auriculares humano.....	130
3.2.2. Visualización del calcio intracelular por microscopía confocal..	131
3.2.3. Técnica de patch-clamp.....	131
3.2.4. Análisis de datos y estadística .....	132
3.3. Resultados.....	132
3.3.1. Modulación de la respuesta del calcio latido-latido por la proteína quinasa A.....	132
3.3.2. Modulación de la respuesta del calcio latido-latido por los A <sub>2A</sub> R <sup>137</sup>	



3.3.3. Efecto de la activación de los A <sub>2A</sub> R sobre la estabilidad de la dinámica del calcio intracelular en miocitos de pacientes con y sin FA .....	141
3.3.4. La inhibición de los A <sub>2A</sub> R estabiliza la respuesta del calcio latido-latido .....	143
3.4. Discusión .....	144
3.4.1. Papel de la PKA en la regulación de la estabilidad de la dinámica del calcio .....	145
3.4.2. A <sub>2A</sub> R modula la respuesta latido-latido en fibrilación auricular ..	145
3.4.3. Regulación de la respuesta latido-latido en la fibrilación auricular .....	146
3.4.4. Implicaciones clínicas del estudio.....	147
VII. DISCUSIÓN.....	149
VIII. CONCLUSIONES.....	157
IX. BIBLIOGRAFIA .....	161

## I. RESUMEN

---



**Título:** Homeostasis del calcio en miocitos auriculares humanos: Papel del remodelado de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> en la fibrilación auricular.

**Autor:** Cristina Espinosa Molina, bajo la dirección del Dr. Leif Hove-Madsen.

**Resumen:** En personas sanas el ritmo cardíaco viene determinado por la actividad del nodo sinusal, que es la estructura que lo marca, enviando impulsos eléctricos que estimulan la contracción de las aurículas y que luego llega al nódulo auriculoventricular de donde se propaga por las ramas derecha e izquierda del haz de His, para incidir la contracción ventricular. Si el sistema de conducción presenta anomalías, o si la contracción se origina por un estímulo en otra zona (foco ectópico), se generan las arritmias. El tipo más grave de arritmia es la fibrilación, que se produce cuando las fibras musculares cardíacas individuales se contraen de forma caótica y asíncrona, lo cual impide la contracción coordinada de las cámaras cardíacas. La fibrilación auricular (FA) es la arritmia cardíaca más frecuente. La FA afecta al 0.4% de la población general y su prevalencia aumenta con la edad, siendo afectados por esta arritmia el 4-5% de las personas mayores de 65 años y el 10% de los mayores de 75 años. Esta arritmia predispone a la trombosis y está asociada con fenómenos embólicos (la embolia periférica puede presentarse en un 22% de los pacientes con FA crónica y constituye el primer factor de riesgo del accidente cerebrovascular), desarrollo de insuficiencia cardíaca y deterioro de la función ventricular. Si da lugar a una respuesta ventricular rápida puede disminuir el volumen sanguíneo bombeado, con cuadros de hipotensión, pudiendo desembocar en insuficiencia cardíaca y edema agudo de pulmón. La misma FA genera modificaciones fisiológicas y anatómicas que favorecen su persistencia: dilatación auricular, fibrosis miofibrilar, acortamiento de los períodos refractarios auriculares y de la velocidad de conducción. Además, su presencia degrada la calidad de vida del paciente y provoca un aumento sostenido en los gastos públicos de salud. Por el momento, el tratamiento para la FA pasa por el uso de antiarrítmicos que la revierten a ritmo sinusal y por procedimientos ablativos que conllevan mucho riesgos y complicaciones: taponamiento cardíaco, estenosis de las venas pulmonares, fístulas atrio-esofágicas, trombo-embolismos, arritmias y además van igualmente acompañados de tratamientos farmacológicos antiarrítmicos. Pero estos fármacos pueden tener efectos proarrítmicos a largo plazo y la FA se vuelve a manifestar en un número elevado de pacientes. Por ello, el objetivo principal de esta tesis doctoral es una mejora del conocimiento de los mecanismos que conducen a la inducción y perpetuación de la FA. Concretamente, esta tesis se centra en el papel que juegan los cambios patológicos en la regulación del calcio intracelular en miocitos auriculares humanos que contribuyen al desarrollo de la FA.

El papel del calcio en la regulación del ciclo cardíaco es bien conocido y los mecanismos reguladores del calcio se han estudiado ampliamente. Así, la contracción cardíaca se activa cuando el potencial de acción (AP) despolariza la membrana celular y activa la apertura de los canales de calcio tipo-L en los cardiomiocitos, provocando así un incremento de calcio intracelular y la activación de una mayor liberación de calcio del retículo sarcoplasmático. Este fenómeno conocido como “calcium induced calcium release” (CICR), eleva el calcio citosólico a un nivel que activa la contracción celular. Del mismo modo, la relajación se produce con la eliminación de calcio del citosol, principalmente producido por la reacumulación de calcio en el retículo sarcoplasmático (SR) y la expulsión de calcio de los cardiomiocitos por el intercambiador Na-Ca. De hecho, una gran parte de la investigación sobre la homeostasis del calcio en cardiomiocitos, se ha centrado en estudios de la contribución de cada uno de los principales mecanismos reguladores de calcio en la homeostasis del calcio. Estos estudios se han realizado, sobre todo, en miocitos ventriculares aislados de modelos de pequeños roedores y se ha prestado mucha atención al papel de la modulación neuro-hormonal en la regulación del calcio intracelular.

También, se ha estudiado la asociación de los cambios en la regulación del calcio intracelular a patologías prevalentes, como la insuficiencia cardíaca, para elucidar los cambios patológicos en la regulación del calcio que repercuten en la contracción cardíaca. En cambio, se ha prestado menos atención a la asociación de alteraciones patológicas en la homeostasis del calcio con la generación de arritmias cardíacas, y es únicamente en la última década que se ha acumulado información que documenta cómo desajustes en la regulación del calcio intracelular pueden contribuir en la generación de arritmias cardíacas. Nuestro laboratorio ha sido uno de los pioneros en este campo, siendo los primeros en mostrar la asociación de la fibrilación auricular a una mayor liberación espontánea de calcio, en miocitos auriculares aislados de pacientes con esta arritmia. Asimismo, recientemente hemos mostrado que la activación de receptores de adenosina  $A_{2A}$  ( $A_{2A}R$ ) estimula la liberación espontánea de calcio en miocitos auriculares humanos, sugiriendo que el nivel de expresión y/o la actividad de este receptor podrían intervenir en la arritmogénesis auricular y los tres estudios experimentales de esta tesis se basan en estos hallazgos.

A pesar de las dificultades técnicas y metodológicas que conllevan los estudios con cardiomiocitos humanos, toda la investigación realizada en esta tesis doctoral se ha realizado con miocitos auriculares humanos, para facilitar la traslación de los resultados obtenidos. Asimismo, los estudios se han basado en técnicas electrofisiológicas que permiten analizar los mecanismos que regulan el calcio intracelular de forma cuantitativa, como son las técnicas de patch-clamp y la visualización del calcio intracelular por microscopía confocal.

El primero de los tres trabajos de esta tesis parte de los trabajos previos de nuestro grupo, que por un lado, muestran que la activación del  $A_{2A}R$  estimula la liberación espontánea del SR y, por otro lado, muestran que la fibrilación auricular se asocia a un aumento en la liberación espontánea de calcio. Esto, en combinación con la cercana localización del  $A_{2A}R$  y el canal de calcio del SR, sugería que la fibrilación auricular podría estar asociada a una mayor activación de los  $A_{2A}R$ . Para comprobar esta hipótesis de trabajo, se utilizaron las técnicas de PCR a tiempo real, electroforesis en gel e inmunoblotting para investigar la expresión de los  $A_{2A}R$  y las técnicas de patch-clamp y microscopía confocal para indagar en la función de los  $A_{2A}R$  en miocitos auriculares de pacientes con fibrilación auricular.

Los resultados del primer estudio muestran un incremento significativo en la expresión de los  $A_{2A}R$  en los miocitos de pacientes con fibrilación auricular y que estos receptores están implicados en el incremento de la fosforilación de los receptores de rianodina y de las liberaciones espontáneas de calcio. En cambio, exponiendo a las células de estos pacientes con la arritmia a inhibidores de los  $A_{2A}R$  o a adenosina desaminasa (que degrada la adenina exógena), las despolarizaciones espontáneas disminuyen al nivel basal que tienen los miocitos de pacientes sin fibrilación auricular. En conclusión, los  $A_{2A}R$  muestran sobre-expresión y sobre-regulación en los pacientes con fibrilación auricular. La estimulación de los RyR mediada por los  $A_{2A}R$ , promueve el incremento de la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR. Así, la activación de un número elevado de estos receptores, probablemente por adenosina exógena, es el factor que promueve la dinámica anormal en el calcio intracelular en pacientes con fibrilación auricular e inhibiéndolos selectivamente, es posible reducir las liberaciones de calcio espontáneas sin afectar a otros mecanismos implicados en la dinámica del calcio.

Puesto que las irregularidades en las respuestas eléctricas y mecánicas latido-latido son un fenómeno que precede a muchas arritmias cardíacas, entre ellas la fibrilación auricular, y que estos cambios están asociados a cambios en la concentración plasmática de calcio, el segundo estudio de esta tesis pretende esclarecer cómo mecanismos reguladores de la dinámica del calcio intracelular intervienen en la regulación de la naturaleza de la respuesta latido-latido a frecuencias de estimulación crecientes.

Para ello, hemos usado las técnicas de patch-clamp y de microscopía confocal para caracterizar cambios en la dinámica del calcio que se asocian a la inducción de alternancia e irregularidades en la respuesta latido-latido.

Los resultados de este estudio muestran que cuando se incrementa la frecuencia de estimulación las respuestas latido-latido eran heterogéneas en la población de miocitos auriculares humanos estudiados. Sin embargo habían tres patrones de respuesta distintas (uniforme, alternante e irregular), cada una asociada a una dinámica del calcio intracelular

específica. Así, observamos que los miocitos con patrones uniformes tenían una densidad de  $I_{Ca}$  más pequeña que miocitos con patrones alternantes. De acuerdo con ello, inhibición parcial de la  $I_{Ca}$  reducía la incidencia de patrones alternantes, afirmando que una elevada densidad de  $I_{Ca}$  favorece la inducción de una respuesta latido-latido alternante. Además, los miocitos con patrones alternantes e irregulares tenían una mayor incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR que los miocitos con patrones uniformes. Con la inhibición de la liberación de calcio del SR todos los miocitos presentaban patrones uniformes a todas las frecuencias de estimulación utilizadas, lo que demuestra que el patrón de respuesta latido-latido a frecuencias de estimulación elevadas está íntimamente ligado a la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio.

Resumiendo, una mayor amplitud de la  $I_{Ca}$  y de la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR son los factores que determinan la naturaleza y el umbral de frecuencia de la aparición de patrones latido-latido no-uniformes, sugiriendo que el control de la amplitud de la  $I_{Ca}$  y de la liberación de calcio del SR pueden ser dianas para estabilizar la respuesta latido-latido.

Partiendo de los resultados de los dos estudios anteriores, el tercer estudio investiga el papel de la estimulación beta-adrenérgica y de los  $A_{2A}R$  en la regulación de la dinámica del calcio intracelular latido-latido en pacientes con y sin fibrilación auricular. Para ello, usamos las técnicas de patch-clamp y la visualización de calcio por microscopía confocal.

Nuestros resultados muestran que la estimulación de las liberaciones espontáneas de calcio del SR se asocia a la inducción de respuestas latido-latido no uniformes cuando la frecuencia de estimulación se aumenta. Así, tanto la estimulación beta-adrenérgica como la activación de los  $A_{2A}R$  promovieron liberaciones espontáneas y respuestas latido-latido no uniformes. Además, la estimulación o inhibición de los  $A_{2A}R$  tuvo mayor efecto en los miocitos de pacientes con FA y el efecto se pudo revertir inhibiendo la PKA. En cambio, la manipulación farmacológica de la actividad de los  $A_{2A}R$  no afectó a la densidad de la  $I_{Ca}$  ni al contenido de calcio del SR.

Estos resultados muestran que el remodelado de la expresión y la actividad de los  $A_{2A}R$  que ocurre en la FA, altera la liberación de calcio del SR activada por la PKA, que a la vez regula la estabilidad de la respuesta latido-latido a frecuencias de estimulación crecientes en miocitos auriculares humanos, sugiriendo que un control farmacológico de los  $A_{2A}R$  podría contribuir a estabilizar la respuesta latido-latido en miocitos auriculares humanos de pacientes con FA.

En resumen, los resultados del primer estudio muestran que un control de la actividad los  $A_{2A}R$  permite controlar la liberación espontánea de calcio en miocitos auriculares humanos.

Específicamente, la inhibición de los A<sub>2A</sub>R reduce la elevada incidencia de liberación espontánea de calcio en pacientes con FA a niveles observados en miocitos de pacientes sin la FA. El segundo estudio muestra que el manejo de calcio del SR (junto con la I<sub>Ca</sub>) también juega un papel importante en la estabilización de la respuesta latido-latido en miocitos auriculares humanos sometidos a crecientes frecuencias de estimulación. De acuerdo con los hallazgos de estos primeros dos estudios, el tercer estudio muestra que la modulación de la liberación espontánea de calcio mediado por PKA regula la estabilidad de la respuesta latido-latido. Así, la inhibición selectiva de la PKA o del A<sub>2A</sub>R elimina la liberación espontánea de calcio basal y favorece una respuesta uniforme latido-latido, mientras la activación de los A<sub>2A</sub>R aumenta la liberación espontánea de calcio favoreciendo respuestas latido-latido no uniforme.

Conjuntamente, los resultados de esta tesis apuntan al A<sub>2A</sub>R como una nueva diana molecular en el tratamiento de la FA.

### **Palabras clave**

Receptores de adenosina, fibrilación auricular, miocitos auriculares humanos, alternancia electro-mecánica





## II. ABREVIATURAS

---



A <sub>2A</sub> R	receptor de adenosina A <sub>2A</sub>
ADA	adenosina desaminasa
AP	potencial de acción
BSA	albúmina de suero bovino
Bay-K8644	1,4-cihidro-2,6-dimetil-5-nitro-1-[(2-nitrofenil)metil]-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-pyridinecarboxilic acid metil ester
Ca <sup>2+</sup>	ión de calcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	concentración intracelular de calcio, concentración citosólica de calcio
CAF	cafeína
CGS21680	2-[p-(2-carboxietil)feniletilamino]-5'-N-etilcarboxamidoadenosina
CICR	liberación de calcio inducida por calcio
acoplamiento EC	acoplamiento excitación contracción
FA	fibrilación auricular
HCN	canales activados por hiperpolarización
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid
H-89	N-(2-[p-bromocinamino]etil)-5-isoquinolinsulfoamida
I <sub>Ca</sub>	corriente de calcio tipo-L
I <sub>NCX</sub>	corrientes de intercambio de Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup>
I <sub>tail</sub>	corriente de cola NCX
ISO	isoproterenol, agonista β-adrenérgico
Li <sup>+</sup>	ión de litio
Na <sup>+</sup>	ión de sodio
NCX	intercambiador Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup>
NIF	nifedipino
PKA	proteína kinasa A
RS	ritmo sinusal
RyR	receptor de rianodina
SR	retículo sarcoplasmático
tau	constante de tiempo de la inactivación de I <sub>Ca</sub>
TEA	tetraethylammonium
TTX	tetrodotoxina
V <sub>m</sub> = E <sub>m</sub>	potencial de membrana
ZM241385	4-(2-[7-amino-2-)-2-furil(triazoloSR-[1,3,5]triazin-5-ilamino)etil)fenol



### III. INTRODUCCIÓN

---



El ritmo cardíaco viene determinado, normalmente, por la actividad del nodo sinusal, que envía impulsos eléctricos que estimulan la contracción de las aurículas, llegando luego al nódulo auriculoventricular, de donde se propaga por las ramas derecha e izquierda del haz de His, para incidir la contracción ventricular. Si el sistema de conducción presenta anomalías, o si la contracción se origina por un estímulo en otra zona (foco ectópico), se generan las arritmias. La fibrilación auricular (FA) es la arritmia cardíaca más frecuente. Se produce cuando las fibras musculares cardíacas individuales se contraen de forma caótica y asíncrona, La FA afecta al 0.4% de la población general y su prevalencia aumenta con la edad, en las personas mayores de 65 años es del 4-5% y en los mayores de 75 años del 10%. La FA conlleva modificaciones estructurales, moleculares y fisiológicas, algunas de las cuales afectan a la regulación del calcio intracelular. El calcio juega un papel fundamental en el mantenimiento y la regulación de la función cardíaca. Sin este ión, no se produciría el potencial de acción en las células cardíacas, el automatismo cardíaco, el acoplamiento excitación-contracción, ni la contracción cardíaca.

A nivel celular, hay diferentes mecanismos relacionados con la regulación del calcio, que pueden evocar en arritmias cardíacas.

En primer lugar, arritmias se pueden producir por focos ectópicos del miocardio que generan actividad repetitiva inducida por despolarizaciones anormales <sup>1, 2</sup>. Las despolarizaciones anormales se producen cuando el calcio se libera de forma espontánea del retículo sarcoplasmático<sup>3-5</sup> dando lugar a *sparks* o a una onda de calcio que se expande por el citosol de la célula y que se podría extender de célula a célula por el tejido cardíaco. Otro mecanismo arritmogénico que se asociado a alteraciones en la liberación de calcio es el automatismo anormal. Así se ha documentado que un aumento en la frecuencia de *calcium sparks* durante la diástole puede desencadenar automatismo anormal en miocitos auriculares felinos <sup>6</sup>. Finalmente, si la frecuencia de latido de las células marcapasos es demasiado elevada, los mecanismos que regulan la contracción de los cardiomiocitos no son capaces de seguir el ritmo de las células marcapasos, resultando en contracciones alternantes o irregulares que pueden inducir arritmias <sup>7, 8</sup>.

Así como las arritmias están directamente relacionadas con el ritmo y la fuerza de la contracción del músculo cardíaco, la contracción/relajación está directamente relacionada con el aumento/disminución de calcio citosólico. El calcio citosólico proviene del medio extracelular y de los depósitos de calcio intracelulares. Hay diferentes mecanismos que promueven el incremento de la concentración de calcio en el citosol:

- La liberación de calcio al citosol desde estructuras citoplasmáticas capaces de almacenarlo, como el retículo sarcoplasmático <sup>9</sup>.
- La entrada de calcio no activada por voltaje, a través del intercambiador Na-Ca <sup>10</sup>, que es un transportador electrogénico que cuando actúa de forma reversa, expulsa



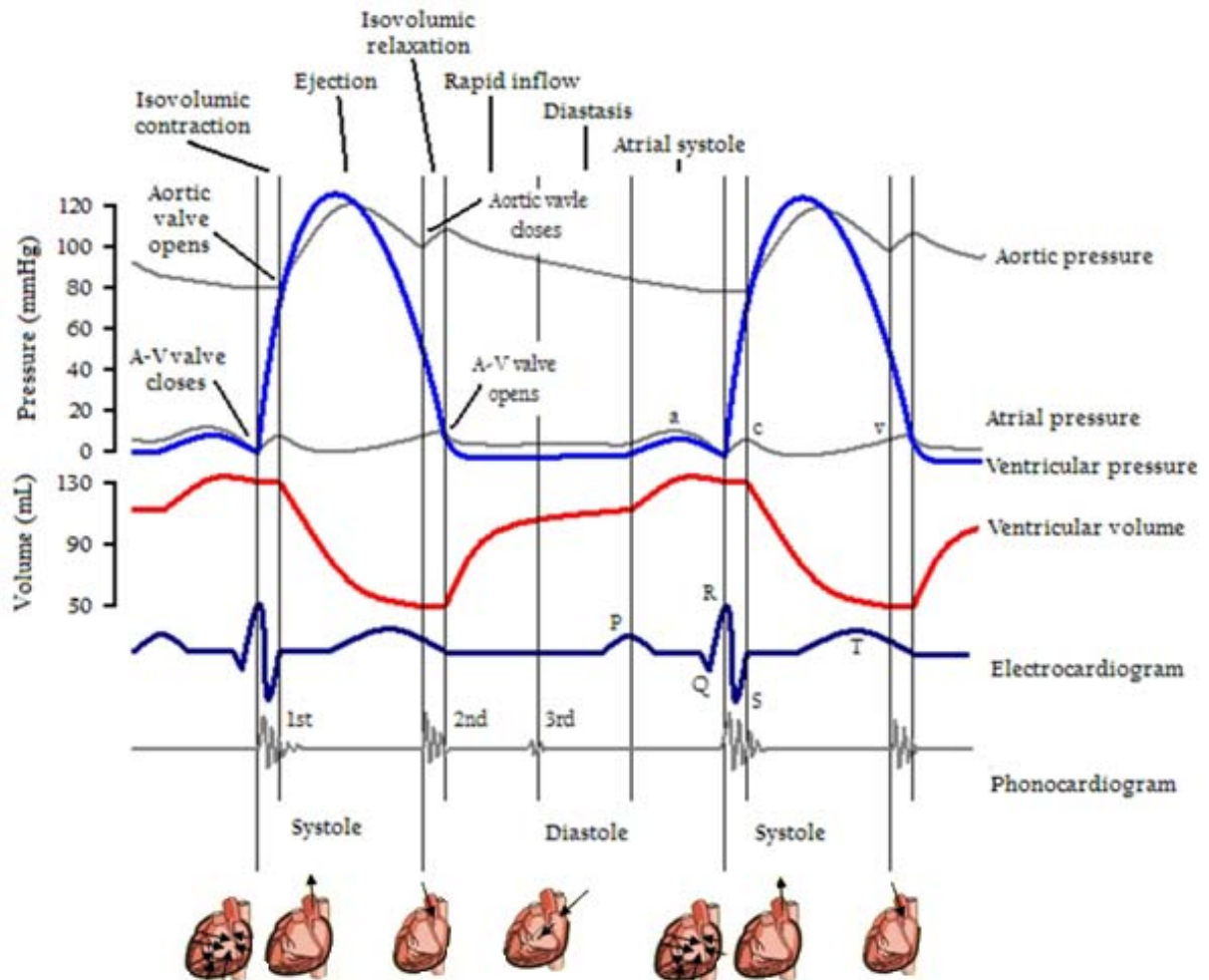
3 iones Na e introduce 1 ión  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol. Esto sucede normalmente cuando una despolarización provoca la entrada masiva de iones  $\text{Na}^+$ .

- La entrada de calcio voltaje-dependiente, a través de canales de calcio<sup>9, 11</sup>. Existen seis tipos (T-L-N-P-Q-R), aunque sólo dos (T y L) están presentes en la musculatura cardíaca. A través de estos canales entra el  $\text{Ca}^{2+}$  que contribuye a la despolarización de la membrana celular durante la segunda fase del potencial de acción (AP). Este es la principal vía de entrada de calcio a la célula.

Esta tesis pretende dilucidar mecanismos relacionados con el funcionamiento del ciclo del calcio que conducen a la inducción y perpetuación de arritmias en la contracción cardíaca. Específicamente, la tesis se centra en el papel que juegan los cambios patológicos en la regulación del calcio intracelular que contribuyen al desarrollo de la fibrilación auricular. Para ello, hemos estudiado los mecanismos que regulan la dinámica del calcio intracelular y su modulación por factores neurohormonales, y particularmente por los  $\text{A}_2\text{AR}$ , en cardiomiocitos aislados de tejido auricular humano de pacientes con y sin fibrilación auricular. A pesar de las dificultades técnicas y metodológicas que conllevan los estudios con cardiomiocitos humanos, toda la investigación realizada en esta tesis doctoral se ha llevado a cabo con miocitos auriculares humanos, para facilitar la traslación de los resultados obtenidos.

## **1. La contracción cardíaca**

El ciclo cardíaco es un proceso rítmico que se divide en dos fases: la sístole (contracción) y la diástole (distensión). Cuando el corazón se distiende durante la diástole, la sangre entra desde el sistema circulatorio. Durante la sístole, el corazón se contrae e impulsa la sangre por un lado, expeliéndola hacia los pulmones con el fin de recoger oxígeno y eliminar dióxido de carbono, y por otro, distribuyéndola por todo el cuerpo transportando oxígeno y nutrientes a los tejidos. Así, un ciclo cardíaco comprende el conjunto de eventos que debe ocurrir desde el comienzo de un latido del corazón hasta el comienzo del siguiente latido (figura 1).



**Figura 1.** Conjunto de sucesos electromecánicos del ciclo cardíaco. Las tres etapas que se suceden desde el comienzo de un latido del corazón hasta el latido siguiente son: sístole (o contracción) auricular, sístole ventricular y diástole (o relajación) cardíaca. El inicio de la sístole auricular (o la despolarización auricular) en el electrocardiograma está marcado por la onda P, que supone la expulsión de sangre de la aurícula al ventrículo y el incremento de la presión auricular (onda a). La onda P del ECG está seguida por el complejo QRS que corresponde a la despolarización de los ventrículos y su subsiguiente repolarización, u onda T. La sístole ventricular provoca pequeñas variaciones en la presión auricular (onda c), y la diástole auricular es lo que provoca la onda v. Los ruidos cardíacos corresponden al cierre y apertura de las válvulas cardíacas para cada latido. La presión ventricular aumenta con el cierre de las válvulas hasta producirse una contracción isovolumétrica (el volumen ventricular no varía) y cuando la presión excede a la presión aórtica se abre la válvula aórtica permitiendo la eyección de la sangre y la disminución de la presión ventricular y aórtica.

Así pues, la regulación del suministro de sangre está determinada por la fuerza de contracción y por el ritmo del corazón.

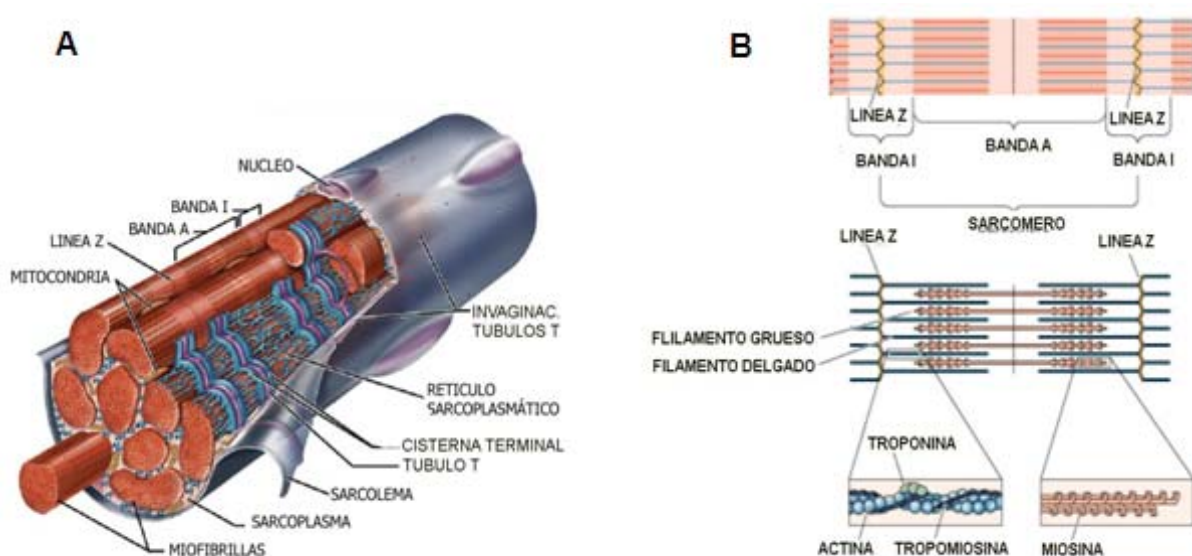
La importancia del papel que juega el calcio en la contractilidad cardíaca fue identificada por primera vez por Sidney Ringer en 1883<sup>12</sup>. Un siglo después, se describió la cinética del calcio durante los ciclos cardíacos. La concentración intracelular de calcio aumenta de

manera cíclica, formando oscilaciones de calcio <sup>13</sup>, con cada latido del corazón. Es bien conocido que el calcio tiene un papel importante en la regulación del ciclo cardíaco y los mecanismos reguladores del calcio han sido ampliamente estudiados. Pero desajustes en la regulación del calcio intracelular pueden contribuir a la promoción de irregularidades del ciclo cardíaco y, por tanto, a la generación de arritmias cardíacas.

Por ejemplo, tanto la frecuencia como la fuerza de contracción cardíacas pueden ser variadas, a través el sistema nervioso y el endocrino, provocando variaciones en la regulación del calcio intracelular. Así, en situaciones de estrés, las glándulas suprarrenales pueden secretar adrenalina y noradrenalina y aumentar el ritmo de latido (actuando sobre HCN y RyR vía AMPc y aumentando la concentración de calcio en el citosol), modificar la fuerza de contracción del corazón y la vasodilatación o la vasoconstricción de los capilares. Y aunque el músculo cardíaco es miogénico, es decir, que el corazón se contrae de manera espontánea a cierta frecuencia gracias a impulsos eléctricos, la variación de la permeabilidad al calcio de las células marcapasos provocada por la activación del sistema nervioso simpático-parasimpático, varía el ritmo de las despolarizaciones.

### **1.1. Activación de la contracción**

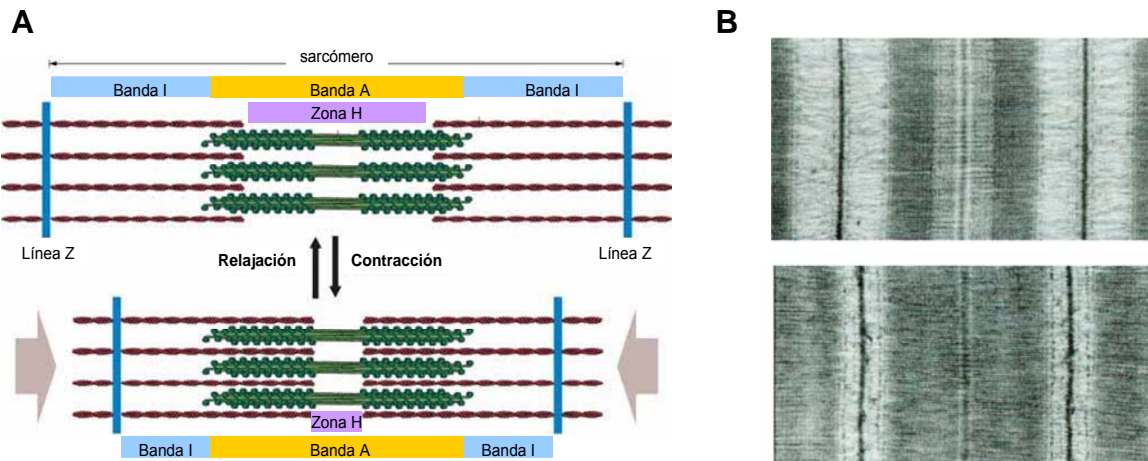
Los músculos están formados por numerosas fibras musculares (figura 2A). Las fibras musculares son células con uno o varios núcleos, delimitadas por el sarcolema o membrana plasmática con miofibrillas, sarcoplasma o citoplasma, túbulos-T (extensiones del sarcolema que pasan transversalmente a través de la fibra muscular y que permiten que el estímulo se transmita de una fibra muscular a otra con rapidez), el SR (depósito de calcio que forma una red longitudinal de túbulos paralelos a las miofibrillas dando vueltas alrededor de ellas) y uniones intercelulares (las *gap junction* están formadas por dos hemicanales o conexonas que se abren dejando paso directo de célula a célula a iones y moléculas de hasta 1000Da). Cada una de las miofibrillas del sarcolema contiene filamentos de miosina y de actina. Es por los filamentos de actina y miosina que el tejido muscular, cardíaco y esquelético, presenta estriaciones (estriaciones formadas por bandas A de miosina alternadas con bandas I de actina unidas por líneas Z) y es también, por estos filamentos, que se produce la contracción muscular.



**Figura 2.** Esquema de las estructuras básicas existentes en una fibra muscular. A) Estructura de una célula muscular. La figura muestra las estructuras básicas presentes en todas las células animales, y las estructuras específicas de las células musculares, como son las miofibrillas y los túbulos-T. B) Diagrama esquemático de la organización del sarcómero de una miofibrilla. Se pueden observar las bandas que contiene un sarcómero, delimitado por las líneas Z. El sarcómero está formado por filamentos de actina (filamentos gruesos) y filamentos de miosina (filamentos delgados).

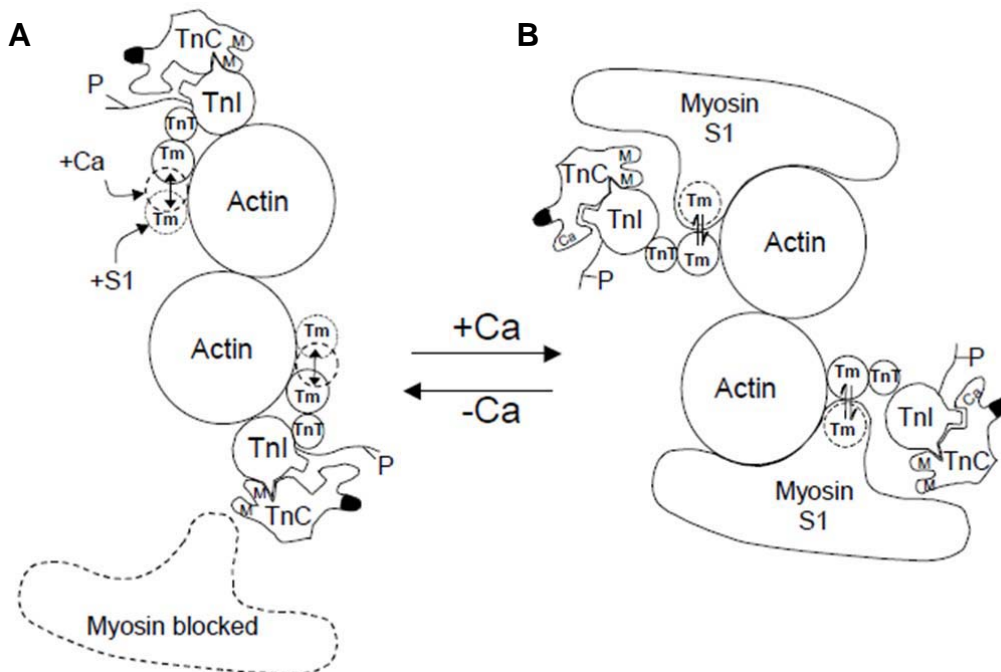
En la figura 2B se representa, de forma esquemática las diferentes estructuras que forman las estriaciones de las miofibrillas. La porción entre dos líneas Z consecutivas se denomina sarcómero y tiene una longitud de aproximadamente 2 micras cuando la fibra está en reposo. Está compuesto por filamentos delgados y filamentos gruesos. Los filamentos delgados están compuestos por actina, una proteína de forma globular que se agrupa formando cadenas de actina, cadenas de tropomiosina (que se enrolla a la cadena de actina) y pequeñas cadenas de troponina (que se unen a intervalos regulares a las cadenas de actina y tropomiosina). Los filamentos gruesos están compuestos por miosina, una molécula cuya forma consta de dos partes: una cola  $\alpha$ -hélice y la cabeza globular de la miosina, en las que se formarán los puentes cruzados.

En reposo, los filamentos de miosina están distendidos debido a la repulsión de las cargas negativas presentes en las extremidades de la cadena polipeptídica que los forman, y los filamentos de actina están separados, dejando una zona clara en el centro de la banda A que se denomina zona H. Cuando la concentración de calcio citosólico aumenta, los iones de calcio se unen a la troponina C y, a través de él, se produce una interacción entre los filamentos de actina y los de miosina. Esta interacción permite que los filamentos de actina se aproximen hasta superponerse, y la longitud del sarcómero disminuye puesto que disminuye la distancia entre las líneas Z (ver figura 3).

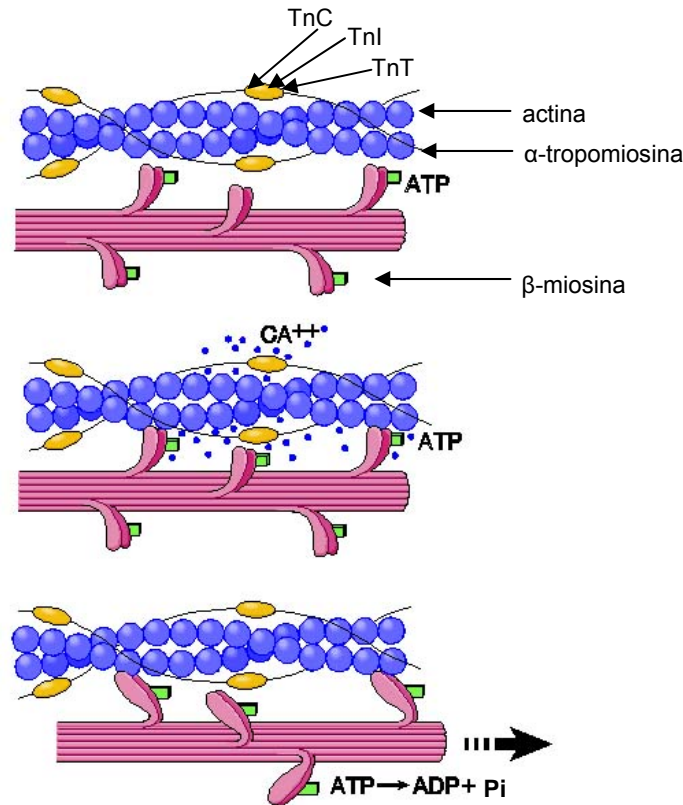


**Figura 3.** Cambio de conformación de los sarcómeros con cada contracción. A) Esquema básico de los cambios en las miofibrillas durante una contracción. B) Corte tangencial de la musculatura en rana sartorius que muestra las miofibrillas durante la relajación (arriba) y la contracción (abajo) <sup>14</sup>.

Mediante el consumo del ATP de las extremidades de la molécula proteica que forma la miosina, que tienen cargas negativas, cambia la conformación de la molécula de miosina con la interacción con el calcio, que tiene cargas positivas (figura 4). El ATP pasa a ADP+Pi, y como las cargas se neutralizan, el puente entre las extremidades de la miosina se reduce y sufre una torsión de 60°, actina y miosina se acercan entre ellas y la miofibrilla se contrae (figura 5).



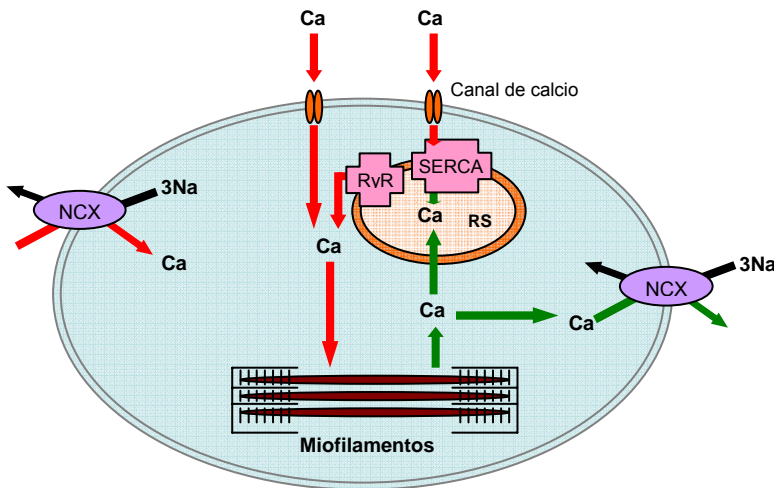
**Figura 4.** Esquema de la interacción actina-miosina dependiente del calcio citosólico.<sup>15</sup> A: Relajado. Sin calcio, la troponina I (TnI) está ligada a actinina, impidiendo la unión actina-miosina y separándolas a través de tropomiosina (Tm). B: Activo. Con la presencia de calcio, TnI se liga más fuertemente a troponina C (TnC) en vez de a actinina, y ahora actinina y miosina interactúan gracias a que Tm se puede mover y la molécula cambia su conformación.



**Figura 5.** Esquema de la unión de las proteínas contráctiles. La figura muestra el filamento delgado (actina) con el complejo formado por  $\alpha$ -tropomiosina y troponina T (TnT), troponina I (TnI) y troponina C (TnC), que inhiben la interacción de la cabeza de la miosina con la actina. El filamento grueso está formado por  $\beta$ -miosina, cuyas cabezas interaccionan con la actina, en el momento en que el  $Ca^{2+}$  se une a la troponina C y libera la inhibición. La cabeza de la miosina sufre un movimiento de flexión ( $60^\circ$ ) que desplaza el filamento grueso.

## 1.2. Relajación de la contracción

La relajación se produce al romperse el enlace entre actina y miosina formado durante la contracción, el ión de calcio se separa quedando libre en el citosol y la conformación de la miosina y el ADP vuelven al estado inicial del reposo. El calcio del citosol se reacumula en el SR a través de la ATPasa de calcio del SR (SERCA) o se extrude del citosol al medio extracelular por el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX)<sup>9</sup>.



**Figura 6.** Esquema del ciclo del calcio en un cardiomiocito. Contracción (rojo): Durante la despolarización el calcio entra a través de los canales de calcio y el NCX, activando los miofilamentos de forma directa o activando una mayor liberación de calcio del SR a través de RyR. Relajación (verde): reproduce a través de la liberación de calcio del citosol por el NCX y reaccumulación de calcio en el RS a través de SERCA.

Así, la concentración de calcio intracelular aumenta y disminuye en una célula de manera cíclica, formando oscilaciones de calcio <sup>16</sup>, contrayendo y relajando la célula.

## 2. La excitación eléctrica

El fenómeno del acoplamiento Excitación-Contracción (EC) es la secuencia de eventos que ocurren en las fibras musculares desde la generación del AP <sup>17</sup>. Esta secuencia implica la despolarización de la membrana plasmática, la detección de la despolarización por parte de los canales de calcio tipo-L y su apertura, la activación de los RyR debida a la entrada de calcio, produciendo la liberación de calcio del SR, provocando un incremento en la concentración de calcio citoplasmático que activa el aparato contráctil, la recaptura del calcio por el SR y la expulsión del calcio restante al medio extracelular <sup>18-20</sup>, devolviendo el calcio citosólico al nivel diastólico y produciendo así la relajación celular

### 2.1. Gradientes iónicos

Los gradientes iónicos mantenidos a través de la membrana celular crean un potencial eléctrico transmembrana ( $E_m = V_m$ ). En el interior de la célula hay más cargas negativas que positivas debido a las proteínas con cargas negativas y al transporte activo de algunos canales<sup>21</sup>, de manera que este gradiente iónico se mantiene mientras la célula está en reposo. En condiciones de equilibrio, el potencial de reposo de la membrana celular se acerca al potencial de equilibrio de Nernst para el potasio. La ecuación de Nernst describe el potencial electroquímico para una membrana permeable a un solo ión:

$$V \text{ (mV)} = \pm((R \cdot T)/(z \cdot F)) \log C_i / C_e = \pm 61.4 \log C_i / C_e$$

donde C= concentración del ión

R= cte universal de los gases

T= temperatura absoluta

Z= carga del ión

F= cte de Faraday

Esta ecuación sirve para calcular la diferencia del potencial a ambos lados de la membrana celular (o lo que es lo mismo, la concentración de los diferentes iones, positivos y negativos, y la permeabilidad de la membrana a los mismos) cuando el sistema está en equilibrio. La membrana celular es preferiblemente permeable a los iones de  $K^+$ , debido a una clase de canales de este ión denominados *inwardly rectifying K-channels* ( $I_{K_{Ach}}$ ,  $I_{K1}$ , etc), y a las ATPasas  $Na^+ / K^+$ . Los iones de  $K^+$  se difunden a través de la membrana de manera que la concentración de iones positivos y negativos en el citoplasma respecto al medio extracelular se mantienen en equilibrio eléctrico. Aunque se acumulen más cargas eléctricas positivas o negativas a un lado de la membrana que al otro, el resultado son soluciones eléctricamente neutras. Pero esto supone que las cargas en exceso, positivas o negativas, se acumulan cerca de la membrana, a un lado y al otro, generando un campo eléctrico o una diferencia de potencial. Por ejemplo, en una célula del sistema nervioso que esté en estado de reposo, el medio extracelular tiene una concentración de iones de  $K^+$  de 0.005mol/L, mientras que el medio intracelular tiene una concentración de 0.141mol/L, así que para que ambas concentraciones estén en equilibrio tiene que existir un potencial de membrana en reposo o potencial de equilibrio de Nernst de -89.2 mV.

$$V = \pm(61.4\text{mV}) \log 0.141/0.005 = -89.2\text{mV}$$

Pero el  $K^+$  no es el único ión en movimiento a través de la membrana celular. Durante el AP la permeabilidad de la membrana varía para diferentes iones. De hecho, en la despolarización e hiperpolarización de los cardiomiocitos existen un gran número de canales y bombas iónicos que intervienen en el flujo iónico a través de la membrana, desencadenando un potencial de acción. Cuando la célula se despolariza, los canales de sodio se abren y este ión entra intentando equilibrar el gradiente iónico, que ahora tiende a ser positivo. Sin embargo, debido a la elevada concentración de iones de potasio en el interior de la célula, este ión sale, frenando la tendencia del gradiente iónico a positivizarse. Así que cuando la célula se despolariza, la membrana celular es permeable a múltiples iones y el potencial de membrana viene determinado por las concentraciones intra y extracelulares de cada ión y su permeabilidad. El potencial de Nernst se podría calcular también para el Na (+70 mV), el Ca (+125 mV) o el Cl (-55 mV), en una célula en reposo.



Pero la ecuación de Nernst solamente permite predecir el potencial de membrana en un sistema hipotético simple de un solo ión. La ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz se utiliza para calcular el potencial de la membrana en el interior de la célula cuando participan varios iones:

$$V \text{ (mV)} = \pm 61.4 \log \left( \frac{\sum^+ P_x [X]_e + \sum^- P_Y [Y]_i}{\sum^- P_Y [Y]_e + \sum^+ P_x [X]_i} \right)$$

donde P= permeabilidad de la membrana al ión

X= cargas positivas

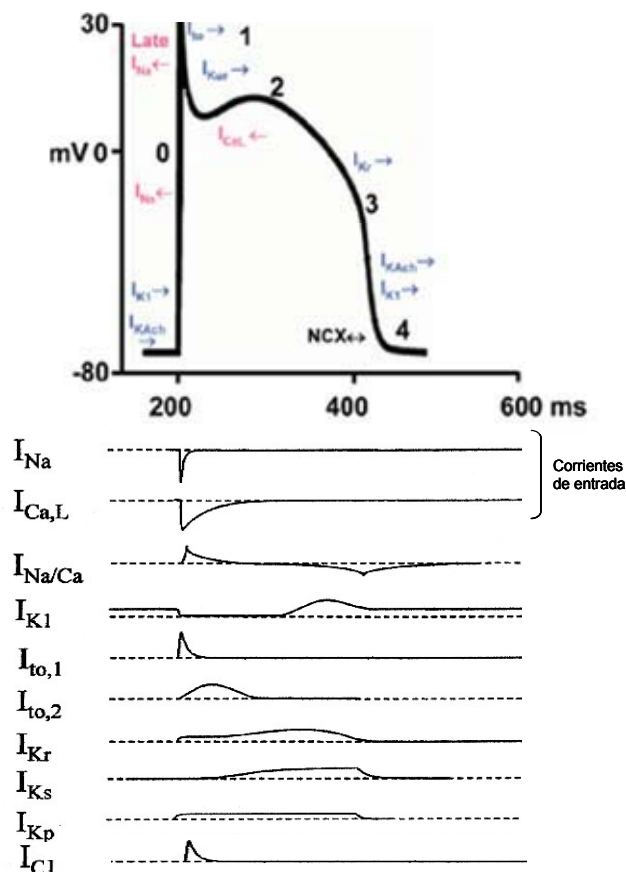
Y= cargas negativas

El potencial de membrana en reposo teórico calculado con la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz para los iones de  $K^+$ , coincide con las mediciones realizadas en células vivas en reposo, lo que quiere decir que este ión está en equilibrio, por supuesto, gracias a la acción de bombas y canales de potasio. Esto confirma que estos canales son los principales reguladores del  $V_m$  en reposo.

## 2.2. Potencial de acción

Cuando el potencial de membrana se despolariza, sobrepasando el umbral de despolarización ( $\approx -50\text{mV}$ , según el tipo de célula y del estado de los canales de  $Na^+$ ), la célula genera un potencial de acción (AP). En este momento el canal de sodio juega un papel clave<sup>22, 23</sup>. Cada canal de sodio está compuesto por cuatro subdominios compuestos, a su vez, por seis segmentos transmembranales cada uno de ellos. Es un canal voltaje-dependiente con un potencial de equilibrio del sodio ( $+70\text{mV}$ ), que permite la difusión del sodio a favor del gradiente de concentración. Cuando se abre, debido a una depolarización de la membrana, el potencial de membrana se hace positivo. La fase 0 o despolarización del AP (figura 7) se inicia cuando el canal de sodio se abre, haciendo que la permeabilidad del  $Na^+$  supere ampliamente a la del  $K^+$ , y el potencial de membrana va hacia  $E_{Na}$ <sup>24</sup>. Entonces los canales de potasio dependientes de voltaje (existen tres clases de canales de potasio: mecanosensibles, ligando-Ca dependientes y voltaje-dependientes), que implican las corrientes  $I_{to}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kp}$  se abren (fase 1 o repolarización inicial, figura 7). Debido a la despolarización y a la rápida entrada de iones sodio (los canales de sodio se encuentran ahora inactivados), se abren los canales de cloro (el potencial de equilibrio del cloro es muy cercano al potencial de reposo, así que cuando estos canales se abren el potencial de membrana sufre cambios muy pequeños, pero a través de él entrarían cargas negativas y por tanto, atenuaría su efecto sobre la despolarización, estabilizando el voltaje de la célula) y se activan las corrientes de calcio tipo-L ( $I_{Ca}$ ) y el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  ( $I_{NCX}$ )<sup>25-27</sup> (aún

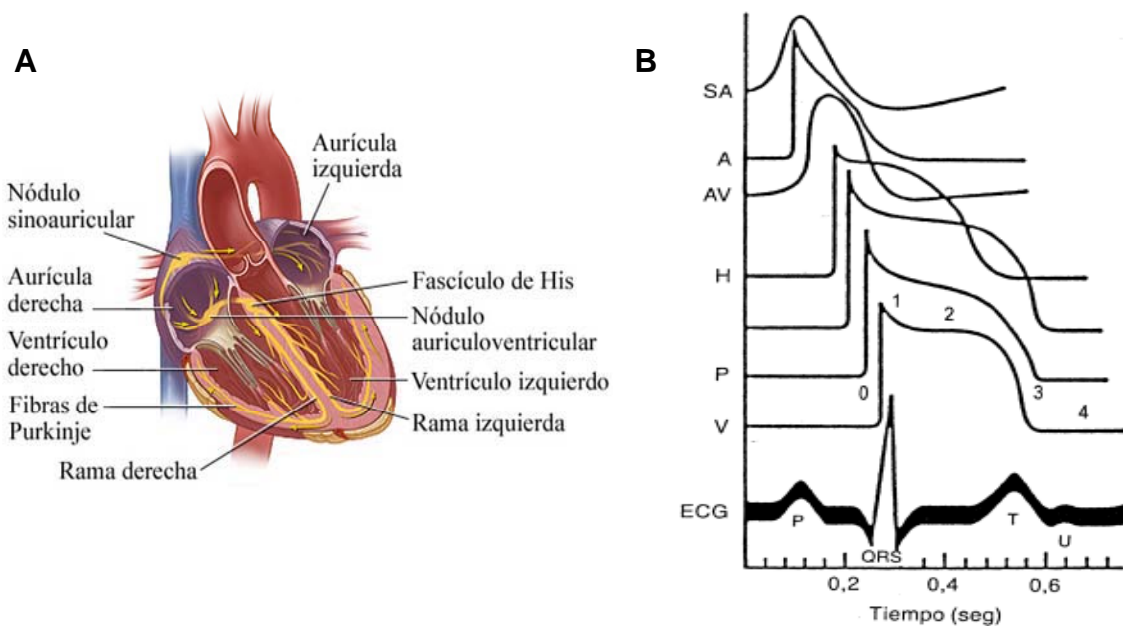
entra sodio en la célula por los canales de sodio de inactivación lenta). Esto provoca una meseta en el AP (fase 2 del AP, figura 7). El de  $Ca^{2+}$  se inactiva. Como consecuencia de esto y que ahora la corriente salida de iones de  $K^+$  es grande ( $I_{K1}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kp}$ ) intentando compensar el flujo que había de iones de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , el potencial de membrana muestra en el AP una fase descendente o de terminación de la repolarización (fase 3). Debido a que los canales de potasio abiertos (la bomba  $Na^+/K^+$  y los canales dependientes de voltaje) y los de sodio cerrados, la permeabilidad al potasio es ahora mucho mayor que antes del inicio de la fase ascendente, cuando sólo las bombas  $Na^+/K^+$  transportaban estos iones. La bomba  $Na^+/K^+$  extrae de la célula de forma activa 3 iones  $Na^+$  e introducen 2 iones  $K^+$ , mediante el consumo de ATP. A través de la bomba de  $Na^+/K^+$  se crea un gradiente de estos iones, manteniendo la concentración de sodio extracelular a un nivel más elevado que la intracelular, generando así el gradiente iónico. La salida de iones  $K^+$  ha sido tan grande que activó fuertemente la bomba  $Na^+/K^+$ , de manera que aunque ahora los canales de potasio están cerrados, la bomba  $Na^+/K^+$  sigue funcionando. Es entonces que el potencial de membrana se acerca a  $E_K$  más de lo que estaba en reposo. El umbral de despolarización aumenta y la célula está en período refractario (debido a la inactivación de los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ ). Los *inwardly rectifying K-channels* se cierran debido a la hiperpolarización, y la célula regresa a su potencial de reposo.



**Figura 7.** Esquema de las fases del AP ventricular y de las corrientes asociadas a la despolarización y repolarización.

Así, cada ciclo del AP cardiaco puede dividirse en: fase 0 o de despolarización, fase 1 o de repolarización inicial, fase 2 o de meseta, fase 3 o de terminación de la repolarización y fase 4 o de reposo.

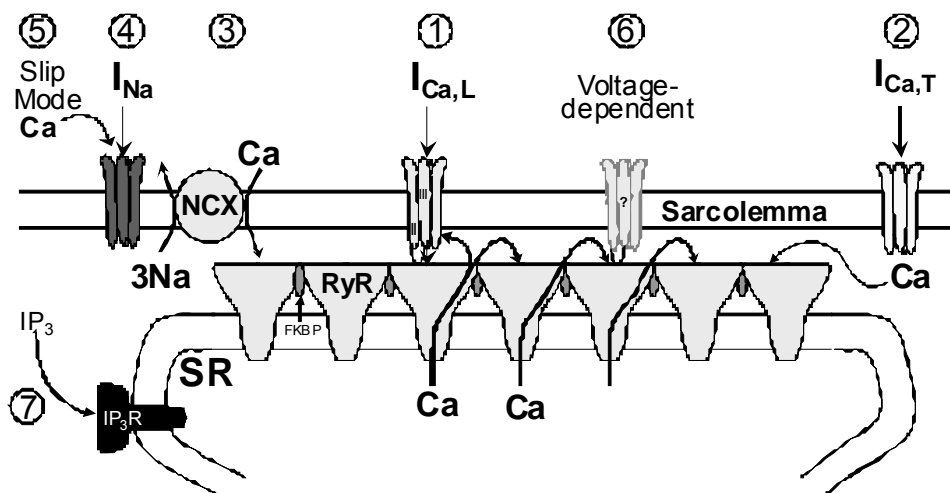
Aunque, como se puede observar en la figura 8, los potenciales de acción son diferentes en las diferentes regiones del corazón. La figura muestra que la onda P del electrocardiograma corresponde a la actividad auricular y que el complejo QRS (fase 0 del AP ventricular), el segmento S-T (fase 2 del AP ventricular) y la onda T (fase 3 del AP ventricular) corresponden a la actividad ventricular. El impulso eléctrico inicial, normal para cada latido, empieza en el nodo sinusal (SA, en la pared superior de la aurícula derecha), con la despolarización de las células marcapasos<sup>28-30</sup>, responsables de generar el potencial de acción<sup>31</sup>. El impulso eléctrico se propaga del nodo SA al músculo auricular y al nodo auriculoventricular (AV, en la parte inferior de la aurícula derecha). El AP del nodo AV se parece al del nodo SA. El nodo AV transmite el estímulo al Haz de His y hasta las fibras de Purkinje. En las células auriculares y ventriculares el potencial de reposo se sitúa alrededor de los -80mV, y después se observa un incremento muy rápido hasta los +30 o +50 mV debido a las corrientes de sodio. La repolarización es más rápida en la aurícula que en el ventrículo, debido a que las corrientes de potasio son mayores en la aurícula y en el ventrículo predominan las corrientes que prolongan la meseta del AP.



**Figura 8.** Potenciales de acción y las estructuras cardíacas por las que se transmite. La figura A representa un esquema del sistema de conducción eléctrica del corazón, mostrando las diferentes estructuras del corazón por las que se transmite el potencial de acción. La figura B es un perfil de los diferentes potenciales de acción representativos de cada una de las siguientes estructuras del corazón en el espacio tiempo correspondiente y en concordancia entre sí y con el ECG: nodo sinusal (SA), aurícula (A), nodo AV (AV), haz de His (H), fibras de Purkinje (P), ventrículo (V) y lo que correspondería a cada una de las fases del AP en V.

### 3. Homeostasis del calcio intracelular. Mecanismos reguladores del calcio

Un AP desemboca en una contracción debido a un proceso conocido como acoplamiento Excitación-Contracción, donde la señal eléctrica (el AP) activa la entrada de calcio y un fenómeno subsiguiente que se conoce como “calcium induced calcium release” (CICR), es decir, la liberación de calcio inducida por calcio <sup>23, 32, 33</sup>. Durante la despolarización entra calcio gracias a la apertura de los canales de calcio tipo-L dependientes del voltaje <sup>34</sup>. Esto provoca el incremento de calcio intracelular activando la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (SR) <sup>9, 25</sup> a través de canales de calcio del SR, los RyRs <sup>35</sup>. De hecho, existe una relación directa entre la fuerza de la contracción <sup>36, 37</sup>, el calcio liberado por el SR y la amplitud y la cinética de la corriente de calcio vía los canales de calcio tipo-L de la membrana <sup>38</sup>.



**Figura 9.** Mecanismos que participan en el acoplamiento EC en el músculo cardíaco. <sup>15</sup> Se observan 7 diferentes mecanismos que contribuyen en este proceso:

- Mecanismos principales:

- 1- Corriente de calcio tipo-L.
- 6- Liberación de calcio del SR activada por la corriente de calcio tipo-L (CICR).

- Mecanismos secundarios:

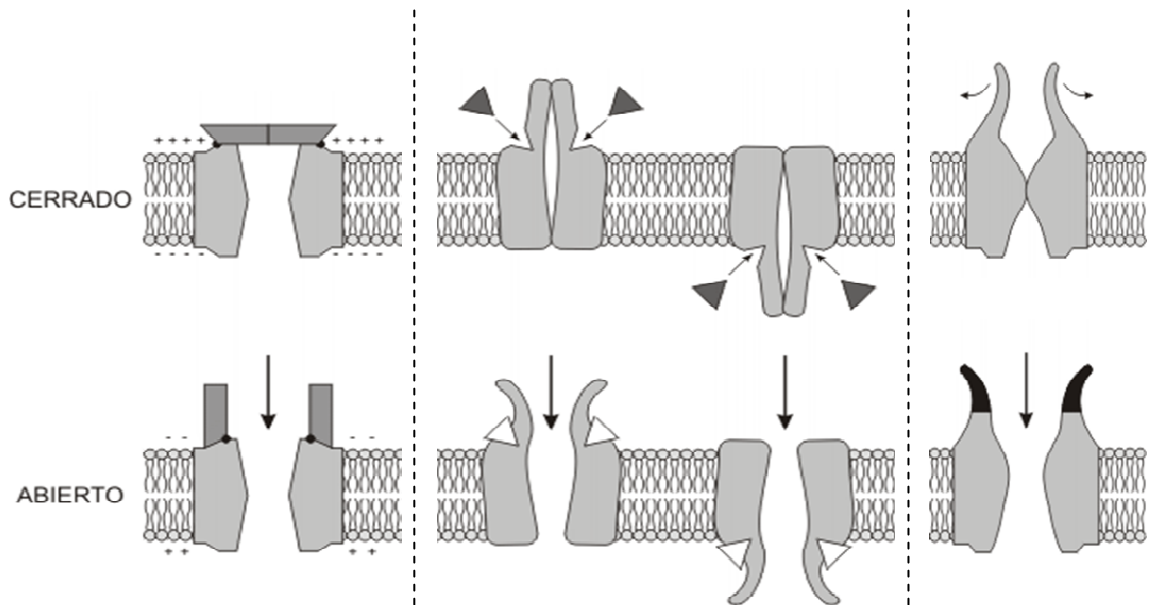
- 2- Corriente de calcio tipo-T.
- 3- Entrada de calcio vía intercambiador Na/Ca dependiente del potencial de membrana.
- 4- Entrada de calcio vía intercambiador Na/Ca activada por la elevada concentración intracelular de sodio, debida a la corriente de entrada de sodio por el canal de sodio.
- 5- Entrada de calcio por el canal de sodio con la selectividad alterada debida a la activación por PKA, permitiendo la entrada de este ión.
- 7- Liberación de calcio del SR inducida por IP3

Durante el proceso del acoplamiento EC el control y mantenimiento de la concentración de calcio intracelular se lleva a cabo a través de los canales y las bombas de calcio de la membrana plasmática y de los orgánulos intracelulares:

1. canales iónicos voltaje-dependientes: se abren cuando hay una despolarización del potencial de membrana. Después de la apertura, algunos de estos canales tienen un periodo refractario o de inactivación, en el que no son susceptibles de ser abiertos durante un relativamente corto período de tiempo. El canal iónico voltaje dependiente con mayor importancia es el canal de calcio tipo-L. Son canales inotrópicos, y son los que tienen un papel más importante en el AP, por este motivo, se tratan con más detalle más adelante.
2. canales iónicos ligando-dependientes: que se abren por la interacción de una sustancia química o ligando (neurotransmisores, hormonas o iones). Estos canales tienen dos sistemas de apertura: por activación directa, esta sustancia química se une a un receptor de un canal y cambia su conformación abriéndolo (en el caso de ser receptores ionotrópicos, es decir, asociaciones de proteínas que forman un canal iónico); o por activación indirecta, la sustancia química se une a un receptor y a través de una proteína G acoplada al canal provoca una cascada de eventos enzimáticos, activando enzimas fosforiladoras que actúan sobre el canal y lo abren (receptores metabotrópicos). Después de la apertura, estos canales tienen un período refractario debido a la internalización del receptor en la membrana. Es decir, el receptor, junto con el ligando, es invaginado al interior de la célula en vesículas de la membrana plasmática. Entonces el ligando se separa del receptor y es degradado, mientras que el receptor es “reciclado”, vuelve a la membrana plasmática y puede volver a unirse otra vez al ligando por un nuevo estímulo hormonal <sup>39</sup>.

Existen dos tipos de canales activados por ligando, los canales selectivos para cationes excitatorios, estimulados por acetilcolina, glutamato, ATP y 5-hidroxitriptamina, y los canales selectivos para aniones inhibitorios, estimulados por GABA y glicina.

- canales iónicos mecanosensibles: se abren por el incremento de presión mecánica o estiramiento sobre la membrana celular. Unos de los canales más importantes dentro de este grupo son canales de potasio (canal que cuando se abre deja salir iones  $K^+$  produciéndose una hiperpolarización).<sup>40-42</sup>



**Figura 10.** Tipos de canales en su configuración abierta (arriba) y cerrada (abajo): canales voltaje-dependientes, canales activados por ligandos y canales mecanosensibles.

- Intercambiadores. El calcio que no se reaccumula en el SR sale de la célula a través del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX). El transporte de calcio a través del intercambiador se realiza a favor del gradiente iónico.
- ATPasas o bombas de calcio. El control de la concentración de calcio depende de la relación entre el calcio extracelular, el calcio citosólico y el calcio del interior de los orgánulos intracelulares (como el SR). El medio extracelular contiene una concentración de calcio de alrededor de 1,8mM. Algunos orgánulos celulares (retículo sarcoplasmático/endoplasmático, Aparato de Golgi, mitocondrias, etc.) funcionan como reservorios de calcio y pueden contener altas concentraciones de este ión, en total una concentración del rango de milimolar. En el citosol de un cardiomiocito en reposo se encuentra solamente un 10 % del calcio intracelular libre (50nM de calcio libre en el citosol, sobre 500 $\mu$ M de calcio en los orgánulos), aunque la concentración de calcio incrementa a niveles de  $\mu$ M tras una estimulación que libere el calcio de los orgánulos intracelulares, a través de los canales de calcio de estos orgánulos<sup>15</sup> y que provoque la despolarización.

6. Los tampones intracelulares de calcio también juegan un papel importante dentro de la homeostasis del calcio. Son proteínas que se unen al calcio tamponándolo, como por ejemplo, la calmodulina y la calreticulina, que funcionan como depósito de calcio citosólico, la troponina-C que tampona el calcio del citosol en cada contracción, o la calsequestrina que tampona el calcio en el SR. La proporción de calcio libre intracelular y calcio tamponado intracelular es del orden de 1:100. Estas proteínas se unen a grandes cantidades de calcio dentro de la célula, evitando la formación de precipitados insolubles de fosfatos cálcicos y, a su vez, permitiendo la movilización de este ión cuando los mecanismos de liberación se activan.

Así, los principales mecanismos que intervienen en la regulación del calcio intracelular y que, por tanto, afectan al mecanismo de excitación-contracción son:

### **3.1. Regulación del calcio por la corriente de calcio ( $I_{Ca}$ )**

Los canales de calcio son unos de los canales más importantes, tanto en el funcionamiento normal como en los procesos patológicos, en las células neuronales y musculares <sup>43</sup>. Fueron identificados por primera vez cuando se eliminó la corriente de sodio, al no poner sodio en la composición del medio extracelular, y se observó que el músculo seguía generando potenciales de acción <sup>44</sup>. Se hicieron estudios en profundidad de la conductancia del calcio en invertebrados <sup>45</sup>. Más tarde, se identificaron las corrientes de calcio en células musculares, cardíacas y en todas las células excitables. Harald Reuter fue uno de los pioneros en establecer que los canales de calcio tienen un papel esencial en la función cardíaca <sup>46</sup>.

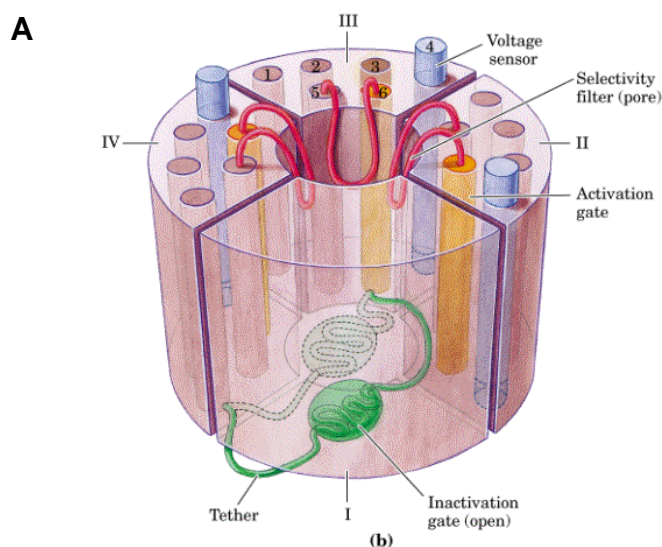
#### **3.1.1. Los canales de calcio de la membrana plasmática**

Estos canales son voltaje-dependientes, permiten la entrada de iones de calcio al citosol, siendo altamente selectivos para este ión.

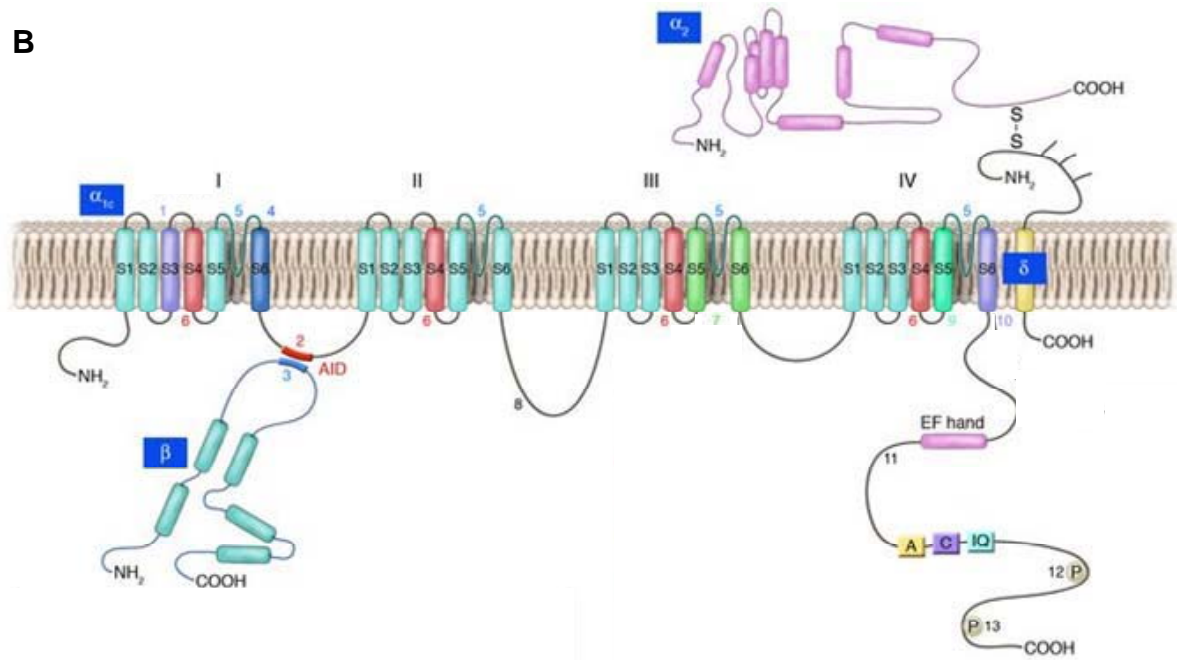
Hay dos grandes grupos de canales de calcio activados por voltaje <sup>47, 48</sup> que se diferencian por su sensibilidad a los cambios en el potencial. El primer grupo se denomina LVA (*low-voltage activated  $Ca^{2+}$  channels*) y requieren una despolarización pequeña para activarse. Este grupo lo constituyen los canales de calcio tipo-T, donde tipo-T se refiere a la expresión *Tiny conductance*. El segundo grupo se denomina HVA (*high-voltage activated  $Ca^{2+}$*

*channels*) porque necesitan mayor despolarización del potencial de membrana para abrir el poro del canal. Dentro de este segundo gran grupo se encuentran los canales de calcio más estudiados, los canales tipo-L, donde tipo-L se refiere a la expresión *Large conductance and activation at Large* depolarizations. Se encuentran en células nerviosas, musculares y en células no excitables. En los cardiomiocitos se encuentran en los túbulos-T y constituyen la principal vía de entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en las células del músculo cardíaco. También hay canales de calcio tipo N (en células neuronales<sup>49</sup>), tipo R (de residuales<sup>50</sup> en células neuronales) y tipo P/Q (tipo-P en células de Purkinje<sup>51</sup> y tipo-Q en células granulares del cerebelo<sup>50</sup> y la combinación de los dos componentes<sup>52</sup> en células nerviosas y de la musculatura vascular lisa), clasificados de esta forma en función de su dependencia del voltaje y de su sensibilidad a diversas toxinas.

Los canales de calcio voltaje-dependientes son proteínas heteroméricas de cadena larga. Tienen una estructura en forma de poro en la bicapa lipídica de la membrana celular con cuatro subunidades que forman un tetrámero (figura 12A). Cada subunidad está compuesta a su vez por seis hélices transmembranales y su correspondiente región P (figura 12B). Se identificaron a partir de la caracterización bioquímica del receptor de DHP en el músculo esquelético en los túbulos-T. Estos estudios establecieron que el complejo receptor-canal de DHP era un complejo multisubunidad compuesto que contiene cinco componentes denominados  $\alpha_1$  (170KDa) que forma el poro del canal,  $\alpha_2$  (150 KDa),  $\beta$  (52 KDa),  $\delta$  (17-25 KDa) y  $\gamma$  (32 KDa)<sup>53</sup>.



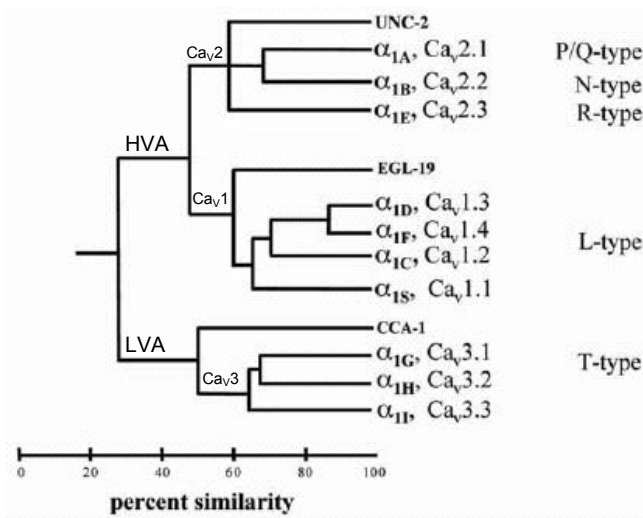


**B**

**Figura 12.** Estructura de un canal de calcio. A: Presenta la estructura en 3D de un canal con 4 subdominios (I, II, III, IV) y sus correspondientes segmentos transmembranales. B: La figura muestra los 4 subdominios con sus correspondientes segmentos transmembranales (de S1 a S6), compuestos por la  $\alpha$ -hélice, la subunidad  $\beta$  y oligosacáridos, indicando la función de las diferentes partes de la estructura, siendo: 1 parte relacionada con la activación voltaje-dependiente, 2 parte de la subunidad  $\alpha$  que interacciona con la subunidad  $\beta$  (AID), 3 parte de la subunidad  $\beta$  que interacciona con la subunidad  $\alpha$  (BID), 4 parte relacionada con la inactivación voltaje-dependiente, 5 parte relacionada con la selectividad iónica del canal, 6 parte que hace de sensor de voltaje, 7 parte que actúa como receptor DHP, 8 parte sensible al acoplamiento EC, 9 parte relacionada con el bloqueo del canal, 10 parte que actúa como receptor DHP, BTZ y PAA, 11 parte relacionada con la inactivación dependiente de calcio, 12 parte relacionada con la fosforilación de CaMKII, 13 parte relacionada con la fosforilación por PKA.<sup>54</sup>

La subunidad  $\alpha$  es el receptor de DHP. Tiene 24 segmentos transmembrana putativos que conforman cuatro dominios homólogos (I, II, III, IV) con uniones intracelulares y sus respectivas N y C terminal. Cada subunidad  $\alpha_1$  tiene una función y una distribución específicas<sup>55</sup> (figura 13) y contiene partes susceptibles de ser fosforiladas por proteínas kinasas A, CaMKII y proteína kinasa C<sup>56-60</sup>. La subunidad  $\alpha_{1C}$  (Ca<sub>v</sub>1.2) es un canal de tipo L, se encuentra ampliamente distribuido por células excitables<sup>61-63</sup> y es sensible a las benzothiazapinas, DHPs y phenilalkilaminas. La subunidad  $\alpha_{1D}$  (Ca<sub>v</sub>1.3) también es un canal de tipo L<sup>62</sup> y se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro y en células del sistema endocrino, que es sensible a  $\omega$ -CgTx, benzothiazapinas, DHPs y phenilalkilaminas. Las subunidades  $\alpha_{1F}$  (Ca<sub>v</sub>1.4) y  $\alpha_{1S}$  (Ca<sub>v</sub>1.1) son canales de tipo L que se encuentra ampliamente distribuidos por células excitables y son especialmente sensibles a las

dihysensibles a las dihydropiridinas (DHPs), además de a benzothiazapinas y phenilalkilaminas.



**Figura 13.** Dendrograma de la clasificación de los diferentes canales de calcio según la subunidad  $\alpha_1$  que los conforman. (Landes Bioscience)

Se ha observado que todas las subunidades  $\beta$  incrementan la actividad de la subunidad  $\alpha_1$ , alteran su sensibilidad al voltaje y su cinética (normalmente aceleran tanto la activación como la inactivación). Aunque no se conocen los mecanismos mediante los cuales las subunidades  $\beta$  modulan la actividad de las diferentes subunidades  $\alpha_1$ . Las subunidades  $\beta$  contienen partes susceptibles de ser fosforiladas por proteínas Kinasas C o proteínas Kinasas AMPc dependientes.

La subunidad  $\gamma$  es una glicoproteína que forma un complejo con el receptor de DHP<sup>56, 64</sup>. Aún no se ha determinado su función, pero su expresión restringida en el músculo esquelético y cardíaco sugiere que podría jugar un papel importante en el acoplamiento excitación-contracción<sup>65</sup>.

### 3.1.2. Caracterización de la $I_{Ca}$

La activación de los canales de calcio tipo-L es voltaje-dependiente, es decir, la apertura de los canales de calcio aumenta con la despolarización. Cuando el potencial de membrana se despolariza, la corriente de calcio tipo-L aumenta debido a la apertura progresiva de los canales hasta alcanzar su valor máximo. Mediante la técnica de patch-clamp se pueden

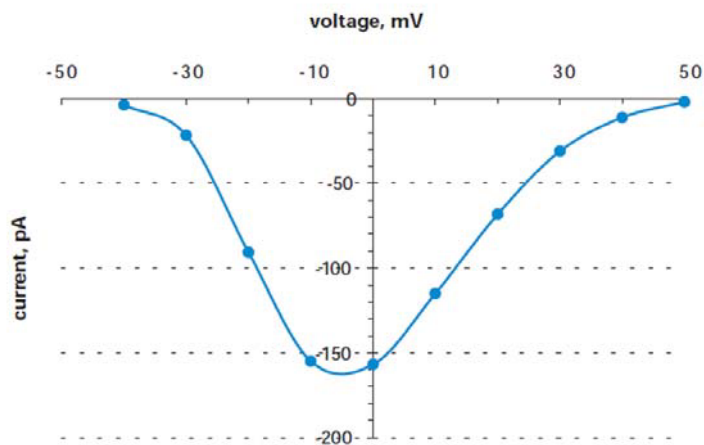
obtener registros de la corriente de calcio en una célula, que reflejan el flujo de iones de calcio a través de los canales abiertos y, por tanto, la amplitud de esta corriente depende del número de canales abiertos y de la corriente que pasa por un solo canal. A su vez, la amplitud de la corriente que pasa por un solo canal de calcio depende de la conductancia del canal y del gradiente electroquímico. Por tanto, la amplitud de la corriente de calcio tipo-L ( $I_{Ca}$ ) depende del número de canales abiertos ( $N$ ), de la conductancia de cada canal ( $\gamma$ ) y del gradiente electroquímico para el calcio.

$$I = N \gamma (V_M - E_{Ca})$$

donde  $V_M$  es el potencial de membrana

$E_{Ca}$  es el potencial de equilibrio para el calcio

La relación que existe entre la amplitud máxima de la corriente y el potencial de membrana se observa en la curva Intensidad-Voltaje (IV).



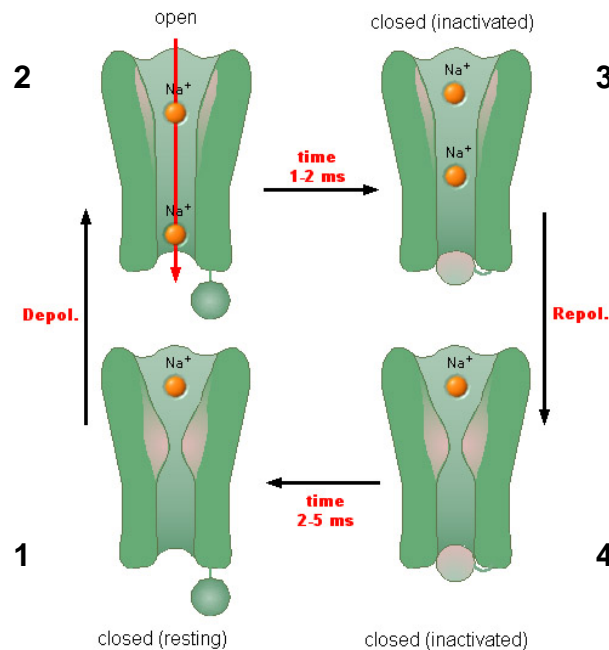
**Figura 14.** Representación gráfica de la relación intensidad-voltaje para la corriente de calcio tipo-L en cardiomiocitos auriculares humanos.

Dicho de otra manera, la amplitud de la  $I_{Ca}$  es una buena medida para ver cómo varía la conductancia del canal en función del potencial de membrana.

En la figura 14 se puede observar que los cardiomiocitos muestran un umbral de activación cercano a -40mV, con un posterior incremento paulatino de la corriente hasta alcanzar una amplitud máxima a un potencial de despolarización de aproximadamente 0 mV.

La apertura y cierre de los canales se debe a un cambio en la conformación de la estructura del canal, de manera que el canal puede tener conformaciones diferentes:

- cerrado y activable: no permiten el paso de los iones, pero son susceptibles de ser abiertos en respuesta a un estímulo.
- abierto y activo: permiten el paso de los iones.
- cerrado e inactivado: cerrados y no susceptibles de abrirse en respuesta a un estímulo.

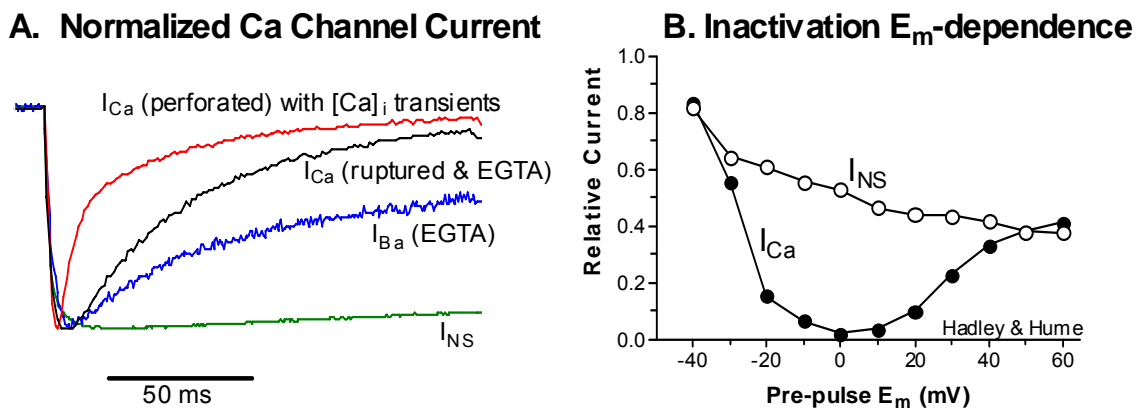


**Figura 15.** Esquema de las cuatro conformaciones del canal: cerrado en reposo, abierto, parcialmente inactivado, completamente inactivado. Primero el canal está cerrado y en reposo, por tanto, susceptible de abrirse (la compuerta de activación está cerrada y la de inactivación abierta). Con la despolarización el canal se activa por voltaje y, por tanto, pasa a una conformación de abierto y da paso a los iones (la compuerta de activación y la de inactivación están abiertas). Rápidamente, el canal cambia su conformación a inactivado cerrando una de las estructuras moleculares o puertas que dejan pasar a los iones (la compuerta de activación está abierta pero la de inactivación está cerrada). Durante el período refractario no es susceptible a abrirse por ningún estímulo (las dos compuertas están cerradas). Durante la repolarización el canal inactivado se cierra completamente y, después de entre 2 a 5 ms, el canal cambia su conformación a cerrado (la compuerta de activación está cerrada y la de inactivación abierta), no dejando paso a iones pero siendo susceptible a los estímulos que vuelvan a abrirlo, es decir, vuelve a estar cerrado en reposo.

La inactivación de los canales de calcio presenta dos componentes: uno dependiente del voltaje y otro dependiente de la concentración de calcio cerca del canal.

La figura 16 muestra el paso de iones de sodio (corriente de sodio,  $I_{\text{Na}}$ ) por el canal de calcio en ausencia de iones de calcio. En estas condiciones, la inactivación es muy lenta y permanece incompleta a potenciales positivos después de 500 ms. Esta curva de

inactivación de  $I_{NS}$  es precisamente la que representa la componente pura de la inactivación voltaje-dependiente. En cambio, la corriente de bario ( $I_{Ba}$ ) se inactiva más rápidamente, mostrando en parte la habilidad del bario de substituir al calcio<sup>66</sup>. Sin embargo, al hacer patch-clamp con 10mM de EGTA (que tampona el calcio liberado por el SR) y sin EGTA en la pipeta, la inactivación es más rápida. Además, la curva de inactivación de la corriente con calcio, tiene la misma dependencia del voltaje que el IV de la corriente de entrada de calcio. Todo esto implica que, aunque la inactivación de los canales de calcio tipo-L dependen del voltaje y de la concentración de calcio, está última es la componente dominante.



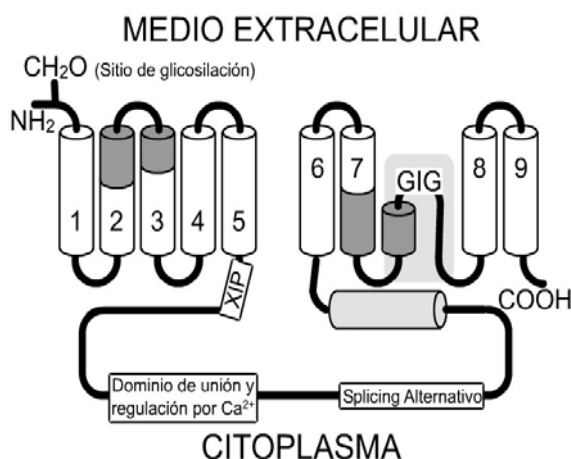
**Figura 16.** Inhibición de los canales de calcio tipo-L. A: Registros representativos de corrientes de calcio ( $I_{Ca}$ ), bario ( $I_{Ba}$ ) y sodio ( $I_{NS}$ ) a 0mV. B: Amplitud de las corrientes de sodio y calcio de los canales de calcio después de pulsos de 500 ms. Figura extraída de <sup>15</sup>.

Este mecanismo de inactivación por calcio hace que la inactivación de las corrientes de calcio se acelere frente a un aumento del calcio intracelular<sup>67, 68</sup>. Así, los canales de calcio tipo-L pueden ser inhibidos por un mecanismo propio de feedback negativo, que de hecho, está modulado por los dominios citoplasmáticos del canal.

Existe cierta controversia acerca de la reducción de la corriente de calcio en células de pacientes con insuficiencia cardíaca, ya que aunque parece que esta corriente podría no verse afectada en miocitos ventriculares<sup>69</sup>, hay estudios que demuestran que la corriente de calcio tipo-L disminuye en los miocitos auriculares de pacientes con insuficiencia cardíaca<sup>70, 71</sup>. Por otro lado, es bien conocido que en las células de pacientes con FA la  $I_{Ca}$  está disminuida<sup>72</sup>, al igual que la contractilidad.

### 3.2. Regulación del calcio por la corriente de $I_{NCX}$

Hasta el momento, se han clonado 3 isoformas del: la NCX1<sup>73</sup> (la única presente en el corazón), la NCX2<sup>74</sup> y la NCX3<sup>75</sup>. Los modelos iniciales de la isoforma NCX1 (de 110kDa) del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  sugerían que esta proteína poseía 12 segmentos transmembrana. Posteriormente, se encontró que el segmento hidrofóbico inicial de 32 aminoácidos es un péptido señal, el cual se separa de la proteína durante su procesamiento inicial en el retículo endoplasmático<sup>76,77</sup>. En la actualidad, se plantea que el intercambiador posee solamente 9 segmentos transmembrana<sup>78</sup>. La región N-terminal de esta proteína está glicosilada en la posición 9, y por lo tanto, es extracelular. Se ha descrito que la glicosilación<sup>77</sup> y la hidrólisis del péptido señal no influyen significativamente en la función de este transportador<sup>79, 80</sup>. El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  posee un dominio hidrofóbico N-terminal con 5 segmentos transmembrana y un dominio C-terminal formado por 4 segmentos (figura 11).



**Figura 11.** Modelo actual de la estructura del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . La proteína posee 9 segmentos, los cuales atraviesan la membrana plasmática. El extremo amino-terminal se glicosila y es extracelular. Entre los segmentos 7 y 8 hay un fragmento hidrofóbico con estructura similar al lazo P presente en los canales de  $\text{K}^+$  (GIG: Gli-Ile-Gli). Las regiones homólogas a, intervienen directamente en el transporte iónico y se sitúan en los segmentos transmembrana 2,3 y 7. Se muestran además en el lazo intracelular la región reconocida por el péptido inhibitorio XIP, el sitio de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  regulatorio y la región correspondiente a la secuencia de ARN donde ocurre el splicing alternativo. El lazo citoplasmático no está dibujado a escala, pues constituye más de la mitad de la longitud de la proteína (550 aminoácidos)<sup>81</sup>.

Este transportador mueve 3 iones de  $\text{Na}^+$  y los intercambia por 1 ión de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este intercambio electrogénico resulta en una corriente positiva a favor del lado de la membrana celular al que pasan los iones de  $\text{Na}^+$ <sup>10</sup>, que generalmente suelen pasar de fuera a dentro.

El intercambiador NCX, transporta 3 iones de  $\text{Na}^+$  del medio extracelular y los cambia por 1 ión  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol, resultando la entrada de 1 carga neta. De este modo, el NCX extrude el calcio al espacio extracelular durante la repolarización<sup>27</sup> dando lugar, a una corriente de entrada, denominada corriente de cola ( $I_{\text{tail}}$ )<sup>34</sup> cuando la célula se repolariza en experimentos de patch-clamp. Así pues, la salida de calcio implicaría una corriente de entrada  $I_{\text{Na/Ca}}$ . Sin embargo, durante la fase ascendente del potencial de acción, este intercambiador suele funcionar de modo reverso, es decir, introduce calcio en la célula y extrae sodio, debido a la gran despolarización de la membrana y a la elevada concentración intracelular de sodio que ha entrado por los canales de sodio. Después de la entrada de calcio a través de los canales de calcio tipo-L, el intercambiador sodio/calcio funcionaría de nuevo de su forma directa.

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  es sensible a cambios en el potencial de membrana y al gradiente de  $\text{Na}^+$ , además de estar regulado por otros ligandos intracelulares y extracelulares (ATP,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfoarginina, fosfolípidos)<sup>82, 83</sup>. Por supuesto, cualquier agonista o antagonista de los canales de calcio, afectará a la concentración de calcio y, por tanto, al funcionamiento del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Del mismo modo, un aumento de  $\text{Na}^+$  intracelular podría enlantececer el modo directo del NCX o favorecer el modo revertido. También es posible bloquear el modo revertido del NCX mediante compuestos que preferentemente bloquean la entrada de calcio por el intercambiador como el KB-R7943 o SEA0400 que es más selectivo.

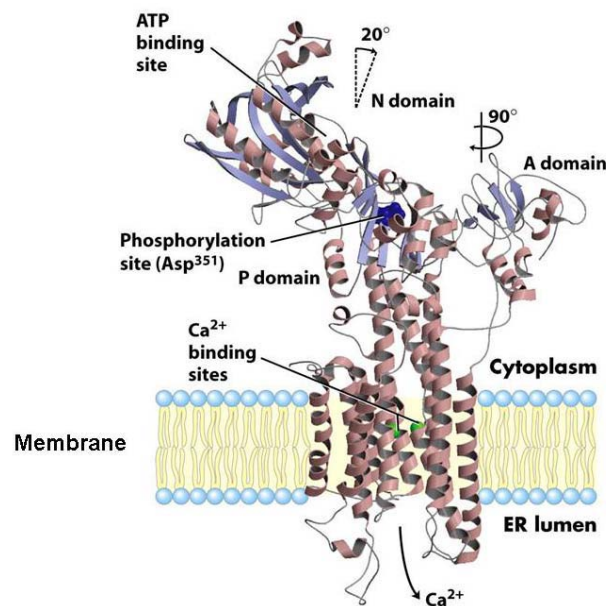
Los miocitos auriculares humanos en reposo presentan cierto nivel basal de liberaciones espontáneas de calcio del SR que provocan la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Mediante la técnica de patch-clamp se pueden obtener registros de las corrientes de este intercambiador ( $I_{\text{NCX}}$ ) en una célula en reposo, mantenida a -80 o -50 mV, que reflejan la parte del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado que se expulsa por el intercambiador y, por tanto, la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR. Además, la amplitud de estas corrientes  $I_{\text{NCX}}$  es una medida cuantitativa del flujo  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y representa una medida de la magnitud de las liberaciones de calcio del SR.

Es conocido que existe un aumento en la expresión del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  células de pacientes con hipertrofia e insuficiencia cardíaca. Además, el NCX desempeña un papel crucial en la patogenia de las arritmias y daño celular asociado a la isquemia y reperusión<sup>84</sup>. También se ha asociado los cambios en la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  con la fibrilación auricular<sup>85</sup>.

### 3.3. Regulación del calcio por la bomba de calcio del SR

Durante la relajación de la contracción, los iones de calcio se acumulan en el SR a través de una bomba de calcio ATPasa denominada SERCA. Esta bomba de calcio transporta dos iones de calcio por cada molécula de ATP consumida, tanto en el SR del tejido muscular esquelético como en el cardíaco.<sup>86, 87</sup>

Esta enzima constituye el 80% de las proteínas de membrana del retículo sarcoplasmático. Es un polipéptido de aproximadamente 110 Kd con un solo dominio transmembrana que consiste en 10  $\alpha$ -hélices. Este dominio transmembrana incluye los centros de unión a los dos iones de calcio. Además, esta proteína está constituida por una cabeza citoplasmática formada por otros tres dominios, cada uno de ellos con una función específica: el dominio N se une a ATP, el dominio P acepta el grupo fosforilo y el dominio A conecta estos dos dominios con el dominio transmembranal (figura 17).



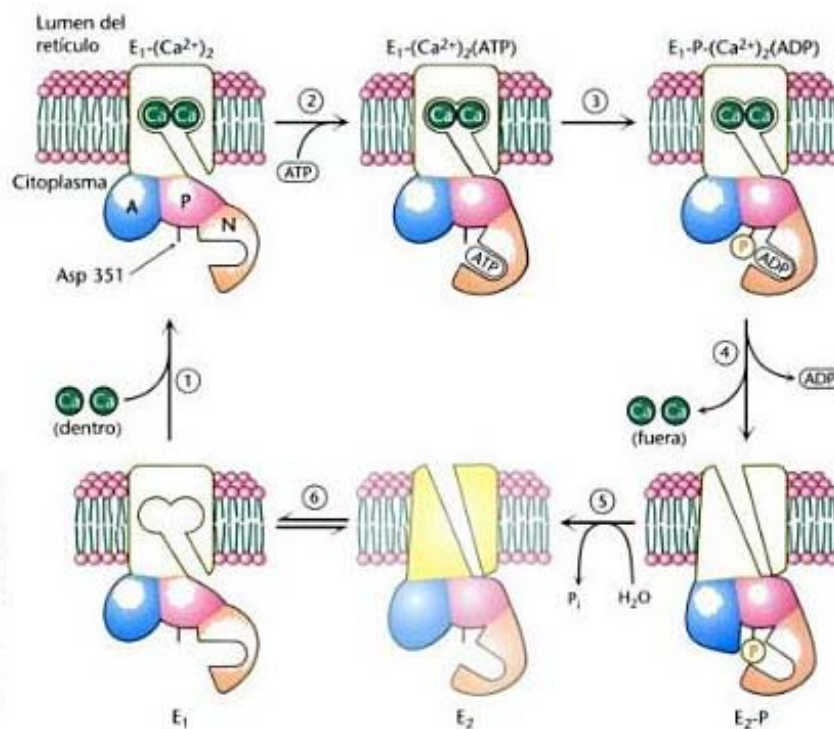
**Figura 17.** Esquema de la estructura de SERCA. Figura basada en la estructura de Toyoshima *et al.* (2000).

Existen cinco isoformas diferentes de SERCA: SERCA1a (en tejido de músculo esquelético neonatal), SERCA1b (en tejido de músculo esquelético adulto), SERCA2a (en tejido de músculo cardíaco y esquelético), SERCA2b y SERCA3 (en la musculatura lisa y en células no musculares)<sup>88</sup>.

El mecanismo de bombeo de calcio mediante esta ATPasa implica una serie de cambios estructurales en la molécula (figura 18):



- 1- La enzima se encuentra en su forma desfosforilada y se le unen dos iones de calcio (en la figura 18 es la conformación  $E_1-(Ca^{2+})_2$ ). En esta conformación SERCA captura iones de calcio de la membrana citoplasmática.
- 2- Entonces SERCA puede unirse a ATP. Los dominios N, P y A sufren un cambio conformacional para capturar este ATP.
- 3- El grupo fosforilo pasa del ATP al Asp 351, es decir, el ATP pasa a ADP más el grupo fosfato.
- 4- Con la liberación del ADP SERCA experimenta un nuevo cambio conformacional llamado eversión, que incluye un cambio en el dominio transmembrana (en la figura 18 es la conformación  $E_2$  o  $E_2-P$  en su forma fosforilada). Los centros de unión al calcio se separan liberándolo en el lado opuesto de la membrana al que fueron captados, es decir, en el interior del SR. Una vez en el SR, el calcio se une a la calsequestrina, una proteína capaz de fijar hasta 43 iones de calcio, cuya función es fijar el calcio que entra a través de SERCA evitando que precipite. Además, la calsequestrina regula la cantidad de calcio liberado por parte de los RyRs.
- 5- Se hidroliza el residuo fosfoaspartato y se libera el grupo fosfato.
- 6- Con la liberación del grupo fosfato se pierden las interacciones que estabilizan esta conformación (en la figura 18 es la conformación  $E_2$ ) pasando de la conformación molecular inicial (en la figura 18 es la conformación  $E_1$ ), donde SERCA puede volver a captar iones de calcio.



**Figura 18.** Esquema del transporte de calcio por SERCA.

La reacumulación de calcio del SR está regulada por dos mecanismos:

- el primero corresponde a la regulación de la actividad de la bomba de calcio del SR o SERCA-ATPasa por phospholamban PLB en las células cardíacas<sup>89, 90</sup>. PLB es un inhibidor endógeno de SERCA<sup>91, 92</sup> que disminuye la actividad ATPasa, puesto que en su forma desfosforilada disminuye la afinidad de SERCA por los iones de calcio. PLB puede ser fosforilado por proteína kinasa (PKA) dependiente de AMPc<sup>93, 94</sup>, lo cual reduce su efecto inhibitor sobre la SERCA y da lugar a un incremento en la afinidad de la bomba al calcio entre dos o hasta tres veces. PLB también se fosforila por la presencia de CaMKII<sup>95, 96</sup> o de PKC *in vitro*<sup>97</sup>, aunque el efecto de PKC *in vivo* es objeto de controversia.
- el segundo corresponde a un mecanismo feedback por el cual la entrada de calcio en el SR está regulada por el propio calcio, es decir, por gradiente electroquímico.

Existen tres potentes inhibidores de SERCA: thapsigargin (TG, el inhibidor más selectivo y con mayor afinidad, de inhibición irreversible)<sup>98</sup>, ácido ciclopiazónico (CPA)<sup>99</sup> y 2,5-di(tertbutil)-1,4-benzohidroquinona (TBQ)<sup>100</sup>.

Además, esta bomba de calcio es susceptible a cambios en las concentraciones de calcio y/o de ATP (SERCA tiene una elevada afinidad para el ATP), así como a cambios en el pH (su actividad desciende con la acidosis)<sup>101, 102</sup> y la temperatura.

El contenido de calcio del SR depende del calcio que entra en el retículo a través de SERCA y del calcio que se libera a través de los receptores de rianodina. Mediante la técnica de patch-clamp se pueden obtener una idea aproximada del contenido de calcio del SR, exponiendo a una célula en reposo a cafeína. Así, la corriente  $I_{NCX}$  inducida por una corta exposición a cafeína corresponde al calcio expulsado por el intercambiador NCX al activarse la liberación del contenido de calcio del SR debido a la apertura sostenida de los receptores de rianodina durante la exposición a cafeína. Este protocolo proporcionaría información acerca de la cantidad de calcio del SR (ver capítulo 5.2, apartado 6 en Material y Métodos).

La actividad de SERCA está gravemente afectada por la fibrilación auricular, puesto que en las células de pacientes con fibrilación incrementa la fosforilación y la actividad de SERCA está regulada por la fosforilación de PLB<sup>103</sup>. Además de la fosforilación, la expresión de SERCA también se ve afectada en FA<sup>104, 105</sup>. Lo mismo pasa en la insuficiencia cardíaca<sup>104, 106</sup>. Durante la insuficiencia cardíaca, muchos mecanismos para la reducción de la concentración de calcio intracelular durante la relajación se ven afectados, entre ellos la actividad de SERCA<sup>105</sup>. Algunas patologías, como la insuficiencia cardíaca, también se

asocian a una reducción en la amplitud de las concentraciones transitorias de calcio durante la contracción. Aunque existe cierta controversia sobre el mecanismo molecular responsable de este efecto, sobre el cual también intervendría la actividad del receptor de rianodina, se ha descrito que el calcio almacenado por el SR está disminuido debido a una reducción de la actividad SERCA-ATPasa y al aumento de la extrusión de calcio por el NCX<sup>107</sup>.

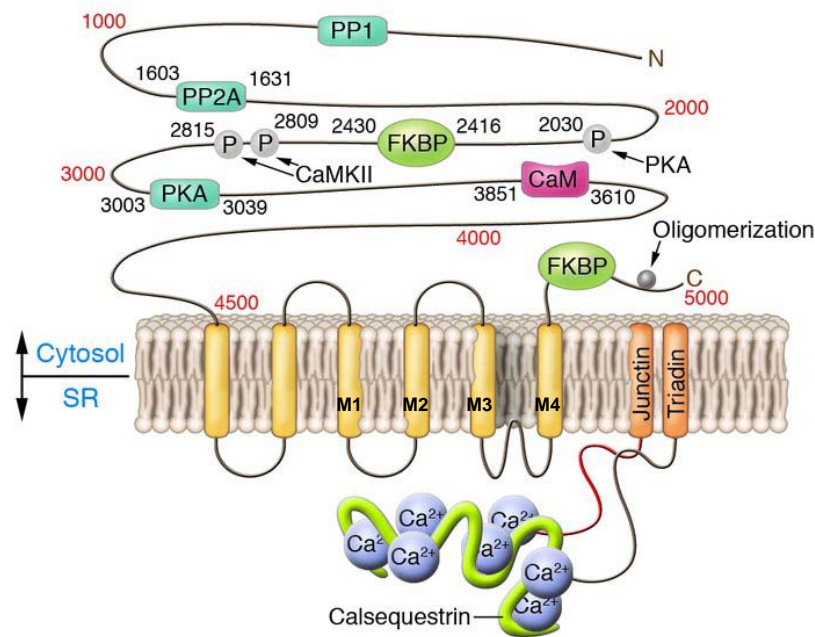
### **3.4. Regulación del calcio por el canal de calcio del SR (el receptor de rianodina)**

Los canales intracelulares de liberación de calcio son los responsables de la liberación de calcio del SR al citosol y, por tanto, de la activación de la contracción. Existen dos grupos:

- canales de liberación de calcio sensibles a rianodina (RyRs)
- canales receptores sensibles a Inositol 1, 4, 5 Trifosfato (IP3Rs)

El receptor de rianodina (RyR) es el principal canal que libera calcio del SR en cardiomiocitos. Cuando los receptores de rianodina se abren permiten que el calcio que contiene el SR sea liberado al citoplasma, tanto en tejido del músculo esquelético como en el cardíaco, aunque en el músculo esquelético provoca una contracción irreversible y, sin embargo, en el músculo cardíaco provoca contracciones que disminuyen progresivamente<sup>108-110</sup> ya que el calcio vuelve a ser reaccumulado en el SR hasta la siguiente contracción. Así pues, este canal tiene una gran importancia en la regulación de la contracción cardíaca.

Los RyR se expresan en la membrana del retículo endoplasmático y sarcoplasmático. Es un homotetrámero, formado por cuatro subunidades iguales de 550 kDa, con un dominio citoplasmático y uno intracelular.



**Figura 19.** Esquema de la estructura del receptor de rianodina. La figura muestra los 4 dominios transmembrana (M1-4) de acuerdo con el modelo de Takeshima *et al.* (1989) y otros dos dominios más. También muestra los lugares aproximados de interacción con proteínas y los lugares de fosforilación<sup>111</sup>.

Existen tres isoformas diferentes: RyR1 (se expresa en el músculo esquelético y células neuronales)<sup>112</sup>, RyR2 (en el músculo cardíaco y células neuronales)<sup>112</sup> y RyR3 (en células neuronales y no musculares)<sup>113-115</sup>.

Los RyR tienen una elevada conductancia, aunque baja selectividad por el calcio.

La salida de calcio por este canal de calcio, en músculo esquelético, está controlada por el potencial de membrana de los túbulos-T<sup>115, 116</sup> a través de canales de calcio voltaje-dependientes de la membrana plasmática. Pero en el músculo cardíaco, la liberación de calcio controlada por canales voltaje dependientes en los túbulos-T es tema de controversia. De hecho, los canales de calcio tipo-L interactúan con los RyR que están situados en la cisterna terminal del SR (formando una estructura conocida como pies).

La activación de los RyR también responde a efectores endógenos, como su activación por calcio. Su estimulación para la liberación de calcio del SR al citosol se basa en el reconocimiento de los iones de calcio en el lado citosólico de la membrana del SR a través de un sistema de retroalimentación positiva, es decir que, la concentración de iones de calcio cerca de los receptores de rianodina hace que se libere más calcio del SR por estos receptores (CICR)<sup>117</sup>. La activación es mayor cuando la concentración de calcio aumenta rápidamente. Después se produce un feedback negativo donde la alta concentración de calcio inactiva los RyR y así la liberación de calcio del SR<sup>118</sup>.

Receptor	Agonista	Antagonista
RyR2, RyR3	ADP-ribosa cíclica (cADPR) <sup>119,</sup> 120	
RyR1, RyR2	Cafeína, mathilxantinas <sup>121</sup>	
RyR	4-cloro-m-cresol, suramina, rianodina	Dantroleno, procaína, tetracaína rianodina

**Tabla 1.** Agonistas y antagonistas de las diferentes isoformas de los RyR.

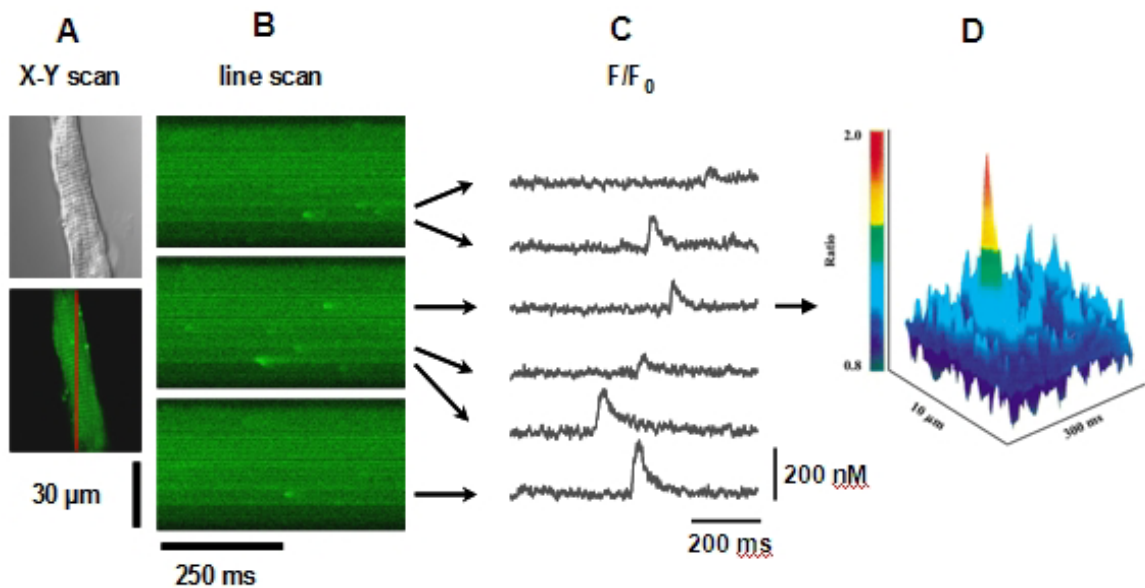
La rianodina se une de forma específica al RyR, y a bajas concentraciones (1-1000 nM) abre el canal y libera rápidamente calcio del SR, pero a muy elevadas concentraciones (>100  $\mu$ M) disminuye la apertura del RyR<sup>122, 123</sup>. La afinidad del receptor a la rianodina depende de la concentración de calcio y la presencia de nucleótidos, como el ATP.

Este canal está regulado por múltiples componentes:  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ( puede inhibir la apertura de los RyR2 a una concentración del rango de mM), calcio luminal (elevadas concentraciones de calcio luminal incrementan la probabilidad de apertura de los RyR2)<sup>124, 125</sup>, ATP (ATP solo puede activar fuertemente RyR1, en ausencia de  $Ca^{2+}$  o de  $Mg^{2+}$ )<sup>126</sup>, el pH (la acidosis, que por ejemplo se produce durante la isquemia, puede reducir la probabilidad de apertura de los RyR en más de un 50%)<sup>127</sup> y agentes reactivos a grupos SH, además de el estado de oxido-reducción, el estado de fosforilación/desfosforilación y varias proteínas y residuos sensibles a ser fosforilados como la calsecuestrina, calmodulina<sup>128</sup> y PKA<sup>129</sup> (los RyR pueden ser fosforilados vía estas proteínas), S100A1 y FKBP (FK-506 binding proteins)<sup>130</sup>.

Cuando el receptor se fosforila, aumenta la probabilidad de apertura del canal frente a un incremento local de la concentración de calcio y, por tanto, aumenta la liberación de calcio del SR. Esto produce un incremento en la concentración de calcio citosólico y resulta ser la causa de algunas arritmias. Por ejemplo, la insuficiencia cardíaca se ha asociado a una hiperfosforilación del RyR2<sup>131, 132</sup>. También se han asociado las mutaciones del RyR1 con la hipertermia maligna y la CCD (una miopatía congénita autosómica dominante). Las mutaciones del RyR2 se han relacionado con arritmias cardíacas<sup>117, 133</sup>. También se ha observado que los RyR3 podrían tener un papel importante en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer.

De hecho, un aumento del calcio citosólico debido, tanto a mutaciones en los receptores de rianodina, como a mutaciones, sobreexpresión o fosforilación de los canales de calcio de la membrana plasmática que están acoplados a los receptores de rianodina, han sido asociados a arritmias cardíacas. Por ejemplo, la incidencia de eventos locales de liberación

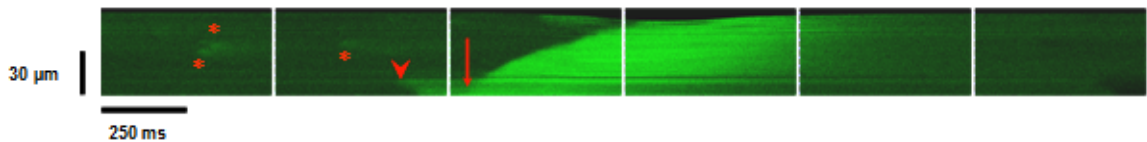
de calcio del SR, o *Ca Sparks*<sup>134</sup>, que se producen por liberaciones espontáneas de calcio por parte de los RyRs, incrementa si el funcionamiento de estos receptores está alterado (sobreexpresados, fosforilados, etc).



**Figura 20.** *Ca sparks* en una célula auricular humana. A) Imagen bidimensional de la célula con y sin fluorescencia (fluo-4 para la detección del calcio), tomada con confocal. B) Imagen line scan a través del eje del miocito. C) Gráfico que relaciona la concentración de calcio intracelular con la fluorescencia observada en la imagen B. D) Gráfico de superficie de la concentración de calcio intracelular durante el *Ca Spark*.

De hecho, una forma de caracterizar la actividad de los RyR es midiendo la incidencia de *Ca Sparks* (ver figura 20). Cada vez que los RyR se abren espontáneamente, liberan una pequeña cantidad de calcio y este calcio puede detectarse por fluorescencia mediante microscopía confocal en forma de *Ca Spark*.

La concentración intracelular de calcio puede aumentar de manera localizada en la célula por los *Ca sparks*<sup>135</sup>. Si los *calcium sparks* coinciden espacio-temporalmente pueden provocar un incremento de la concentración de calcio suficiente como para, mediante el mecanismo CICR, expandirse a toda la célula a partir de ese punto, generando una onda o *wave*<sup>136</sup> (figura 21).



**Figura 21.** *Ca waves* en una célula auricular humana. Imágenes line scan tomadas cada 4 ms que muestran *Ca sparks* y como pueden llegar a generar una liberación masiva de calcio del SR (*wave*) y una contracción.

En la insuficiencia cardíaca<sup>137</sup>, así como en la fibrilación auricular<sup>138</sup>, la hiperfosforilación del RYR2, resulta en un incremento patológico de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el RYR2 y una disminución del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del SR en pacientes con insuficiencia cardíaca.

Otro mecanismo que también contribuye a la liberación del calcio son los canales sensibles a inositol 1, 4, 5 Trifosfato. Los  $\text{IP}_3\text{R}$  son canales de calcio activados por la unión de  $\text{IP}_3$  y calcio y que están situados en la membrana del retículo endoplasmático y en la membrana nuclear. Este canal es un tetrámero de 313 kDa del cual se han identificado 3 subtipos diferenciados. Es un canal de calcio bien conocido en células no musculares<sup>139</sup>, también se expresa en el corazón, pero existe cierta controversia acerca de la importancia de su papel en el proceso excitación-contracción cardíaca<sup>140-142</sup>.

#### 4. Modulación neurohormonal

Existen mecanismos de comunicación inter e intracelulares que permiten la transferencia de sustancias y de señales. Gracias a ello, se obtienen las respuestas celulares precisas que intervienen en todos los procesos biológicos como por ejemplo la diferenciación, la secreción, la contracción, la mitogénesis, la homeostasis, etc. Una señal se transmite, primeramente, por un mensajero (agonista / hormona / ligando) que es reconocido por sus receptores específicos en la membrana celular. Las proteínas G es un grupo de proteínas situadas en la membrana celular encargadas de la transducción de señales neurohormonales en respuestas celulares, que se caracterizan por su interacción con guanosina trifosfato (GTP) provocando la hidrólisis de este nucleótido a guanosina bifosfato (GDP)<sup>143</sup>.

Existen receptores acoplados a proteínas G para proteínas (feromonas), péptidos (glucagón), nucleótidos (ATP), catecolaminas (adrenalina, noradrenalina, dopamina) o iones como por ejemplo el calcio. En el proceso de la transducción, el receptor se encuentra primero en estado latente, unido en su cara intracelular a una proteína G (trímero compuesto por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). En este estado, la proteína G une al nucleótido

GDP. Al activarse el receptor por la estimulación de un agonista específico, se produce un cambio conformacional del receptor (forma activa del receptor), que favorece el intercambio de GDP por GTP en la proteína G, lo que implica la disociación de sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . Las proteínas G son las verdaderas responsables de la activación de los diferentes sistemas efectores acoplados a los receptores. Cuando la proteína G se ha dissociado, se activan los segundos mensajeros intracelulares. Dependiendo de la naturaleza de la subunidad  $\alpha$ , cada tipo de proteína G promueve una acción intracelular diferente, aunque la subunidad  $\beta\gamma$  también puede promover rutas bioquímicas como la regulación de canales o de enzimas adenilato ciclasa, por ejemplo. Así, dependiendo del receptor al que se une un agonista y, al mismo tiempo, del tipo de proteína G a la que se une el receptor, la respuesta celular será diferente.

Así, hay receptores unidos a proteínas G que transmiten una señal a través de la Adenilato Ciclasa (AC), provocando un efecto en cascada, mediante un segundo mensajero intracelular (AMPc por ejemplo), que a su vez provoca un efecto directo o la modulación de diversas enzimas. Frecuentemente son proteínas quinasas (PKA dependientes de cAMP, PKG dependientes de cGMP, PK-CaM dependientes de calmodulina, PKC dependientes de diacil-glicerol,...), que catalizan la fosforilación sobre otras proteínas que podrán expresar o dejar de expresar su actividad (según su estado de fosforilación). De hecho, el AMPc es el segundo mensajero para la transducción de muchas de las señales, que a través de receptores acoplados a proteínas G, controla la función cardíaca (figura 22).

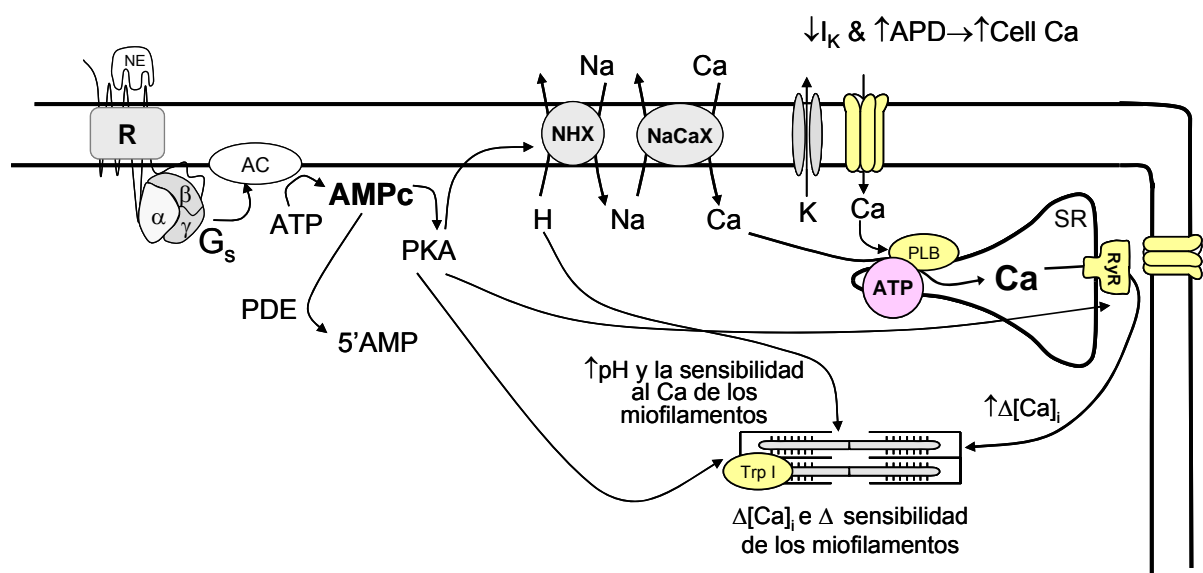


Figura 22. Esquema de la modulación neurohormonal por AMPc.



Según su estructura molecular, las proteínas G se clasifican en:

- monoméricas, constituidas por una única subunidad. Estas proteínas están libres en el citoplasma y en el nucleoplasma.
- heterotriméricas, trímero compuesto por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Son proteínas ancladas en la membrana plasmática por las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\beta$  se asocia a la subunidad  $\gamma$ .

Es a través de la subunidad  $\alpha$  que se unen a GTP o a GDP. En su forma inactiva se encuentran unidas a GDP y están activadas cuando poseen GTP en su estructura (la actividad GTPasa está regulada por reguladores de la señal de las proteínas G o RGS como GEF y GAP)<sup>144</sup>. Se han identificado más de veinte proteínas G basándose en la estructura de la subunidad  $\alpha$ , integradas todas ellas en subfamilias, entre las que se encuentran las proteínas Estimulantes (Gs) o las Inhibitoras (Gi).

Existe una gran variedad de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), que se unen a muchos y diversos ligandos (hormonas, neurotransmisores, iones, proteínas).

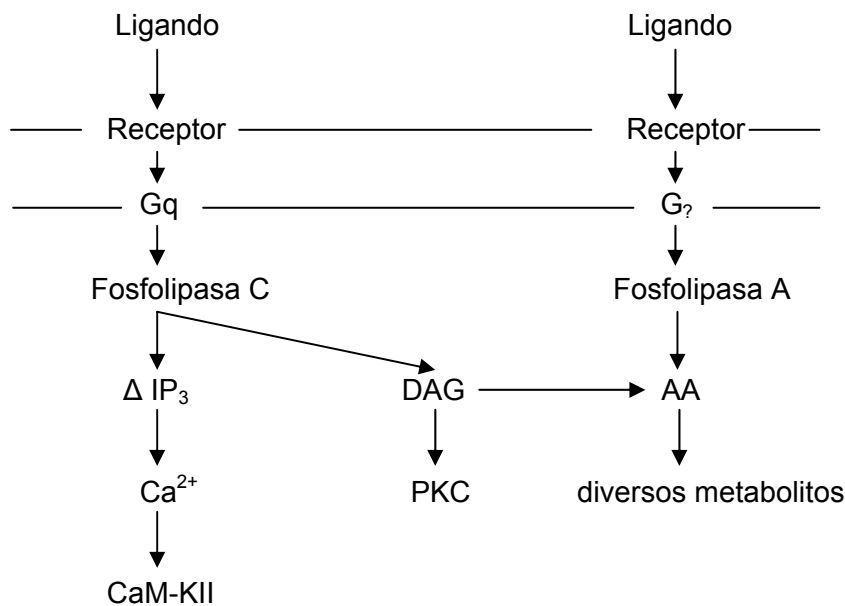
Los neurotransmisores encargados de transmitir las señales del sistema nervioso simpático son las catecolaminas (noradrenalina, adrenalina y dopamina) a través de receptores adrenérgicos. Además, la acetilcolina transmite señales del sistema nervioso parasimpático a través de receptores muscarínico colinérgicos.

#### 4.1. Los receptores adrenérgicos

Son receptores asociados a proteínas G activados por catecolaminas (adrenalina, noradrenalina, dopamina) y otros agonistas relacionados. Se clasifican en  $\alpha$ -adrenérgicos y  $\beta$ -adrenérgicos.

**Receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos:** Son receptores asociados a proteínas Gq, que a través de la activación de esta proteína, activan la fosfolipasa C, que causa un aumento del IP<sub>3</sub> y del calcio intracelular, pudiendo afectar a la contracción del músculo liso y causar vasoconstricción. Existen 3 subtipos:  $\alpha$ 1A,  $\alpha$ 1B y  $\alpha$ 1D. Sus principales agonistas son adrenalina, noradrenalina, endotelina, angiotensina-II y fenilefrina (agonista sintético). Entre sus antagonistas están la fenoxyzammina y la fentolamina (antagonista sintético).

La activación de estos receptores provoca una cascada de eventos enzimático (figura 23):



**Figura 23.** Esquema de la regulación neurohormonal mediada por los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos.

La estimulación de la fosfolipasa C cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) para formar dos segundos mensajeros:

- diacilglicerol (DAG), que activa proteína quinasa C, que fosforila proteínas citosólicas y de la membrana plasmática activándolas, por ejemplo, estimula el intercambiador Na/H que extrude protones elevando el pH y aumentando la concentración intracelular de sodio<sup>145</sup>. La alcalinización incrementa la sensibilidad al calcio de los miofilamentos y el incremento en la concentración intracelular de sodio, disminuye la eliminación de calcio por el intercambiador Na/Ca, lo que provoca un efecto inotrópico positivo.
- inositol-1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>), que se une a los receptores de IP<sub>3</sub> del SR que liberan iones de calcio al citosol.

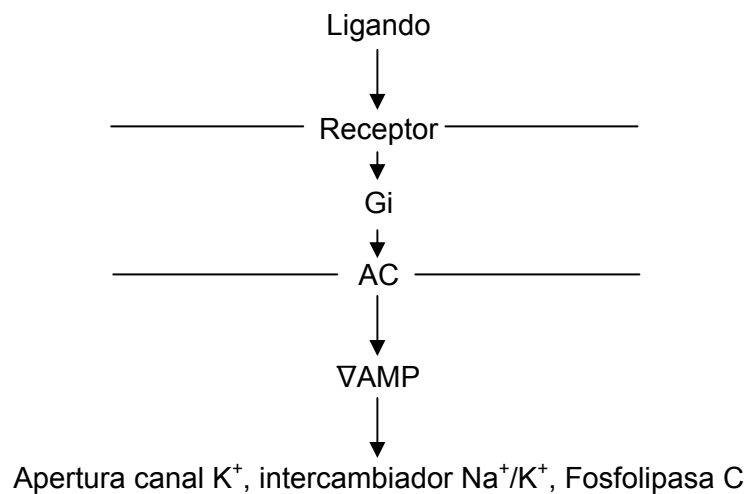
Además, el sistema IP<sub>3</sub>-DAG puede modificar la actividad de las fosfodiesterasas (PDEs). Hay once clases de PDEs. De todas ellas, sólo de la I a la V y la VII se expresan en el corazón<sup>146-149</sup>(tabla 2). La inhibición de PDEs tiene efectos inotrópicos. Los inhibidores de PDE3 y PDE4 previenen la hidrólisis de AMPc a 5'-AMP e incluso pueden provocar un incremento en los niveles de AMPc, de la corriente de calcio tipo-L, la acumulación de calcio del SR y de la disminución de la sensibilidad al calcio de los miofilamentos.

Clase	Substrato	Inhibidores
I	AMPc, GMPc	KSA-505
II	AMPc, GMPc	EHNA
III	AMPc > GMPc	Milrinone, amrinone, pimobendan, sulmazole...
IV	AMPc	Rolipram, RO 201724
V	GMPc	Zaprinast, sildenafil
VII	AMPc	??

**Tabla 2.** Clasificación de las fosfodiesterasas y sus inhibidores del corazón.

Cuando la concentración de calcio intracelular incrementa, este calcio se une a calmodulina, que a su vez se une a enzimas promoviendo su activación, como la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII). Cuando esta enzima se activa por calcio se autofosforila pudiendo fosforilar a su vez a otras proteínas como por ejemplo la miosina, los RyRs, PLB y el canal de calcio tipo-L. En este último caso, provoca un aumento de la  $I_{Ca}$  afectando incluso a su inactivación <sup>15</sup>.

**Receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos:** Son receptores asociados a proteínas  $G_i$ , que inhiben AC disminuyendo la concentración de AMPc, afectando a la apertura de los canales de  $K^+$ , al intercambiador  $Na^+/K^+$  y a la actividad de la fosfolipasa C (figura 24). Sin embargo, la presencia de estos receptores a nivel cardíaco se centra en el sistema vascular, no en los cardiomiocitos.

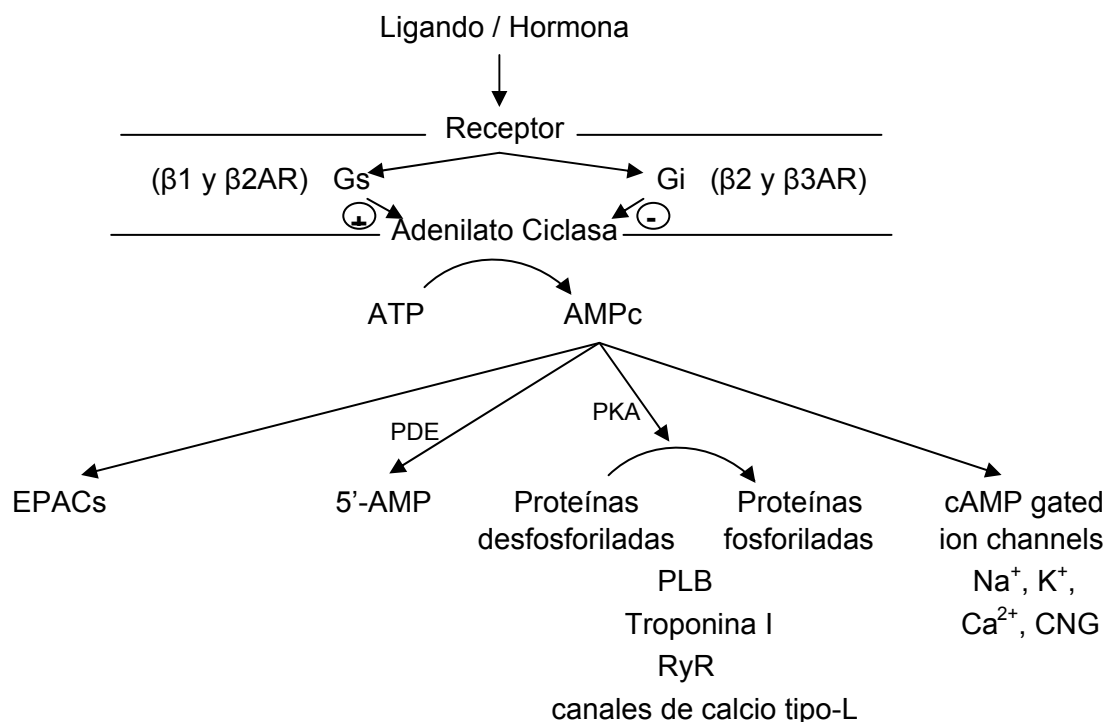


**Figura 24.** Esquema de la regulación neurohormonal mediada por los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos.

Existen 3 subtipos:  $\alpha 2A$ ,  $\alpha 2B$  y  $\alpha 2C$ .

La activación de estos receptores causa vasoconstricción y contracción de la musculatura lisa. Son mediadores en la neurotransmisión, a través de la inhibición de la descarga de noradrenalina y acetilcolina. También inhiben la liberación de insulina y de glucagón del páncreas, etc. Sus principales agonistas son adrenalina, noradrenalina y clonidina. Entre sus agonistas están la mirtazapina y el diazoxan.

**Receptores  $\beta 1$ -adrenérgicos:** Son los receptores adrenérgicos predominantes en el tejido muscular cardíaco. Son receptores que, a través de proteínas  $G_i$  y  $G_s$ , modulan la actividad de adenilato ciclasa (AC) y la producción de AMPc. A su vez, AMPc puede modular PKA y sus dianas de fosforilación (los canales de calcio tipo-L, de los receptores de rianodina, de SERCA a través de PLB y de troponina I en las miofibrillas). También tienen un efecto directo, a través del AMPc, sobre *cAMP gated channels* y *cAMP guanine nucleotid exchange factors* (EPACs). Además, la figura 25 muestra que a través de las diferentes PDEs se regula la concentración de AMPc.



**Figura 25.** Esquema de la modulación neurohormonal mediada por receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se acoplan a la adenilato ciclasa por medio de la unión con proteínas G, AC se activa y produce AMPc, causando así un incremento la concentración intracelular de AMPc. El AMPc actúa como segundo mensajero activando la proteína quinasa A (PKA) y fosfodiesterasas (PDEs). Además, el AMPc puede tener efecto directo sobre canales y otras moléculas (como por ejemplo EPAC).

Producen efectos inotrópicos (contractilidad) y cronotrópicos (automatismo, frecuencia) positivos. Sus principales agonistas son la isoprenalina, con mayor afinidad por estos receptores que la noradrenalina y ésta, a su vez, que la adrenalina, y la dobutamina como agonista selectivo. Entre los antagonistas selectivos están el acebutolol, el atenolol y el esmolol.

**Receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos:** Aunque el mecanismo de acción de estos receptores es el mismo que el de los receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos, el efecto inotrópico de sus agonistas es diferente en cuanto a la producción de AMPc, la rapidez de relajación de la contracción o la fosforilación dependiente de AMPc<sup>150, 151</sup>, debido al diferente grado de compartimentación del AMPc mediado por fosfodiesterasas (PDE3 y PDE4)<sup>152</sup>. Esos receptores intervienen en la relajación de la musculatura lisa, la vasodilatación, en la velocidad de contracción de los músculos estriados y en su glucogenolisis (figura 25).

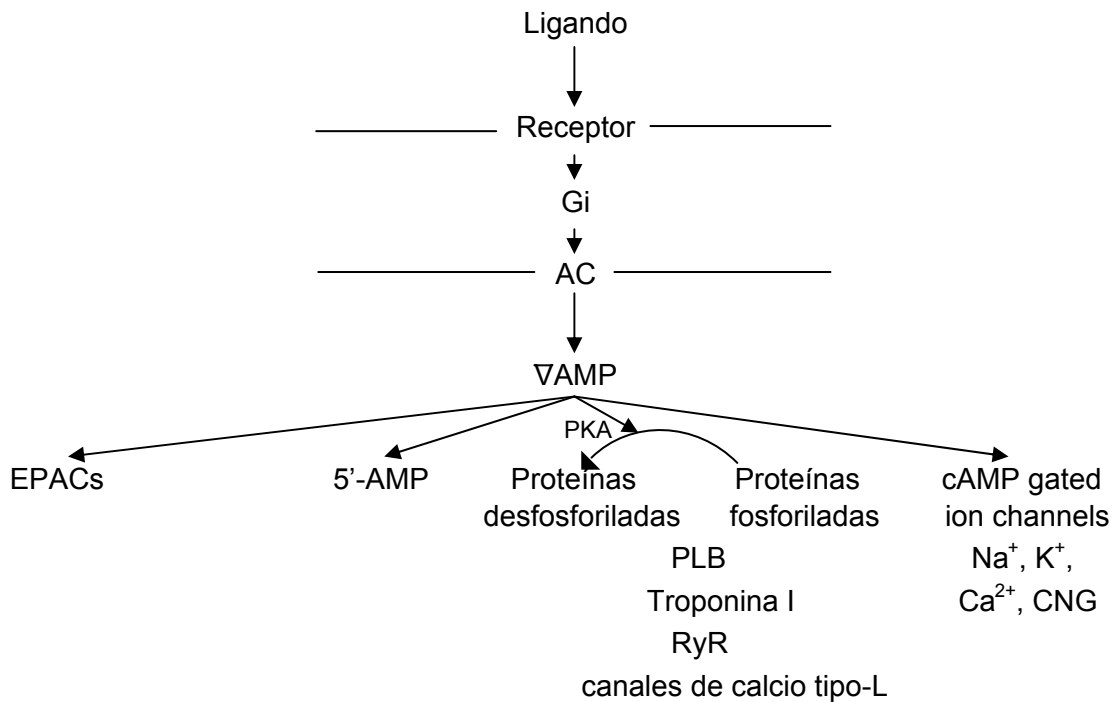
Sus principales agonistas son la ritodrina, el albuterol, el isoproterenol y la terbutalina. Entre los antagonistas selectivos están el propranolol, el CGP12177 y la butoxamina.

**Receptores  $\beta$ 3-adrenérgicos:** Son receptores que, a través de una proteína Gi y vía PKA afectan a la producción de AMPc, dando como resultado efectos cronotrópicos<sup>153</sup> e inotrópicos positivos, de incremento de la densidad de  $I_{Ca}$  y estimulando la contracción en la aurícula humana<sup>154</sup>, mientras que tienen efectos inotrópicos negativos y producen acortamiento del potencial de acción en el tejido ventricular<sup>155-157</sup>. Así, en tejido auricular sus principales agonistas son la isoprenalina y la adrenalina, mientras sus antagonistas selectivos son SR-58611 y BRL37344<sup>158, 159</sup>.

#### 4.2. Los receptores muscarínico colinérgicos

Son receptores activados por el neurotransmisor acetilcolina. Son los principales receptores colinérgicos en el cerebro. Se conocen cinco subtipos de receptores muscarínicos, de los cuales, el subtipo  $M_2$ , está localizado en el corazón y actúa disminuyendo la frecuencia cardíaca al disminuir la velocidad de despolarización, reduciendo la fuerza contráctil del músculo cardíaco auricular y reduciendo la velocidad de conducción del nodo AV.

El receptor  $M_2$  se acopla con la unidad  $G_i$  intracelular y causa una disminución del AMPc. Además, modula los canales muscarínicos de potasio<sup>160</sup> contribuyendo a la disminución de la frecuencia cardíaca. La acetilcolina actúa como agonista de estos receptores, siendo la atropina su antagonista.



**Figura 26.** Esquema de la regulación neurohormonal de los receptores muscarínico colinérgicos.

### 4.3. Los receptores serotoninérgicos

Estos receptores median los efectos de la serotonina (5-HT) como ligando endógeno y de un amplio rango de drogas sintéticas. Están localizados en la membrana celular, la mayoría de ellos acoplados a una proteína G (excepto 5-HT3).

Se conocen siete familias de receptores serotoninérgicos, además de diferentes subtipos dentro de las mismas (tabla 3).

La función serotoninérgica de 5-HT1 es fundamentalmente inhibitoria sobre AC, a través de proteínas Gi, promoviendo la apertura de canales de potasio y disminuyendo la concentración de calcio intracelular. Los receptores (5-HT4, 5, 6 y 7) activados estimulan la producción de AMPc por la AC. En cambio, los 5-HT2 están acoplados a una proteína G que estimula la fosfolipasa C responsable de la conversión del fosfatidil inositol-4,5-difosfato (PIP2) en inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). Entre las funciones fisiológicas de la serotonina destaca su papel en la sinapsis, la inhibición de la secreción gástrica, la estimulación de la musculatura lisa y la secreción de hormonas por parte de la hipófisis <sup>161</sup>.

En el sistema cardiovascular, la serotonina afecta al funcionamiento vascular y a la tensión arterial, así como a la frecuencia del latido cardiaco, causa contracción del músculo liso a través de los receptores 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>2</sub>. Los receptores 5-HT<sub>4</sub> se expresan en la aurícula humana y de cerdo, afectando a la frecuencia y contracción cardíacas, incluso se han relacionado con la FA<sup>162, 163</sup>. 5-HT<sub>2</sub> es vasodilatador del músculo esquelético y cardíaco y puede desencadenar una bradicardia refleja por activación de los receptores 5-HT<sub>3</sub>.<sup>161</sup>

Receptor	Localización	Modo de acción
5-HT <sub>1A</sub>	núcleos del rafe, hipocampo, neocórtex nervios entéricos	Inhibición de adenilato ciclasa, ↓AMPc, canales de K <sup>+</sup>
5-HT <sub>1B</sub>	sustancia negra, globo pálido, gánlios basales (en roedores)	Inhibición de adenilato ciclasa, ↓AMPc
5-HT <sub>1C</sub>	plexos coroideos, núcleos olfatorios, sustancia negra, etc	Hidrólisis de fosfatidil inositol
5-HT <sub>1D</sub>	cerebro	Inhibición de adenilato ciclasa, ↓AMPc
5-HT <sub>1E, F</sub>	corteza cerebral, putamen	↓AMPc
5-HT <sub>2A, B, C</sub>	neocórtex, núcleo olfatorio, plaquetas, músculo liso, etc.	↑IP <sub>3</sub>
5-HT <sub>3</sub>	área postrema, nervios sensitivos y enéricos	El receptor es un canal iónico de Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup>
5-HT <sub>4</sub>	SNC, neuronas mientéricas, músculo liso, corazón	Estimulación de adenilato ciclasa, ↑AMPc
5-HT <sub>5A, B</sub>	cerebro	desconocido
5-HT <sub>6</sub>	cerebro	↑AMPc
5-HT <sub>7</sub>	cerebro	↑AMPc

**Tabla 3.** Tipos de receptores serotoninérgicos, indicando su localización y mecanismo de acción.

#### 4.4. Los receptores purinérgicos

También se conocen con el nombre de purinoceptores. Están localizados en la membrana celular. Se unen con una alta afinidad a las purinas, la adenosina y sus análogos para los receptores purínicos P<sub>1</sub> y a los nucleótidos (como ATP) para los receptores purínicos P<sub>2</sub>. Entre sus funciones principales están la reactividad vascular, la secreción de citoquinas y la apoptosis.

Los **receptores P<sub>2</sub>** son los receptores del ATP. No tienen efecto sobre el AMPc, aunque en muchos sistemas son capaces de incrementar la síntesis de prostaglandinas. Se clasifican en diferentes subtipos:

- P<sub>2x</sub>. Son canales iónicos operados por ligandos con efecto inotrópico, se activan por ATP, se localizan en el SNC y periférico, el corazón, músculo esquelético y liso, sensibles a cambios de pH y la presencia de metales pesados en el medio<sup>164</sup>.
- P<sub>2y</sub>. Están acoplados a proteínas Gi, tienen efecto metabotrópico, proteínas Gq o proteínas Gs y son estimulados por ATP, ADP, UTP, UDP y UDP-glucosa, se localizan en el SNC y periférico, músculo esquelético y liso)<sup>165</sup>.
- P<sub>2z</sub>. Receptor específico para ATP<sup>4-</sup>, no asociado al Mg<sup>2+</sup>, presente en las células del sistema inmune.<sup>166</sup>
- P<sub>2t</sub>. Su ligando preferente es el ADP. Están presentes en las plaquetas, de hecho, estimulan la agregación plaquetaria<sup>167</sup>. Su activación puede dar lugar a la entrada de iones (fundamentalmente Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>) o la generación de segundos mensajeros (principalmente diacilglicerol e IP<sub>3</sub>).

**Los receptores P<sub>1</sub>**: receptores de adenosina. La adenosina es un nucleósido formado por la unión de la adenina, una base purínica, con una ribosa. Es una purina endógena sintetizada en la degradación de aminoácidos como metionina o valina, así como de ATP y AMP. Tanto la adenosina como sus derivados participan en un gran número de procesos bioquímicos y constituye la principal fuente de energía de la célula en forma de ATP y ADP, además de tener una importante función como transductor de señales como segundo mensajero en forma de AMPc y formando parte de cofactores necesarios en numerosas reacciones REDOX y de Coenzima A, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> S-adenosilmetionina, etc.

Por ejemplo, el AMP es desaminado (irreversiblemente) para formar monofosfato de inosina (IMP) en el músculo esquelético, o defosforilado para formar adenosina en el músculo cardíaco, en situaciones donde el consumo de ATP y la demanda de oxígeno son superiores al aporte de oxígeno (ejercicio, hipoxia, isquemia), elevando así la concentración de adenosina.

La defosforilación del AMP está catalizada por la 5'-nucleotidasa que se localiza tanto en el citosol como en la membrana plasmática. Por tanto, la adenosina puede formarse tanto intracelular como extracelularmente <sup>168</sup>. Existen estudios que sugieren que la adenosina se puede formar en el interior del cardiomiocito por la acción de la 5'-



nucleotidasa citosólica, y ser liberada al medio extracelular, donde interactúa con sus receptores, mediante transportadores de nucleósidos de la membrana plasmática<sup>169, 170</sup>. Por otro lado, la adenosina también puede ser recaptada, mediante inactivación o degradación, limitando su actividad y recuperando los niveles iniciales de nucleótidos en la célula. Existen tres mecanismos de inactivación de la adenosina: la fosforilación intracelular a AMP por la acción de adenosina quinasa, la degradación a inosina por la acción de adenosina desaminasa (ADA, enzima que en la membrana plasmática degrada adenosina extracelular)<sup>171, 172</sup> y la liberación de la adenosina hacia la circulación por difusión facilitada<sup>173</sup>. Se estima que en condiciones de normoxia, las concentraciones en el fluido intersticial son inferiores a 0,5 µM, las concentraciones fisiológicas en sangre se sitúan entre 0,1 y 1 µM<sup>174</sup>, las concentraciones citosólicas de entre 0,04 y 0,1 µM (aunque cerca del 90% de la adenosina citosólica está ligada a proteínas intracelulares).

TEJIDO	EFFECTO FISIOLÓGICO	RECEPTORES
Sistema nervioso central	Inhibición de liberación de neurotransmisores Inhibición de actividad locomotora Sedación Anticonvulsivo	A <sub>1</sub> A <sub>2A</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub>
Sistema cardiovascular	Vasoconstricción Vasodilatación Inhibición de agregación plaquetaria Inhibición de ritmo cardíaco	A <sub>1</sub> A <sub>2A</sub> /A <sub>2B</sub> A <sub>1</sub> /A <sub>3</sub> A <sub>1</sub>
Aparato respiratorio	Broncodilatación Broncoconstricción Modulación de secreción mucosa	A <sub>2A</sub> A <sub>1</sub> ??
Riñón	Antidiurético Descenso del flujo filtración glomerular Modulación de liberación renina Contracción células mesangiales	A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub> A <sub>1</sub> /A <sub>3</sub>
Sistema inmune	Inhibición quimiotaxis (neutrófilos) Inhibición producción superóxidos Función linfocitos T	A <sub>1</sub> A <sub>2A</sub> A <sub>2B</sub>
Hígado	Estimulación captación de glucosa Estimulación glucogenólisis	?? A <sub>2A</sub>
Tejido adiposo	Inhibición lipólisis	A <sub>1</sub>
Aparato reproductor	Testículos Conducto deferente (contracción de musculatura lisa)	A <sub>1</sub> /A <sub>3</sub> A <sub>1</sub> /A <sub>2A</sub>

**Tabla 4.** Efectos fisiológicos de la adenosina mediados por sus receptores de membrana<sup>175</sup>.

La adenosina desempeña un importante papel como modulador a través de receptores acoplados a proteínas G específicos ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ) localizados en la membrana celular de los tejidos de organismos superiores <sup>176</sup>. La activación de los receptores de adenosina tiene numerosos efectos en una variedad de tejidos. La tabla 4 resume la distribución de los diferentes receptores y sus principales efectos fisiológicos.

Los cuatro tipos de receptores de adenosina,  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ , difieren entre sí tanto en su secuencia y características bioquímicas como en su localización y función fisiológica. La tabla 5 resume las principales características bioquímicas de los cuatro subtipos de receptores de adenosina.

Subtipo de receptor	$A_1$	$A_{2A}$	$A_{2B}$	$A_3$
Afinidad	Alta	alta	baja	baja
Proteína G asociada	$G_i$	$G_s$	$G_s$	$G_i$
Localización	SNC, corazón, testículos, adipocitos	SNC, corazón, pulmón, hígado, adipositos, vejiga, testículos, intestino, riñón, etc.	cerebro, intestino, vejiga, pulmón, etc.	pulmón, hígado, riñón, testículos, placenta, corazón, cerebro, vejiga, etc.
Efectores acoplados	inhibe AMPc inhibe G del $Ca^{2+}$ estimula G del $K^+$ $\Delta IP_3$	estimula AMPc	estimula AMPc $\Delta [Ca^{2+}]$ $\Delta IP_3$	Inhibe AMPc $\Delta IP_3$ $\Delta [Ca^{2+}]$
Agonistas selectivos	CPA CCPA CHA R-PIA	CGS 21680 APEC CV 1808 DPMA	NECA CCPA	HEMADO 2-CI-IB-MECA IB-MECA
Antagonistas selectivos	CPCPX XAC KW-3902 ENX KFM 19 N 0861 FK 453 WRC 0571	KF 17837 ZM 241385 CSC SCH 58261	MRS 1754 XAC CGS 15943 DPCPX MRE3008F20	MRS 1220 VUF 5574 MRS 1334

**Tabla 5.** Clasificación de los receptores de adenosina, sus ligandos, localización y sistemas efectores <sup>177</sup>. Las abreviaturas de agonistas y antagonistas son las que siguen: 2-cloro-CPA (CCPA);  $N^6$ -cicohexiladenosina (CHA);  $N^6$ -ciclopentiladenosina (CPA); 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX); 1,3-dipropil-8-[2-(5,6-epoxi)norbornil]-xantina (ENX); (+)(R) -[(E) -3-(2-fenilpirazolol[1,5- $\alpha$ ]piridin-3-il)acrilolil]-2-piperidina etanol (FK 453); [( $\pm$ )-8-(3-oxociclopentil)-1,3-dipropilxantina] (KFM 19); 8-noradamant-3-il-1,3-dipropilxantina (KW 3902);

1,3-dipropil-8-[2,(5,6-epoxi)norbornil]xantina (N 0861); (R) $N^6$ -fenilisopropiladenosina (R-PIA); 8-(N-metilisopropil)amino- $N^6$ -(5'-endohidroxi-endonorbortil)-9-metiladenina (WRC 0571); 8(4-[[[(2-aminoetil)amino]carbonil]metil]-oxi]fenil)-1,3-dipropilxantina (XAC); 2-[p-(2-carboxietil)feniletilamino]-5'-N-etilcarboxamidoadenosina (CGS 21680); 2-(1-Hexyn-1-il)adenosina-5'-N-etiluronamida, 2-Hexinil-5'-etilcarboxamidoadenosina (HE-NECA); 2-[(2-aminoetilamino)carbonyletilfeniletilamino]-5'-N-etilcarboxamidoadenosina (APEC); 2-fenilaminoadenosina (CV 1808);  $N_6$ -(2(3,5-dimetoxifenil)-2-12-metilfenil)etil-adenosina (DPMA); N-11C-Metil (KF 17837); 4-(2-[7-amino-2]-2-furil(triazolo { 2,3-a}-[1,3,5]triazin5-ilamino)etil)fenol (ZM 241385); 8-(-3-clorostiril)-cafeina (CSC); 5-amino-7-(feniletil)-2-(1-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (SCH 58261); N-(4-cianofenil)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahidro-2,6-dioxo-1,3-dipropil-1H-purin-8-il)-fenoxi]acetamida (MRS 1754); 9-Cloro-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolin-5-amina (CGS 15943); (MRE3008F20); 2-(1-Hexinil)-N-metiladenosina (HEMADO); 1-[2-Cloro-6-[[[3-iodofenil]metil]amino]-9H-purin-9-il]-1-deoxi-N-metil-b-D-ribofuranuronamida (2-Cl-IB-MECA); N-[9-Cloro-2-(2-furanil)[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolin-5-il]benzenoacetamida (MRS 1220); N-(2-metoxifenil)-N'-[2-(3-piridinil)-4-quinazolinil]-urea (VUF 5574); 1,4-dihidro-2-metil-6-fenil-4-(feniletinil)-3,5-piridinedicarboxilic acid 3-etil-5-[[3-nitrofenil]metil]éster (MRS 1334).

En el corazón, el receptor de adenosina  $A_1$  se encuentran en cardiomiocitos acoplado a sus sistemas efectoras, canales iónicos y adenilato ciclasa, a través de una proteína  $G_i$  <sup>178</sup>. La activación de esta proteína  $G_i$  implica la apertura de los canales de potasio específicos ( $K_{A_{do}}$  y  $K_{A_{ch}}$ ) y la inhibición de la producción de AMPc por la adenilato ciclasa <sup>179</sup> si la síntesis del mismo se encuentra estimulada. Es decir, que la adenosina, a través del receptor  $A_1$ , puede antagonizar la estimulación dependiente de AMPc de los canales de calcio tipo-L, entre otros. Además, adenosina, a través de este receptor, activa los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ), hecho por el que se usa en farmacología para la isquemia miocárdica y en tejidos ventriculares <sup>180</sup>. El efecto protector de la adenosina en el corazón, causado por este receptor, en situaciones de preconditionamiento e isquemia, es un hecho ampliamente estudiado <sup>181-183</sup>.

La activación de los receptores de adenosina  $A_1$  también revierte la fosforilación inducida por estimulación  $\beta$ -adrenérgica <sup>184</sup> puesto que inhibe la acumulación de AMPc y la activación de la PKA. De este modo, la activación del receptor de adenosina  $A_1$  tendría un efecto anti-adrenérgico.

Por el contrario, los receptores de adenosina  $A_2$  estimulan la producción de AMPc por la adenilato ciclasa. Se clasifican en dos subtipos  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ , los dos presentes en cardiomiocitos <sup>138, 185, 186</sup>. Los dos subtipos se encuentran acoplados a la adenilato ciclasa a través de una proteína  $G_s$ . Su activación induce una estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa incrementando la concentración intracelular de AMPc. En todo caso, los dos subtipos pueden afectar a las corrientes de calcio, de forma dependiente o

independiente de los niveles de AMPc. Se han descrito efectos totalmente opuestos de la activación de los A<sub>2A</sub>R a los efectos anti-adrenérgicos de los receptores A<sub>1</sub> en corazón de rata <sup>187</sup>. Sin embargo, el agonista más selectivo para los receptores, CGS 21680, produce un incremento de AMPc sin tener un efecto inotrópico en el músculo cardíaco, lo que sugiere que puede existir una compartimentación de los efectos de los A<sub>2A</sub>R <sup>188</sup>.

Existe cierta controversia acerca de los efectos de los A<sub>2A</sub>R sobre el calcio intracelular. De manera generalizada, se había asociado a estos receptores a una disminución de la concentración del calcio intracelular. Sin embargo, estudios recientes de nuestro laboratorio demuestran que los A<sub>2A</sub>R se expresan en cardiomiocitos auriculares humanos y que su activación se asocia a un aumento en la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR <sup>138</sup>.

Algo parecido pasa en el caso de los receptores de adenosina A<sub>2B</sub>. Existen numerosos estudios que asocian estos receptores a un incremento en la concentración intracelular de calcio <sup>189 190</sup>. Pero existen estudios que muestran que los receptores A<sub>2B</sub> de las células cromafines pueden inhibir la entrada de calcio al interior de la célula mediante la activación de una proteína fosfatasa citosólica no sensible a AMPc, que actuaría directamente sobre los canales de calcio tipo-L <sup>191</sup>. También existen estudios que relacionan la activación de los A<sub>2A</sub>R con la activación de los canales de potasio <sup>192</sup>.

En el sistema vascular, tanto los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> como los A<sub>2B</sub> se asocian a un efecto vasodilatador <sup>193, 194</sup>. Hasta la fecha, este es el efecto más importante asociado a los A<sub>2A</sub>R.

Los receptores de adenosina A<sub>3</sub> inhiben la actividad de la adenilato ciclasa y/o estimula la producción de inosítoles trifosfato, además de incrementar la actividad fosfatasa C <sup>195</sup>. Se encuentran ampliamente distribuidos <sup>195-197</sup>. En tejidos humanos se han encontrado elevados niveles de expresión de mRNA en hígado y pulmón <sup>195</sup>. La activación de estos receptores en cardiomiocitos implica la activación del sistema antioxidante de defensa celular, mediando un efecto citoprotector de la adenosina durante situaciones de isquemia <sup>198</sup>. En el sistema vascular, se asocian a un efecto vasoconstrictor.

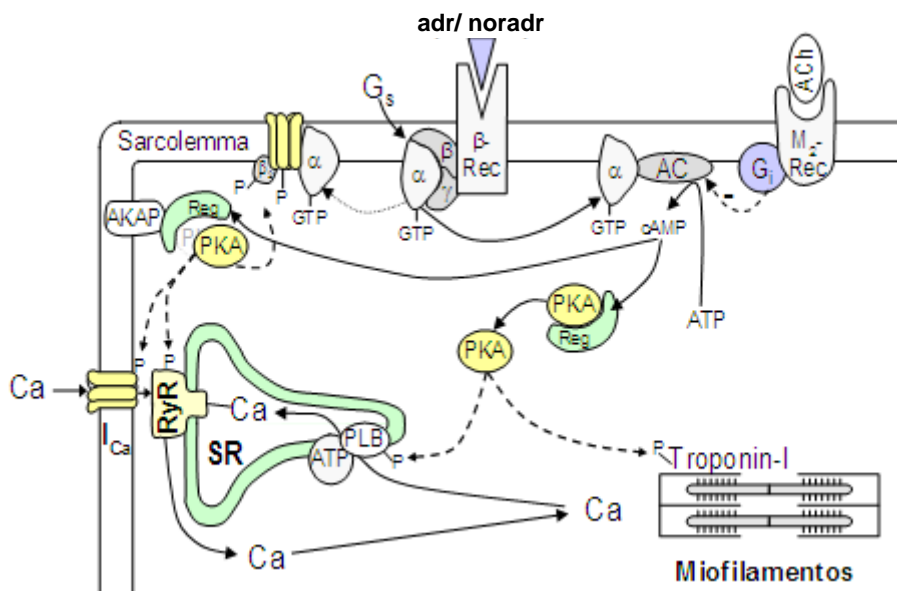
#### **4.5. Regulación neurohormonal del calcio intracelular en cardiomiocitos**

La función cardiovascular está regulada por el sistema nervioso simpático (SNS) y el parasimpático (SNP). El corazón posee una importante inervación simpática, que produce la mayor parte de la noradrenalina necesaria. La médula suprarrenal también produce noradrenalina, aunque sobretudo adrenalina. La noradrenalina queda almacenada en

gránulos en la pre-sinapsis. Ante un estímulo, la noradrenalina se libera y se liga al receptor ubicado en la membrana celular. Los receptores adrenérgicos, purinérgicos y muscarínicos colinérgicos son el primer escalón en la señalización celular.

Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos pueden causar un incremento en la concentración intracelular de AMPc que actúa como segundo mensajero, activando la proteína kinasa A (PKA) que a su vez fosforila:

- los canales de calcio tipo-L, promoviendo la entrada de calcio en la célula a través de estos canales, aumentando la entrada de calcio en la célula a través de estos canales. El efecto de PKA puede incrementar de entre 2 a 4 veces la  $I_{Ca}$  basal<sup>199</sup>, lo que potencia el mecanismo de CICR,
- los RyR, promoviendo la liberación de calcio del SR y la activación de las proteínas contráctiles.
- troponina I y PLB (que regula la actividad de SERCA), facilitando la relajación.



**Figura 27.** Esquema de los mecanismos de activación de los canales de calcio por estimulación  $\beta$ -adrenérgica. Por un lado, la estimulación de adenilato ciclasa (AC) que incrementa la concentración de AMPc y vía proteína kinasa A (PKA), se fosforilan los canales de calcio tipo-L, los receptores de rianodina o RyRs, fosfolambana (PLB) de SERCA y Troponina I. El esquema también muestra la vía de acción directa sobre las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G<sub>s</sub> en el canal de calcio, aunque esta es una vía minoritaria. Además, se puede observar que la activación de los receptores muscarínicos (M<sub>2</sub>) por acetilcolina (ACh) tendría un efecto inhibitorio sobre la producción de AMPc a través de una proteína G<sub>i</sub>.<sup>15</sup>

La activación de los receptores de adenosina A<sub>2</sub> también aumenta la concentración de AMPc, y podrían tener efectos parecidos a la estimulación beta-adrenérgica. Resultados

previos de nuestro laboratorio han confirmado la presencia de los A<sub>2A</sub>R en miocitos auriculares humanos y su participación en la modulación de la concentración de calcio intracelular<sup>138</sup>.

Por otro lado, la activación de las fibras musculares cardíacas por el SNS se contrarresta con la actividad vagal muscarínica que puede inhibir el efecto adrenérgico y la activación de los A<sub>2A</sub>R, inhibiendo la producción de AMPc y revirtiendo la fosforilación por activación de la PKA. El ligando de los receptores muscarínicos inhibiendo AC por el SNP es la acetilcolina (ACh). En miocitos ventriculares ACh no tiene efecto en la I<sub>Ca</sub> basal, pero antagoniza el efecto estimulador de las catecolaminas o de foskolin<sup>200</sup>. Además, ACh incrementa GMPc el cual puede disminuir AMPc a través de la fosfodiesterasa PDE-II en rana<sup>201</sup>. Entre el SNS y el SNP se controlan las funciones lusitrópicas (relajación), inotrópicas (contractilidad) y cronotrópicas (ritmo) del corazón.

Así, un agonista β-adrenérgico tendría un efecto parecido a la activación del SNS, generando vasoconstricción y aumento de la frecuencia cardíaca y de la contractilidad miocárdica.

Los receptores adrenérgicos pueden cambiar su conformación, su número y su afinidad a la sustancia transmisora<sup>202</sup> por un proceso de autorregulación que evita daños provocados por excesos en cantidad o frecuencia del estímulo transmisor. Esta disminución de la afinidad puede deberse a la fosforilación del receptor por PKA, que implicaría la inhibición del mismo, de manera que cuando se ha transmitido el estímulo y se ha activado la AC, incrementando la concentración de AMPc y activando PKA, la misma PKA puede fosforilar el receptor inhibiendo así la señalización.

## **5. Arritmogénesis auricular y regulación del calcio intracelular**

Anteriormente en esta tesis, hemos descrito el papel que tienen tanto el calcio que entra vía canales de calcio tipo-L a través de la membrana plasmática, como el calcio liberado por el SR, en la activación de la contracción. Sin embargo, existen también condiciones fisiopatológicas donde alteraciones en la regulación del calcio contribuyen a la inducción y la perpetuación de arritmias cardíacas y fibrilación auricular, y el objetivo de esta tesis es dilucidar nuevos mecanismos celulares que conducen a alteraciones en la regulación del calcio intracelular asociado a la fibrilación auricular.

## 5.1. Mecanismos de arritmogénesis

Existen diferentes mecanismos por los que se producen irregularidades en el ritmo cardíaco: la automaticidad anormal, la actividad repetitiva (triggered activity), mecanismos de reentrada y desordenes de conducción (los desordenes de conducción suelen estar asociados a mecanismos de reentrada).

A continuación se describen los principales mecanismos que pueden inducir y/o facilitar el mantenimiento de las arritmias en general y la fibrilación auricular en particular.

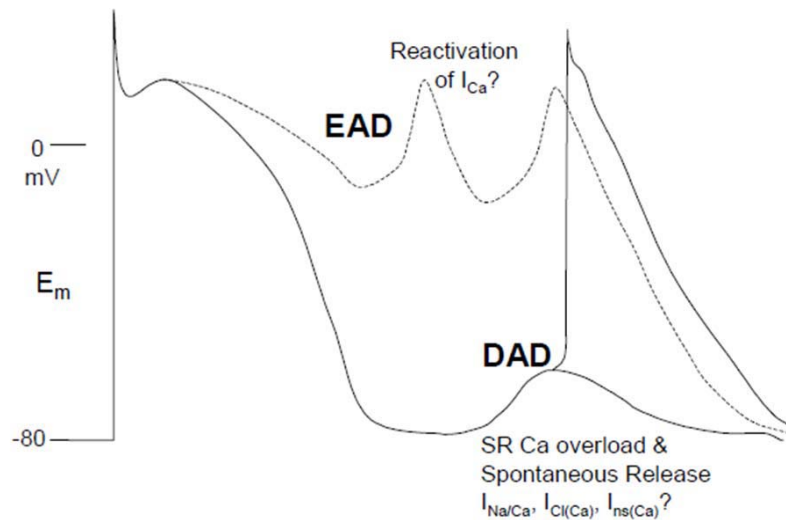
### 5.1.1. Automaticidad anormal

Se podría considerar que hay tres tipos de cardiomiocitos: los que generan el pulso eléctrico, los que lo conducen y los que efectúan la contracción. Se denomina automaticidad a la capacidad de una célula para despolarizarse espontáneamente, alcanzar el umbral de despolarización e iniciar un AP. Las células de los nodos SA y AV poseen esta propiedad. Se denomina automaticidad anormal a la actividad marcapasos espontánea y anormal de las células de conducción, o a la despolarización espontánea en fibras sin esta propiedad de automaticidad. Este segundo caso suele producirse en las células de regiones cercanas al nodo SA, en la aurícula, o nodo AV (las válvulas) y el sistema de His-Purkinje <sup>15</sup>. Así, estas células funcionan como *pacemaker* secundarias o latentes, de manera que pueden competir con la actividad marcapasos primaria generando ritmos anormales en el tejido auricular, provocando arritmias auriculares<sup>203</sup>.

Pero las células cardíacas que generan el impulso eléctrico, o *pacemakers*, también pueden presentar despolarizaciones espontáneas anormales. De hecho, existe una relación entre los latidos rítmicos pero anormales originados en el nodo SA y las liberaciones espontáneas de calcio locales del SR de estas células, de manera que ambas despolarizaciones, tanto estas liberaciones espontáneas (*Ca sparks*) controladas por el grado de fosforilación del RyR, como el nivel basal de latido de la célula *pacemaker*, acaban determinando un ritmo oscilatorio marcapasos <sup>204, 205</sup>.

### 5.1.2. Actividad repetitiva

La actividad repetitiva o desencadenada se debe a oscilaciones en el voltaje inducidas por APs aberrantes pro-arrítmicos y es la mayor responsable de arritmias en casos de insuficiencia cardíaca. Existen dos tipos de APs que favorecen la actividad repetitiva: post-despolarizaciones tempranas (early afterdepolarizations, EADs) y post-despolarizaciones tardías (delayed afterdepolarizations, DADs) <sup>2</sup>.



**Figura 28.** Post-despolarizaciones en cardiomiocitos. El esquema muestra las diferencias entre post-despolarizaciones tempranas (EAD) y tardías (DAD) y sus posibles mecanismos subyacentes<sup>15</sup>.

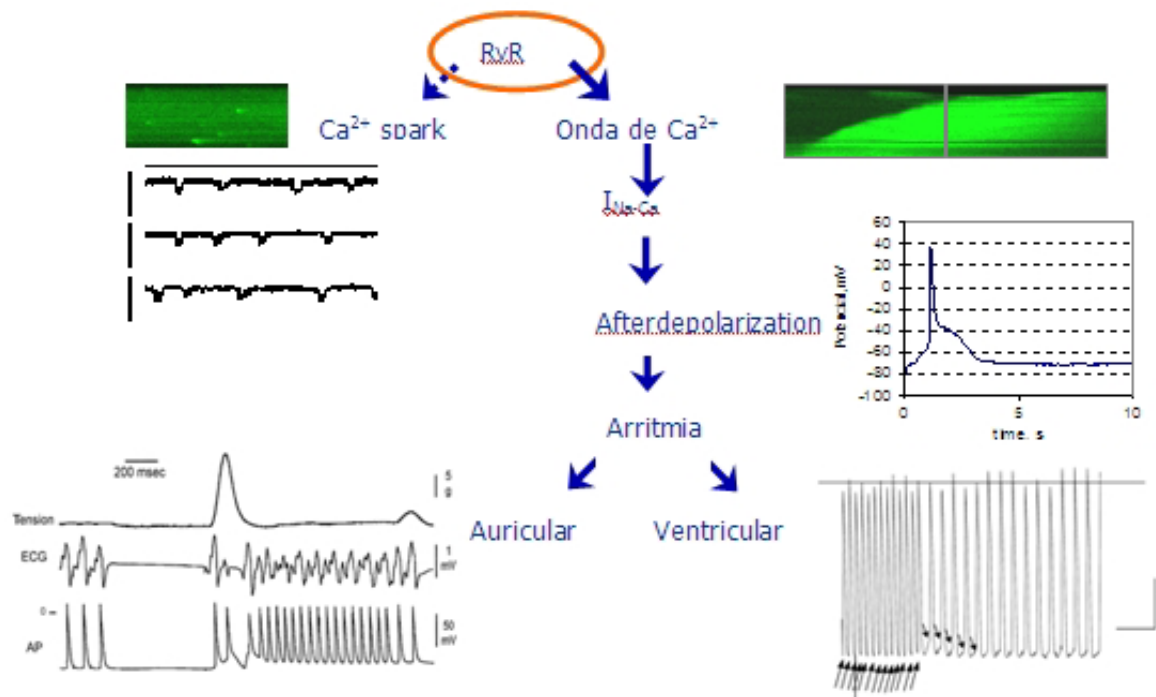
Las EADs dependen de la prolongación de la duración de AP, lo que lleva a que se produzcan APs repetitivos en la fase de meseta. Estas post-despolarizaciones están favorecidas por bradicardia, por la inhibición parcial de los canales de potasio, o por un aumento de las corrientes de entrada de calcio durante la meseta. Pueden ocurrir a consecuencia de la hipokalemia (que reduce las corrientes de salida  $I_{K1}$  y  $I_{Kr}$ ), de la administración de fármacos (bloqueadores de canales de K) o de defectos hereditarios que afecten a los canales de sodio y de potasio <sup>207-209</sup>.

Las DADs son despolarizaciones secundarias que se originan cuando la membrana está completamente repolarizada. Se producen bajo condiciones de sobrecarga de calcio celular y del contenido de calcio del SR <sup>210</sup>. Si la concentración de calcio intracelular y el contenido de calcio del SR son muy elevados, aumenta la probabilidad de que se produzcan liberaciones espontáneas de calcio del SR, elevando aun más la concentración intracelular de calcio y activando las corrientes dependientes de calcio. La estimulación  $\beta$ -adrenérgica por antagonistas también puede estimular las corrientes de calcio tipo-L y las liberaciones



de calcio del SR, incrementando la probabilidad de que se produzcan DADs<sup>211</sup>. En cambio, rianodina bloquea las post-despolarizaciones tardías, por lo que algunos grupos estudian la posibilidad de que este trastorno tenga una base genética relacionada con los RyR2<sup>212</sup>, o con los canales de calcio que modulan las liberaciones espontáneas de calcio del SR a través de los receptores de rianodina<sup>138</sup>.

Básicamente, cuando hablamos de actividad repetitiva, hablamos de despolarizaciones anormales. Una despolarización anormal se produce cuando el calcio se libera de forma espontánea del SR<sup>3-5</sup> dando lugar a una onda de calcio que se extiende por el citosol de la célula. Parte del calcio liberado se reaccumula en el SR, pero otra parte se expulsa del miocito por el NCX dando lugar a una despolarización anormal<sup>3, 6</sup> (figura 29) que puede inducir actividad repetitiva<sup>1</sup>.



**Figura 29.** Esquema de arritmogénesis por despolarizaciones anormales producidas por liberaciones espontáneas de calcio del SR.

En condiciones normales de reposo, se producen liberaciones locales de calcio del SR, dando lugar a incrementos locales de calcio conocidos como *Ca sparks*<sup>35</sup>. En condiciones patológicas, la frecuencia de *Ca sparks* puede aumentar<sup>3, 203, 213, 214</sup> y producir una liberación regenerativa que se propaga como una onda a lo largo de la célula (*Ca wave*)<sup>136</sup>.

Las células con actividad repetitiva pueden convertirse en focos ectópicos, donde despolarizaciones espontáneas inducen actividad repetitiva que genera una actividad eléctrica caótica con múltiples frentes de onda en el tejido, favoreciendo la variabilidad en el ritmo de la frecuencia cardíaca y la inducción de arritmias.

Existen cuatro tipos de focos ectópicos:

- De origen auricular. Relacionados con contracciones auriculares prematuras, taquicardia auricular paroxística, taquicardia auricular multifocal, flutter auricular y fibrilación auricular (FA).
- Originados en la unión aurículo-ventricular. Relacionados con contracciones prematuras de la unión y taquicardia de la unión.
- De origen ventricular. Relacionados con contracciones ventriculares prematuras, taquicardia ventricular, flutter ventricular y fibrilación ventricular.
- Originados en las venas pulmonares, afectando al ritmo contráctil de las aurículas.

Es de este modo, que mecanismos que intervienen en la homeostasis del calcio y que promueven la liberación espontánea de calcio del SR, favorecen la inducción de arritmias por actividad repetitiva. En este sentido, nuestro laboratorio ha descrito un aumento en la frecuencia de *Ca sparks* y ondas de calcio asociado a la fibrilación auricular (FA) <sup>3</sup>. Además, resultados recientes de nuestro grupo muestran que la liberación espontánea de calcio del SR se modula por  $A_{2A}R$  <sup>138</sup>. En esta tesis se estudia la hipótesis de que la incidencia anormalmente elevada de liberaciones espontáneas de calcio del SR observada en células de pacientes con FA, está vinculada al remodelado de los  $A_{2A}R$  en la aurícula.

### **5.1.3. Mecanismos de reentrada**

También hay arritmias producidas por mecanismos de reentrada (acompañados de cambios estructurales). La reentrada se debe a una alteración en la propagación del estímulo o impulso. Así, hay un frente de excitación que activa las células del tejido cardíaco propagando la señal a través del tejido por cada estímulo. Cuando este estímulo se ha extinguido y ha pasado el período refractario el siguiente impulso genera otro frente de excitación. Sin embargo, si el primer estímulo encuentra un obstáculo por el que no se puede propagar, la señal eléctrica intenta sortear este obstáculo produciéndose una conducción anormal del estímulo a través del tejido. Este fenómeno constituye la reentrada. La reentrada implica una conducción retrógrada del impulso sobre un punto concreto en el tejido (por causas anatómicas o funcionales) en el que se produce un bloqueo unidireccional porque los canales en esa parte acaban de ser activados y aun se

encuentran en período refractario. Así el estímulo vuelve atrás a través de una porción del tejido cardíaco que puede ser excitado de nuevo (por este primer estímulo), generándose una reentrada donde el impulso no se extingue si no que recircula, la onda vuelve atrás excitando un tejido ya excitado pero que ya ha pasado el período refractario, formando un movimiento circular del impulso (ondas en espiral) y generando un ciclo continuo de estimulación alrededor del obstáculo.

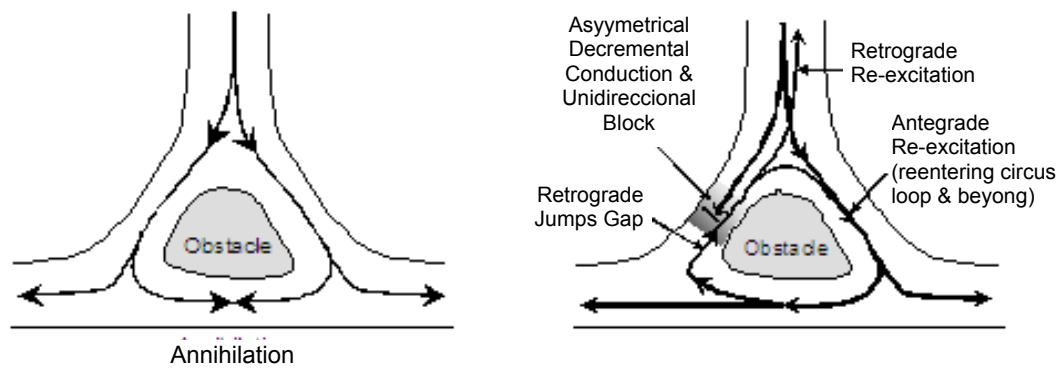


Figura 30. Mecanismo de reentrada en el tejido cardíaco. Modelo clásico de reentrada alrededor de una región anatómica<sup>15</sup>.

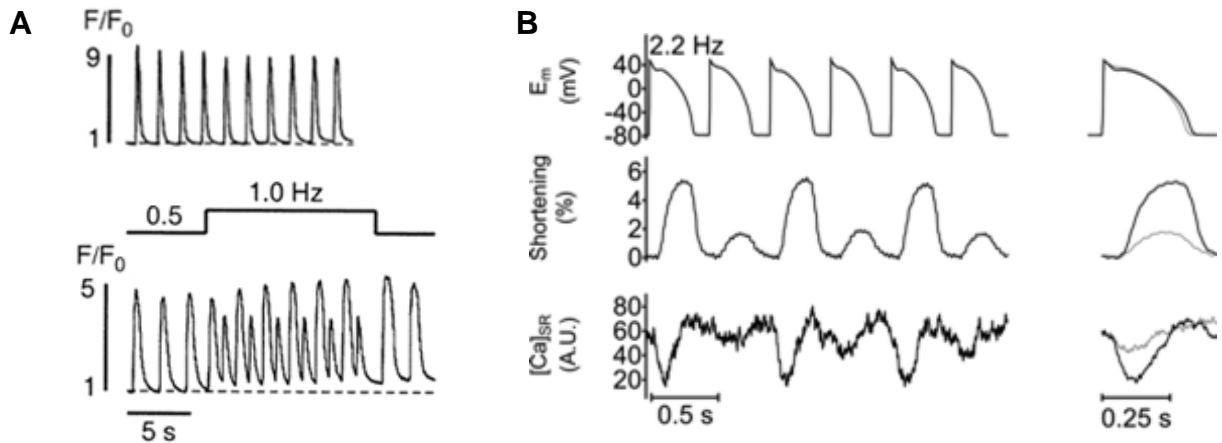
Es decir, cuando un frente de estímulo desciende por una fibra de Purkinje y encuentra una zona de bloqueo, existe la posibilidad de que alcance el músculo cardíaco por una vía alternativa. Si la vía normal ha recobrado la excitabilidad, el estímulo retrógrado la reexcitaría y daría lugar a un impulso ectópico. Si éste repite el ciclo se produce un movimiento circular o reentrada.

Se pueden generar por este sistema varios frentes de ondas en espiral por todo el tejido cardíaco causando despolarizaciones y contracciones caóticas y generando arritmias. Las taquicardias supraventriculares, el flutter auricular y la fibrilación auricular son arritmias mantenidas por reentrada.

## 5.2. Alternancia electro-mecánica

Normalmente los nodos SA y AV regulan el ritmo cardíaco, sin embargo, existen condiciones fisiológicas y patológicas en las que la regulación del calcio intracelular de los miocitos auriculares o ventriculares interviene en la regulación del ritmo cardíaco<sup>215</sup>. Así, existen situaciones donde los mecanismos que intervienen en la regulación del calcio de latido en latido no son capaces de seguir la frecuencia de latido que establecen las células

marcapasos. Por ejemplo, si la frecuencia es demasiado elevada <sup>22, 23</sup>, los mecanismos que regulan el calcio no tienen tiempo de volver al estado original de reposo antes del siguiente latido <sup>214, 216</sup>, resultando en alternancia o irregularidades en la dinámica del calcio latido-latido a frecuencias elevadas <sup>8, 217, 218</sup> (figura 31). Esta perturbación de la dinámica del calcio produce subsecuentes perturbaciones en las corrientes iónicas y la contracción.



**Figura 31.** El aumento de la frecuencia de estimulación causa alternancia. A. En miocitos auriculares de gato, bajo condiciones control, los aumentos en la concentración de calcio intracelular con cada estimulación son uniformes (arriba). Sin embargo, al incrementar la frecuencia de estimulación de 0.5 a 1 Hz, presentan alternancia (abajo). Figura extraída de Kockskämper *et al.* 2002. B. Alternancia electromecánica, en el AP y el acortamiento en la contracción, y de la concentración de calcio en miocitos ventriculares de conejo, inducida por current-clamp. Figura extraída de Picht *et al.* 2006.

En el hombre se ha descrito la alternancia eléctrica y mecánica y se ha asociado este fenómeno a la regulación del calcio <sup>219-221</sup>. En modelos animales se ha observado que la reducción de I<sub>Ca</sub> induce alternancia en el calcio causada por alternancia en el calcio liberado del SR <sup>173, 174, 178, 222</sup>. También se puede inducir mediante inhibición metabólica <sup>223</sup> o incrementando la frecuencia de estimulación <sup>173, 182</sup>. La alternancia del calcio intracelular se ha investigado en diversos modelos animales <sup>8, 213, 224, 225</sup>. Pero se desconoce la relación entre la alternancia y la regulación del calcio intracelular en cardiomiocitos humanos. Además, hay estudios que sugieren que en aurícula humana la alternancia electromecánica podría preceder e inducir FA <sup>7</sup>. Esta tesis pretende dilucidar cómo las alteraciones en la dinámica del calcio intracelular, más concretamente, las alteraciones en la amplitud de I<sub>Ca</sub> y la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR, afectan a la respuesta latido-latido a frecuencias de estimulación crecientes. Además, puesto que hay estudios que relacionan las liberaciones espontáneas de calcio del SR con la FA <sup>3</sup>, probablemente por la

fosforilación RyR<sup>226</sup> y que la activación de los A<sub>2A</sub>R induce liberaciones espontáneas de calcio del SR<sup>138</sup>, en esta tesis también hemos investigado la hipótesis de que la activación de los A<sub>2A</sub>R favorezca la inducción de las respuestas latido-latido no regulares y que eso sucede con mayor facilidad en pacientes con FA.

La FA es la arritmia cardíaca más prevalente y se espera que su impacto aumente en los próximos años<sup>227</sup>. Por el momento, el tratamiento para la FA pasa por el uso de antiarrítmicos que la revierten a ritmo sinusal. El problema es que al menos un 50% de los pacientes presentan una recaída en un período inferior a un año. Además algunos de los fármacos actualmente utilizados para tratar FA pueden tener efectos proarrítmicos a largo plazo<sup>222, 228</sup>.

Una de las nuevas pautas de tratamiento de la FA es la técnica ablativa de los focos ectópicos, aunque solo se utiliza en un grupo de pacientes seleccionado<sup>223, 229</sup>. La ablación se basa en la teoría de que, debido a los mecanismos electrofisiológicos endógenos de la FA, se puede curar esta arritmia con la abolición de focos ectópicos y la modificación de las variables electrofisiológicas, alargando los períodos refractarios acortados, aumentando la velocidad de conducción disminuidas y reduciendo la masa de tejido auricular excitable<sup>230</sup>. Pero los procedimientos ablativos en la FA conllevan riesgos y complicaciones como taponamiento cardíaco, estenosis de las venas pulmonares, fístulas atrio-esofágicas, trombo-embolismos y arritmias.

Por ello, es de gran importancia mejorar los conocimientos sobre las alteraciones moleculares y celulares que conducen a arritmias e identificar nuevas dianas terapéuticas contra la aparición y el mantenimiento de la FA.

#### **IV. OBJETIVOS**

---



Es conocido que la FA es una arritmia que tiende a autoperpetuarse, incrementando la probabilidad de recurrencia de los pacientes con esta arritmia, pasando de FA paroxística a FA permanente, debido al progresivo remodelado eléctrico y estructural en las aurículas<sup>231</sup>. Partiendo de ello y de los antecedentes presentados en la introducción, esta tesis pretende mejorar los conocimientos sobre las alteraciones moleculares y celulares que conducen a la FA. Para ello, se plantea investigar el papel de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> en la regulación del calcio intracelular en miocitos auriculares humanos, y comprobar si existe un remodelado funcional de estos receptores en miocitos auriculares de pacientes con FA. Con este fin, se han aplicado técnicas electrofisiológicas cuantitativas a miocitos auriculares humanos aislados de pacientes con y sin FA.

La tesis se ha estructurado en tres sub-estudios cuyos objetivos son:

- 1 Indagar en las alteraciones fisiopatológicas de la expresión de los A<sub>2A</sub>R en pacientes con FA e investigar sus efectos sobre los mecanismos reguladores de la dinámica del calcio intracelular en miocitos auriculares de pacientes con FA. Específicamente, este sub-estudio pretendía determinar la expresión del A<sub>2A</sub>R en pacientes con y sin FA y manipular farmacológicamente el A<sub>2A</sub>R, para investigar si la FA se asocia a cambios en la liberación espontánea de calcio mediados por el A<sub>2A</sub>R.
- 2 Puesto que la alternancia electro-mecánica es un fenómeno que puede preceder a la FA y que este fenómeno se asocia a la alternancia en el calcio intracelular, el segundo objetivo de esta tesis pretendía dilucidar mecanismos celulares que determinen la naturaleza de la respuesta del calcio intracelular latido-latido a frecuencias de estimulación crecientes. Concretamente, se planteaba determinar si existe una relación entre el patrón de respuesta y la amplitud de la I<sub>Ca</sub>, el contenido de calcio del SR, o la frecuencia de la liberación espontánea de calcio del SR en reposo.
- 3 Como objetivo final de esta tesis, se propuso comprobar si los A<sub>2A</sub>R modulan el patrón de respuesta a frecuencias crecientes de estimulación y comprobar si existen diferencias entre cardiomiocitos aislados de pacientes con y sin fibrilación auricular.

En resumen, el objetivo principal de esta tesis fue comprobar el posible uso terapéutico de los A<sub>2A</sub>R como una nueva diana farmacológica en el tratamiento de arritmias auriculares y, más concretamente, en el tratamiento de la fibrilación auricular.





## V. MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 1. Caracterización clínica/ Obtención de tejido auricular humano

Las muestras de tejido auricular provienen de la orejuela auricular derecha. Para este estudio se han utilizado muestras de dos grupos de pacientes:

- pacientes en ritmo sinusal (RS) sin antecedentes de fibrilación auricular.
- pacientes con una historia de fibrilación auricular (FA).

Los pacientes que han recibido tratamiento con antagonistas del calcio han sido excluidos del estudio.

La muestra de tejido se extrae previamente a la canulación, que se realiza a través de la orejuela auricular derecha, para una operación que requiera circulación extracorpórea, en pacientes intervenidos en la Unidad de Cardiología y Cirugía Cardíaca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. El protocolo ha sido aprobado por el comité ético del Hospital.

## 2. Electroforesis en gel e inmunoblotting

Las muestras de tejido humano se homogeneizaron con un homogenizador Polytron (Kinematica, Switzerland) utilizando un rotor PTA 7K, fijado a 5, 10 pulsos de 10 segundos cada uno en 6 volúmenes de 30mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.0) que contenían 5 mM EDTA, 300 mM sucrosa, 40 mM NaF, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PAO, 0.5 mM ortovanadato y un cocktail de inhibidores de proteasas. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron a 16100 g durante 20 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y los pellets se lavaron en el buffer y se solubilizaron en 50 mM Tris/HCl (pH 7.4) que contenía 2% SDS, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PAO, 0.5 mM ortovanadato a un cocktail de inhibidores de proteasas durante 30 minutos a 0°C. Se extrajo la fracción insoluble centrifugando a 16100 g durante 20 min.

Las células HEK-293 crecieron en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, SigmaAldrich Chemical Co.). Se transfectaron con DNA codificante para los  $\text{A}_{2A}\text{R}$  humanos por precipitación con fosfato cálcico. Las células fueron cultivadas o 24 o 48 horas después de la transfección y se obtuvieron las membranas resuspendidas como se ha descrito anteriormente<sup>232, 233</sup>. Se determinó la concentración en proteína del sobrenadante utilizando un *detergent compatible protein assay kit* (Pierce Chemical Co.).

Las muestras se trataron con un tampón que contenía 2-mercaptoetanol (un agente reductor) y SDS (un agente desnaturizante). Se analiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS en exceso (SDS-PAGE, 125mM Tris/HCl, 20% glycerol,

4% SDS, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol y 0,001% azul de bromofenol) en geles del 10% para A<sub>2A</sub>R o geles del 6 % para RyR2. Las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF a 250 mA durante 3 horas a 4°C usando sistema de transferencia húmedo, seguido de la incubación con anti-A<sub>2A</sub>R (1:2000 rabbit polyclonal PA1-042, Affinity BioReagents,) o con anti-RyR2 (1:2000, Calbiochem) y anti-phospho RyR2 (1:5000, ser-2808, Badrilla). Las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-mouse (1:5000, Dako) o anti-rabbit (1:30000, Pierce) conjugado con peroxidasa de rábano. Las bandas inmunoreactivas se desarrollan utilizando un kit de detección química luminiscente (SuperSignal, West Pico Chemiluminiscent substrate, Pierce Chemical Co).

### 3. Extracción de RNA y cuantificación por PCR a tiempo real

Para la extracción de RNA, una vez se obtiene la muestra de tejido tras su disección, se congela directamente a -80°C. Para observar si la estimulación de los A<sub>2A</sub>R afecta a la fosforilación de los receptores de rianodina en Ser-2808, cada muestra de tejido auricular humano se dividió en tres piezas que fueron incubadas durante 20 min en soluciones oxigenadas: control, con el agonista selectivo de A<sub>2A</sub>R (200 nM, CGS21680) y con isoproterenol como control positivo (1  $\mu$ M), todas ellas con inhibidores de proteasas. A continuación las muestras se congelaron y almacenaron a -80°C. El RNA total se aisló de las muestras de tejido auricular humano usando un kit comercial de extracción de *RNA total QuickPrep* (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se amplificó el cDNA utilizando Taq DNA polimerasa y *primers* para humanos de gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GADH), FGAPDH (5'-GCGGGGCTCTCCAGAACATCAT-3'), RGAPDH (5'-GGTGGTCCAGGGGTCTTACTCC-3') y el A<sub>2A</sub>R humano (hA2A), FhA2A (5'-GGCTGCCCTACACATCATCAACT-3') and RhA2A (5'-TGGGCCAGGGGGTTCATCT-3').

Se realizó la PCR a tiempo real en placas de 96 pocillos recogiendo los datos con el ABI Prism 7000 Sequence Detection System (ABI) y analizándolos con el ABI-software. Se hizo la transcripción reversa en dos-pasos seguida de PCR usando la dilución de la primera-hebra de cDNA en Assays-On-Demand y TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI P/N 4304437, Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) según las instrucciones del fabricante. Se realizó el análisis de las muestras por triplicado. Un control sin molde (Rnase-free water) se incluyó en cada batería de pruebas. Las condiciones térmicas de cada ciclo eran 2 min a 50°C (UNG activación), 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclo de 15 s a 95°C (desnaturalización) y 1 min a 60°C (anillamiento/extensión).

Así, se parte de 2µg de RNA total de tejido auricular para cada muestra y se realiza la reacción con los *primers* aleatorios, utilizando la transcriptasa M-MLV RT (H-). Se utilizan los 2 µl de los cDNA obtenido con la RT para realizar la PCR Master Mix2X (50 unidades/ml de Taq DNA polimerasa, 3 mM MgCl<sub>2</sub> y 400 µM de cada dNTP) y 0'5 µM de cada *primer* de la pareja específica (F y R) para cada receptor. Se amplifican las muestras. Las muestra de DNA obtenidas se someten a electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando un tampón Tris, borato 0'09 M, EDTA 2 mM. El gel se tiñe con bromuro de etidio para visualizar las bandas.

Para realizar una cuantificación relativa de la expresión de los genes diana en cada muestra, se calculó mediante el método del Ct comparativo. La cantidad de gen diana expresado (A<sub>2AR</sub>) se normalizó con una referencia endógena (α-actinina 1) para cada muestra.

#### **4. Aislamiento de cardiomiocitos**

El aislamiento se realiza a partir de la muestra de tejido auricular obtenida en quirófano.

Para evitar la degradación del tejido auricular, éste se sumerge en solución Tyrode sin Ca<sup>2+</sup>, fría y a la que se le añade 30 mM de monoxima-2,3-butanediona, inmediatamente después de la extracción. El tejido se corta en esta misma solución. Seguidamente se procede a la primera digestión enzimática a 35°C durante 30 minutos. El tejido se extrae de la solución enzimática con el fin de parar la digestión y se lava en la solución Tyrode sin Ca<sup>2+</sup> con 5% de BSA. Se disgregan las células con una pipeta *Pasteur* y los restos de tejido no disgregados se someten a sucesivas digestiones de 15 minutos y a los correspondientes lavados. Una vez se han obtenido células, éstas se guardan en una solución de mantenimiento y se incrementa gradualmente la concentración de calcio en la solución hasta 1mM. Las células obtenidas únicamente se utilizarán durante las siguientes 10 horas.

Solución	Composición
Solución Tyrode sin Ca <sup>2+</sup>	88 mM sucrosa, 88 mM NaCl, 5.4 KCl, 4 mM NaHCO <sub>3</sub> , 0.3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1.1 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM HEPES, 20 mM taurina, 10 mM glucosa y 5 mM Na <sup>+</sup> piruvato. El pH se ajusta a 7.4 con NaOH a temperatura ambiente.
Solución Tyrode para la primera digestión	Solución Tyrode sin Ca <sup>2+</sup> con 1.8 mg/ml colagenasa (315U/mg), 0.42 mg/ml proteasa y 2 mg/ml BSA.
Solución Tyrode para las siguientes digestiones	Solución Tyrode sin Ca <sup>2+</sup> con 0.6 mg/ml de colagenasa y 2 mg/ml BSA.
Solución Tyrode suplementada	100ml de Solución Tyrode sin Ca <sup>2+</sup> se suplementa con: 1ml MEM vitaminas, 1 ml penicilina-streptomina, 2 ml MEM aminoácidos esenciales (50x), 1 ml MEM aminoácidos no esenciales (100x) y 500 mg BSA.

**Tabla 6.** Composición de las diferentes soluciones utilizadas para el aislamiento de cardiomiocitos.

## 5. Técnica de patch-clamp

### 5.1. Descripción de la técnica

Se usan miocitos alargados en los que se puede observar la estriación y que no presentan granulación. La capacitancia se ha usado como medida del tamaño de las células para poder normalizar las corrientes registradas al tamaño celular. El tamaño medio de la capacitancia era de 55±3 pF.

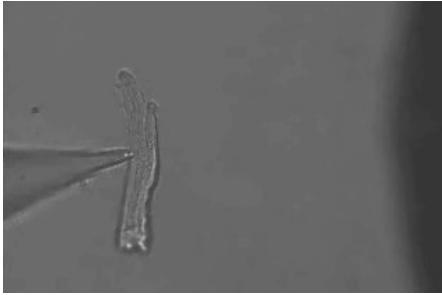
Se utilizó un amplificador de patch-clamp (modelo EPC-10, HEKA, Alemania) para medir las corrientes iónicas.

Solución	Composición
Solución de medio intracelular	109.2 mM ácido aspártico, 46.8 mM CsCl, 3 mM Mg <sub>2</sub> ATP, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM Na <sub>2</sub> fosfocreatina, 0.42 mM Li <sub>2</sub> GTP y 10 mM HEPES. El pH se ajusta a 7.2 con NaOH a temperatura ambiente.
Solución extracelular	127 mM NaCl, 5 mM TEA, 10 mM HEPES, 4 mM NaHCO <sub>3</sub> , 0.33 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM glucosa, 5 mM ácido pirúvico, 2 mM CaCl <sub>2</sub> y 1.8 mM MgCl <sub>2</sub> . El pH se ajusta a 7.4 con NaOH a temperatura ambiente.

**Tabla 7.** Composición de las diferentes soluciones utilizadas para el la técnica del patch-clamp.

Para prevenir la adhesión de los miocitos a la placa Petri, se hizo un tratamiento previo a las placas con BSA en solución extracelular. Para la experimentación, se substituye la solución de la placa, por solución extracelular sin BSA y se añaden unas pocas gotas de la solución que contiene las células en suspensión. Una vez sedimentados los cardiomiocitos, se acerca la micropipeta a la célula y se aplica una pequeña presión negativa que permite coger la célula elegida. Al medio intracelular se le añaden 250µg/ml de amfotericina B para la perforación de la membrana. Así, la resistencia que presentaba la pipeta, de entre 1-2.5 mΩ, pasa a ser de aproximadamente 1GΩ (Gigaseal) indicando que ya se ha formado un sello por contacto entre la superficie interna de la punta de la micropipeta y la membrana de la célula. Después de que se haya formado el sello esta presión se elimina puesto que ya no es necesaria. La célula se levanta del fondo de la placa de Petri y se coloca delante de un sistema de capilares para perfundirla con las soluciones deseadas según el experimento.





**Figura 32.** Un miocito auricular humano cogido con una micropipeta de patch-clamp. Se observa también el tubo de perfusión (sombra negra a la derecha de la imagen) que se coloca enfrente de la célula para que ésta pueda ser profundida con la solución experimental.

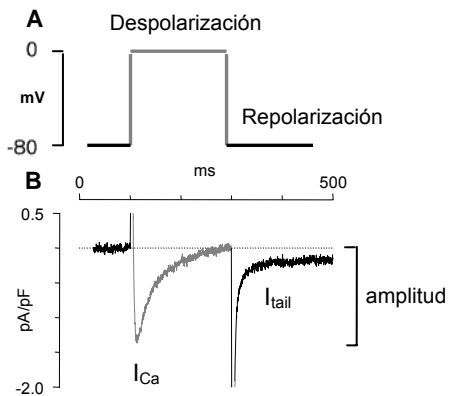
La técnica del patch-clamp permite medir las corrientes iónicas transmembrana (a temperatura ambiente) a través de la micropipeta de patch y así determinar: la  $I_{Ca}$ , la inactivación de  $I_{Ca}$ , la corriente de cola ( $I_{tail}$ ), las  $I_{NCX}$  espontáneas y las  $I_{NCX}$  inducidas por cafeína (ver apartado 5.2).

Esta técnica, desarrollada por Neher y Sakmann en 1976, consiste en el aislamiento de un trozo de la membrana plasmática de una célula en la punta de una micropipeta. Aplicando un impulso eléctrico desde un electrodo que está en el interior de la pipeta y mediante el uso de un amplificador de la señal, se pueden medir las corrientes iónicas a través de la membrana celular, permitiendo conocer el comportamiento de los canales iónicos a los impulsos eléctricos, bajo las condiciones experimentales deseadas.

## 5.2. Protocolos electrofisiológicos

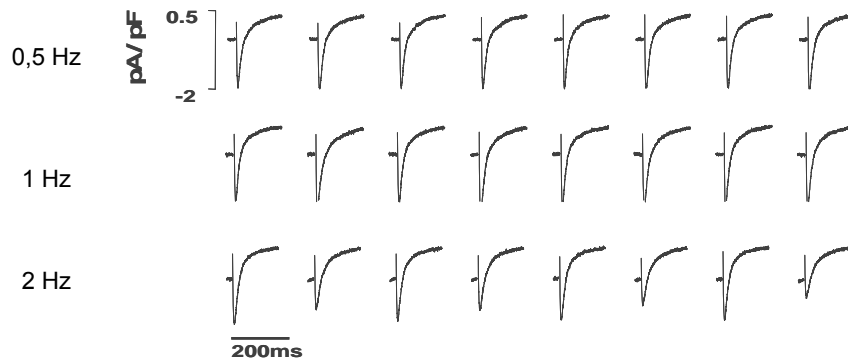
Los experimentos electrofisiológicos se realizaron sin el conocimiento del historial clínico de los pacientes. A continuación se describe cada uno de los protocolos básicos realizados en este trabajo, que se bifurcan en tres trabajos experimentales básicos y que se adaptan según el objetivo perseguido en cada una de estos trabajos.

1. **Medición de la corriente de calcio tipo-L:** Para medir la corriente de calcio a través de los canales de calcio, la célula se despolariza desde un potencial de reposo de -80 mV a 0 mV durante 200 ms (ver figura 33). La despolarización activa la apertura de los canales de calcio, dando lugar a una corriente de entrada. La desaparición de la corriente durante la despolarización, refleja la inactivación de la misma. La amplitud de la corriente de calcio tipo-L se calcula como la diferencia entre el pico de la corriente de entrada y el valor de la corriente al final de los 200 ms.



**Figura 33.** Registro representativo de  $I_{Ca}$ . A: Potencial de membrana fijado por el amplificador. B: Corriente de calcio tipo-L.

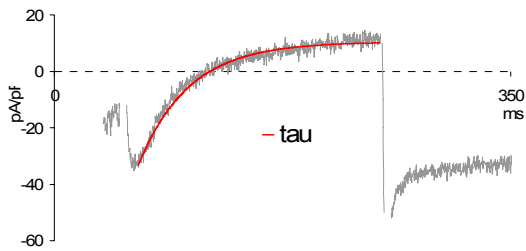
En algunos experimentos la estimulación se ha aplicado de manera repetitiva como una subida escalonada desde 0.2 a 0.5, 0.67, 1, 1.33 y a 2 Hz.



**Figura 34.** Registros de la corriente de calcio tipo-L de un cardiomiocito estimulado a tres frecuencias diferentes: 0.5, 1 y 2 Hz.

Las soluciones intra y extracelulares no contenían potasio para que estas corrientes no interfieran en la medición de la corriente de calcio. La corriente de sodio fue eliminada con un prepulso de 50 ms a -50 mV que la inactiva.

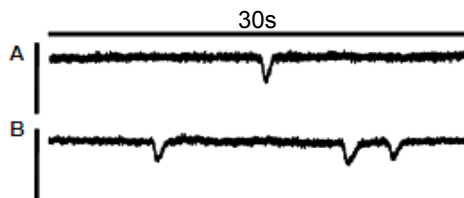
- Medición de la inactivación de la corriente de calcio (tau):** Para medir la velocidad de inactivación de los canales de calcio, es decir, la fase de desaparición de la corriente de calcio tipo-L ( $I_{Ca}$ ), se calcula la velocidad de ascenso de la curva del registro de  $I_{Ca}$ , ajustando los datos a una ecuación bi-exponencial.



**Figura 36.** Inactivación de los canales de calcio, representada sobre un registro de  $I_{Ca}$ , con la ecuación exponencial:

$$y(x) = y_0 + \text{ampl}_1 * \exp(-x / \text{tau}_1) + \text{ampl}_2 * \exp(-x / \text{tau}_2)$$

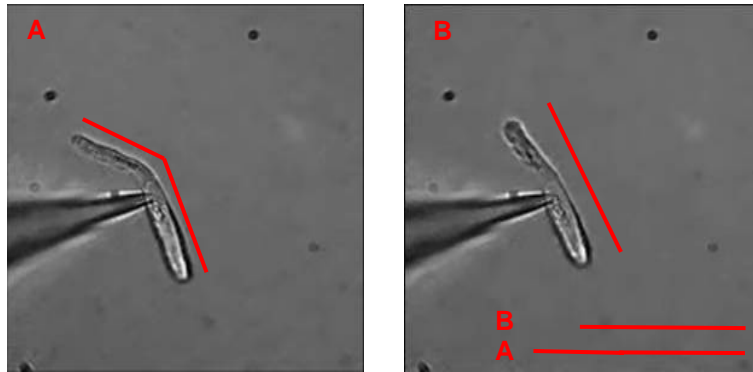
3. **Medición de la incidencia de las corrientes de entrada espontáneas:** Las corrientes se registran con un potencial de membrana fijado a -80 o -50 mV durante un periodo de 30s.



**Figura 35.** Registros de corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas. A: Registro a un potencial de reposo de -80mV. B: Registro a un potencial de reposo de -50mV.

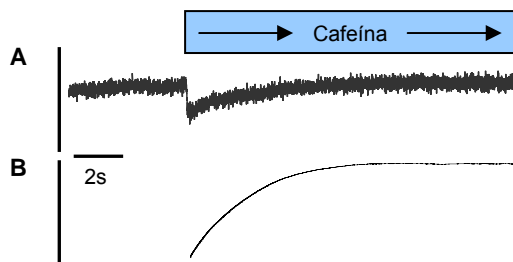
4. **Medición del transporte de calcio a través del sarcolema por  $I_{Ca}$  durante la despolarización y por el NCX durante la repolarización:** El calcio que entra y se expulsa a través de la membrana celular en cada despolarización se obtiene integrando la  $I_{Ca}$  y la corriente de cola ( $I_{tail}$ , ver figura 33). Tanto para la  $I_{Ca}$  como para la  $I_{tail}$ , se elimina la corriente capacitiva antes de integrar las corrientes. La integración proporciona una medida de la carga eléctrica (en pC) movida por la  $I_{Ca}$  y la  $I_{tail}$ . Utilizando el constante de Faraday y teniendo en cuenta que pasa un ión de calcio por los canales de calcio que corresponde al flujo de dos cargas, mientras el transporte de un ión de calcio por el NCX corresponde al flujo de una carga neta (asumiendo la estequiometría del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ :  $3Na^+:1Ca^{2+}$ ), la carga se transforma en moles. Aquí se ha expresado como amoles ( $10^{-18}$  moles) y ha sido normalizado a la capacitancia celular (amol/pF).

5. **Medición de la contracción:** Los experimentos de patch-clamp se graban simultáneamente en video. Esto permite disponer de imágenes sobre las que se puede medir de forma directa el acortamiento de la célula inducido por una despolarización.



**Figura 37.** Medición de la contracción. Las imágenes muestran un miocito auricular humano en potencial de reposo de -80 mV, relajado (a la izquierda) y después sometido a una despolarización de 0 mV, contrayéndose (a la derecha). A través de las imágenes se puede medir el acortamiento celular en la contracción.

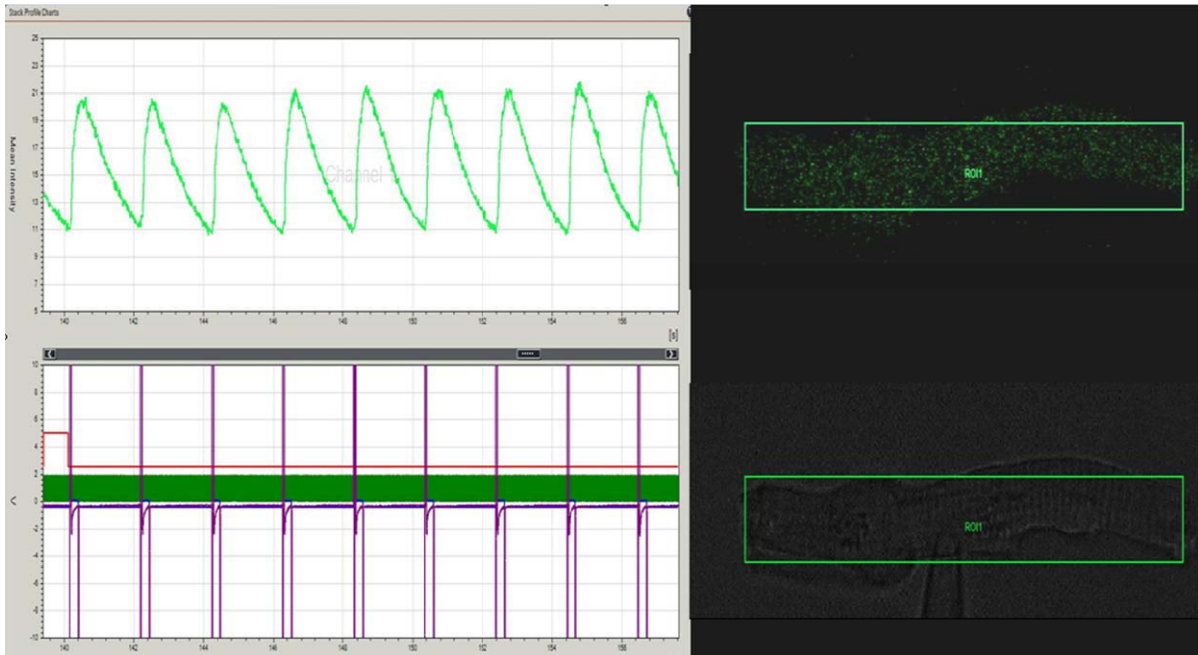
6. **Medición del contenido de calcio del retículo sarcoplasmático:** Se usa una aplicación rápida de 10 mM cafeína para inducir la liberación de calcio del SR, produciéndose así la salida del calcio del SR (durante el tiempo de aplicación de la cafeína) dando lugar a una corriente de entrada transitoria debida a la extrusión del calcio liberado del SR por el NCX. En función de la expulsión del calcio por el NCX, la  $I_{NCX}$  disminuye y el calcio total liberado por el SR se obtiene integrando la corriente.



**Figura 38.** **A:** Registro de una corriente obtenida mediante la aplicación de cafeína en potencial de reposo. La cafeína induce una corriente transitoria de entrada ( $I_{NCX}$ , 15 pA de amplitud). **B:** La integral de la corriente (3'5 amol/pF).

## 6. Microscopía confocal

Para investigar cambios simultáneos en el calcio subcelular y las corrientes objeto de estudio, se utilizaron las técnicas de patch-clamp y microscopía confocal de forma simultanea.



**Figura 39.** Imagen de los registros simultáneos del calcio intracelular (registro verde en el panel superior) en la Región de Interés o ROI (rectángulo verde mostrado a la derecha) mediante la visualización de calcio por microscopía confocal y de la corriente de calcio tipo-L (registro inferior morado) mediante la técnica de patch-clamp, en un miocito auricular humano. La línea roja en el panel inferior indica el trigger que desencadena la adquisición de imágenes (representadas por la banda verde en el panel inferior) y señales eléctricas.

Para la visualización y medición del calcio intracelular, los cardiomiocitos auriculares se cargaron con un indicador de calcio fluorescente. Se utilizó Fluo-4 ( $K_d = 345$  nM) en la forma AM (de Molecular Probes) para cargar los cardiomiocitos, incubados con  $2,5 \mu\text{M}$  a temperatura ambiente durante 15 min. Después la suspensión se centrifugó para lavar el fluo y los miocitos se resuspenden en una solución extracelular que contiene en mM: 132 NaCl, 4 KCl,  $0.33 \text{ NaH}_4\text{PO}_4$ ,  $4 \text{ NaHCO}_3$ ,  $2 \text{ CaCl}_2$ ,  $1.6 \text{ MgCl}_2$ , 10 Hepes, 5 Glucosa, 5 Na-Piruvato, el pH se ajusta a 7.4 con NaOH a temperatura ambiente.

El Fluo-4 AM se disuelve a una concentración de 1mM en DMSO con un 10% de Pluronic. El indicador en la forma AM éster puede entrar en el cardiomiocito atravesando las membranas lipídicas cuando se disuelve con Pluronic 10% en DMSO. Una vez en el interior de los cardiomiocitos, las fosfodiesterasas presentes en el citosol rompen el residuo AM liberando el Fluo-4 que fluoresce al unirse a los iones de calcio libres. Las imágenes en 2D se captaron a una velocidad de escaneo de 100 Hz con un microscopio confocal de escaneo resonante Leica TCS SP5 AOBS. Fluo-4 se excitó a 488 nm y la emisión de fluorescencia fue captada entre 500 y 650nm. Se cuantificaron las ondas de calcio seleccionando una región de interés (ROI) que englobaba la célula entera. También se midieron los cambios locales de calcio intracelular utilizando ROIs específicas.

En los experimentos que requerían perfusión intracelular con adenosina a través de la pipeta de patch-clamp, se incluyó en la solución intracelular 30  $\mu\text{M}$  de ADO y la sal pentapotásico de Fluo-4. En este caso, las células no se cargaron previamente con el fluoróforo, sino que éste entra por difusión a través de la pipeta de patch, junto con ADO una vez que se haya roto la membrana en la punta de la pipeta. Para ello, se utiliza un pulso breve (500-750  $\mu\text{s}$ ) pero de alto voltaje (500 -700 mV). De esta manera, se puede visualizar el aumento progresivo de ADO en el miocito, asumiendo que ADO y Fluo-4, que son moléculas pequeñas, tendrían una velocidad de difusión comparable. Así, midiendo la subida en la intensidad de la señal fluorescente en reposo tenemos una medida indirecta del aumento de ADO en la célula.

## **7. Análisis de datos y estadística**

Los valores usados para el análisis estadístico están expresados como media  $\pm$  s.e.m. Se comprobó la normalidad de los datos. Se ha utilizado el test t de Student para identificar diferencias significativas cuando se comprobaba un efecto específico. En los experimentos en los que se comparan múltiples variables o efectos se ha usado ANOVA y después el post-test Student-Newman-Keuls para evaluar si los efectos específicos eran significativos.



## **VI. RESULTADOS**

---





## 1. La regulación anormal del calcio intracelular en la FA se asocia a la sobre-regulación de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub>.

### 1.1. Introducción

Estudios realizados en tejido auricular humano han relacionado la FA con alteraciones en la dinámica del calcio intracelular<sup>3, 72, 226</sup>. Además, miocitos aislados de la aurícula derecha de pacientes con FA presentan una disminución en la corriente de calcio tipo-L ( $I_{Ca}$ ) y un incremento en la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR en reposo. Como resultado de las liberaciones espontáneas de calcio del SR, la concentración citosólica de este ión también incrementa y activa la extrusión de calcio de la célula a través de intercambiador de  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX), generando una corriente de entrada a través de este intercambiador ( $I_{NCX}$ ) y una despolarización concurrente de la membrana<sup>234</sup>. Se sabe que las post-despolarizaciones de la membrana celular favorecen las arritmias por actividad repetitiva<sup>235, 236</sup> y promueven el reinicio de la FA en muestras auriculares aisladas<sup>237</sup>. No se conoce bien el mecanismo por el cual los miocitos auriculares de pacientes con FA tienen liberaciones anormales de calcio por parte del SR, pero está vinculado con el aumento de la fosforilación del receptor de rianodina (RyR2)<sup>226</sup>. Puesto que la fosforilación del RyR2 está mediada por la proteína quinasa A (PKA) vía AMPc<sup>235, 238-240</sup>, es posible que los receptores de membrana acoplados a adenilato ciclasa (AC) a través de proteínas Gs puedan modular la dinámica del calcio intracelular. De hecho, nuestro laboratorio publicó recientemente resultados que demuestran la expresión de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R) en la aurícula humana derecha y que los A<sub>2A</sub>R modulan la frecuencia de liberaciones espontáneas de calcio<sup>138</sup>. Además, hay estudios que muestran el remodelado de otros receptores de membrana en tejido auricular de pacientes con FA<sup>241-243</sup>. El hecho de que la FA causa remodelado de los receptores de adenosina podría explicar, al menos en parte, la liberación anormal de calcio del SR que se observa en pacientes con FA.

Este estudio se basa en la hipótesis de que la liberación anormal de calcio del SR en pacientes con FA está vinculada al remodelado de los A<sub>2A</sub>R en la aurícula. Nuestros resultados revelan un incremento de la expresión de los A<sub>2A</sub>R cuatro veces superior en el miocardio auricular de pacientes con FA y que los A<sub>2A</sub>R son mediadores en el incremento de la fosforilación de los RyR2 y la liberación espontánea de calcio. Además, la inhibición de los A<sub>2A</sub>R o de la degradación de adenosina por adenosina desaminasa (ADA) exógena, reduce la frecuencia de ondas de calcio espontáneas en células de pacientes con FA a los niveles observados en células de pacientes sin esta arritmia, lo que sugiere que la

activación de un alto número de  $A_{2A}R$  por adenosina endógena en pacientes con FA promueve la dinámica anormal en el calcio intracelular.

## 1.2. Métodos

### 1.2.1. Muestras de tejido auricular humano

Se aislaron miocitos de muestras de tejido auricular humano por digestión enzimática como se ha descrito anteriormente<sup>3</sup>. Se usaron un total de 226 miocitos de 73 pacientes para los experimentos electrofisiológicos. 31 de estos pacientes tenían una historia de FA, mientras que el resto de los pacientes no presentaban esta arritmia y tenían una aurícula izquierda de tamaño normal (no dilatada, inferior a 41 mm). Los pacientes que han recibido tratamiento con antagonistas del calcio han sido excluidos del estudio.

El número de pacientes usados para cada experimento se especifica en cada caso.

Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente para la obtención de las muestras.

El protocolo ha sido aprobado por el comité ético del Hospital.

### 1.2.2. Electroforesis en gel e inmunoblotting

Las membranas del tejido auricular o de células HEK se prepararon como se ha descrito anteriormente<sup>232, 233</sup>. Las muestras se trataron con un buffer SDS-PAGE, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

Para observar si la estimulación de los  $A_{2A}R$  afecta a la fosforilación de los receptores de rianodina en Ser-2808, cada muestra de tejido auricular humano se dividió en tres piezas que fueron incubadas durante 20 min en soluciones oxigenadas: control, con el agonista selectivo de  $A_{2A}R$  (200 nM, CGS21680) y con isoproterenol como control positivo (1  $\mu$ M), todas ellas con inhibidores de proteasas.

### 1.2.3. Extracción de RNA y cuantificación por PCR a tiempo real

El RNA total se aisló de las muestras de tejido auricular humano usando un kit comercial y se amplificó el cDNA utilizando Taq DNA polimerasa y *primers* para los gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADH), FGAPDH, RGAPDH y el  $A_{2A}R$ .

Para determinar la cantidad relativa de la expresión de los genes diana, se hizo una cuantificación relativa mediante el método del Ct comparativo.

#### **1.2.4. Medición de las liberaciones espontáneas de calcio y de las corrientes iónicas en miocitos aislados**

Se detectaron los *Ca sparks* y ondas de calcio en miocitos auriculares incubados con fluo-4 usando un microscopio confocal (Leica TCS SP2 AOBS, Alemania) y las corrientes iónicas se registraron con un amplificador HEKA EPC-10 como se ha descrito anteriormente <sup>3</sup> (ver Métodos).

#### **1.2.5. Análisis de datos y estadística**

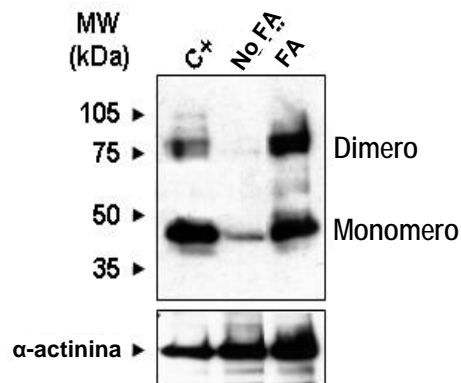
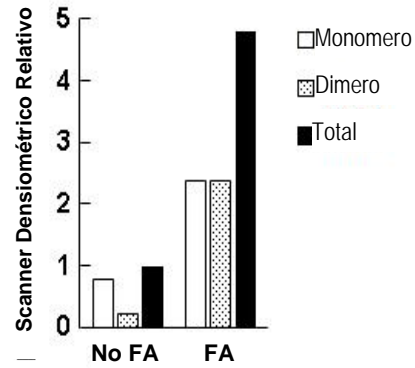
Los experimentos se realizaron sin el conocimiento de la historia clínica de los pacientes. Se ha hecho la media de los *Ca sparks* y ondas de calcio de los miocitos del mismo paciente. La media de los valores de cada paciente usados para el análisis estadístico está expresada en media  $\pm$  s.e.m. Se comprobó la normalidad de los datos. Se ha llevado a cabo el test t de Student para determinar si un efecto específico era significativo. En los experimentos donde se comparan múltiples variables o efectos se ha usado ANOVA y después el test Student-Newman-Keuls para evaluar si los efectos específicos eran significativos.

### **1.3. Resultados**

#### **1.3.1. Incremento de la expresión de los A<sub>2A</sub>R en pacientes con FA**

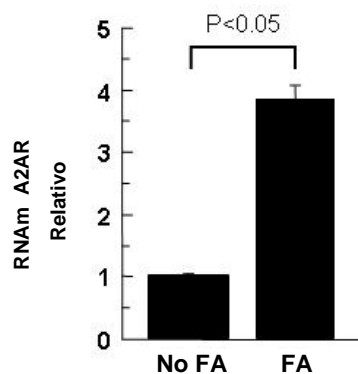
Las figuras 1A y 1B muestran que tanto la especie monomérica como la dimérica (la isoforma funcional) de los A<sub>2A</sub>R se expresan en la aurícula humana.

Las especies diméricas del receptor, que es la forma funcional del receptor localizada en la membrana celular <sup>232</sup>, era minoritaria en muestras de pacientes sin FA, mientras que su expresión era muy superior en las muestras de pacientes con FA (figura 1B).

**A****B**

**Figura 1. La expresión de los receptores de adenosina está incrementada en fibrilación auricular. A:** Immunoblotting con un anticuerpo anti-rabbit anti-A<sub>2A</sub>R en membranas celulares de células HEK transfectadas con A<sub>2A</sub>R humano (control positivo), membranas de miocitos auriculares humanos de pacientes sin FA (no AF) y de pacientes con FA (AF). **B:** Scan densitométrico del immunoblotting de la figura A, mostrando las medias relativas de monómero y dímero de A<sub>2A</sub>R normalizado con la suma de monómero y dímero en pacientes sin FA.

Además, midiendo el mRNA del A<sub>2A</sub>R mediante PCR a tiempo real, comprobamos que la cantidad de mRNA también es mucho mayor en las células de pacientes en fibrilación auricular respecto a las células de pacientes sin antecedentes de fibrilación auricular.

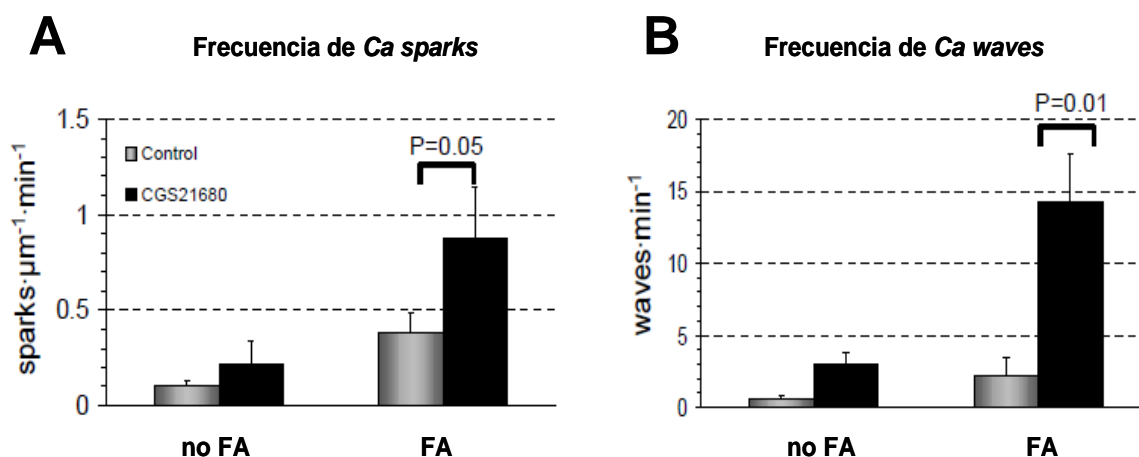


**Figura 2. Expresión relativa del mRNA A<sub>2A</sub>R en pacientes con y sin FA.** Las barras representan valores normalizados con el control endógeno α-actinina 1 en 5 pacientes sin FA (no AF) y 8 con FA.

### 1.3.2. Efecto de la activación de los A<sub>2A</sub>R en la liberación espontánea de calcio

Para evaluar el potencial efecto funcional del remodelado de los A<sub>2A</sub>R, primero se analizó el efecto de la estimulación de los A<sub>2A</sub>R (con el agonista específico del A<sub>2A</sub>R CGS21680) sobre las liberaciones espontáneas de calcio del SR en miocitos auriculares aislados de 6 pacientes con FA y 8 pacientes sin FA. En este estudio se analizaron tanto las liberaciones locales de calcio que no se propagan (*sparks*), como las liberaciones que se propagan a lo largo de la célula (ondas o *waves*).

Las figuras 3A y 3B muestran que las células expuestas (previa incubación) al agonista para A<sub>2A</sub>R, CGS21680, presentan mayor incidencia de *sparks* (figura 3A) y de *waves* (figura 3B) en miocitos de pacientes con FA, pero no en los de pacientes sin la arritmia.

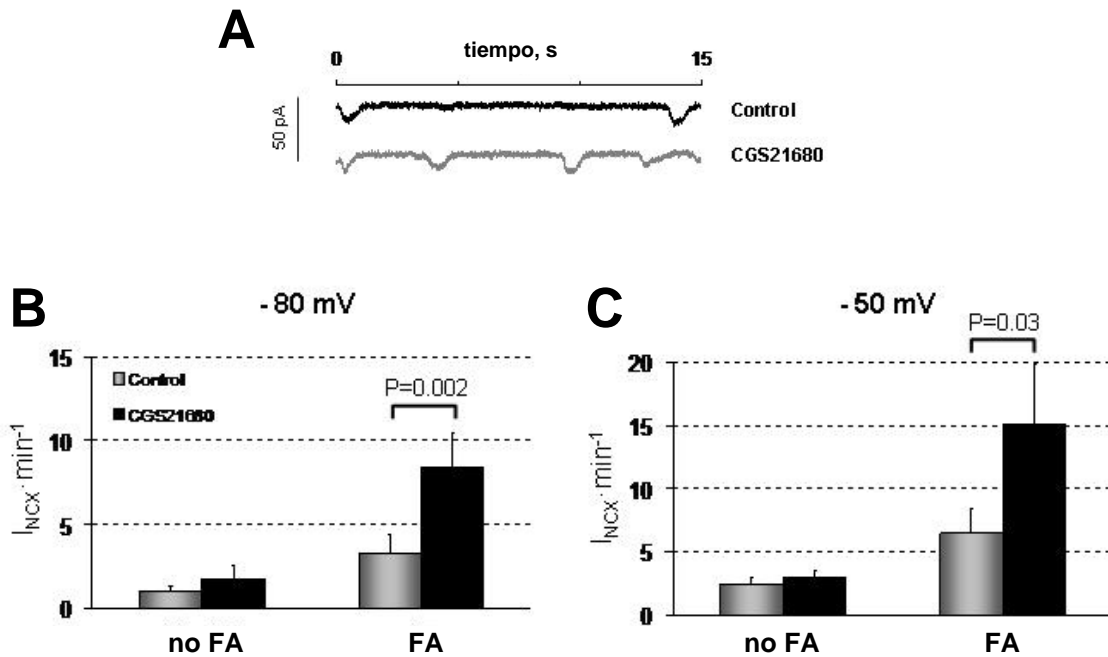


**Figura 3. Efecto de la estimulación de los A<sub>2A</sub>R.** Se muestran los efectos del agonista CGS21680 sobre la frecuencia de *Ca sparks* y *Ca waves* en células de 8 pacientes sin FA (no FA) y de 6 pacientes con FA (FA).

Puesto que el incremento de las liberaciones espontáneas de calcio del SR podría ser el resultado de un efecto directo de la estimulación de A<sub>2A</sub>R sobre la actividad del RyR, o de un efecto sobre el contenido de calcio del SR<sup>210, 236</sup>, analizamos la amplitud y el tiempo de desaparición de 142 *Ca sparks* de 6 pacientes con FA para determinar cómo la estimulación de A<sub>2A</sub>R modifica el contenido de calcio del SR o su velocidad de llenado. En estos miocitos, CGS21680 no alteró ni la amplitud (1.62±0.05 vs. 1.59±0.04, p=0.74) ni la constante de tiempo de la desaparición (45±3 vs. 52±6, p=0.14) de los *Ca sparks*.

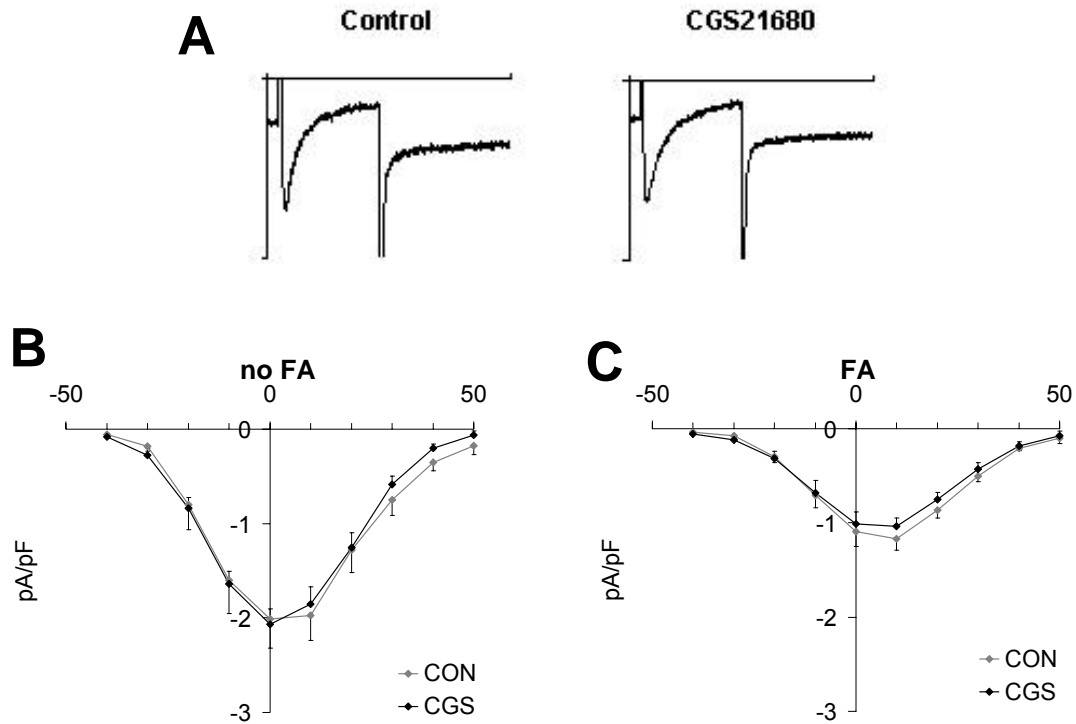
Para determinar si el efecto de CGS21680 sobre las liberaciones espontáneas de calcio era secundario a una acción sobre el potencial de membrana, utilizamos la técnica del patch-clamp para fijar el potencial de membrana y detectar las corrientes de entrada I<sub>NCX</sub> activadas por liberaciones espontáneas de calcio del SR<sup>3</sup>. Puesto que la FA ha sido

asociada a una pérdida del potencial de reposo, examinamos el efecto de la estimulación de los  $A_{2A}R$  sobre la frecuencia de corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas a un potencial de reposo normal (-80 mV) y a un potencial de reposo despolarizado (-50 mV). Esta fijación del potencial de membrana no impidió que CGS21680 incrementara el número de corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas en células de pacientes con FA (figura 4A-C).



**Figura 4. Efectos de la activación de los  $A_{2A}R$  sobre las liberaciones espontáneas de calcio del SR. A:** registros de  $I_{NCX}$  espontáneas antes y después de la exposición del miocito a 200 nM CGS21680. **B-C:** Las figuras muestran que se produce un incremento significativo de la frecuencia de  $I_{NCX}$  frente a la exposición a CGS21680 en miocitos de 11 pacientes con FA, mientras que este incremento no se produce en los miocitos de los 8 pacientes no FA. Este efecto se observó a ambos potenciales de reposo (-80 y -50 mV).

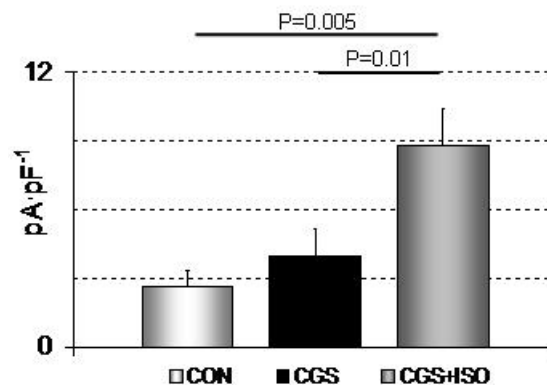
La amplitud de las corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas o mostró diferencias en los miocitos de los 11 pacientes con FA antes y después de exponerlos a CGS21680 ( $0.27 \pm 0.09$  y  $0.25 \pm 0.09$  pA·pF<sup>-1</sup> respectivamente,  $p=0.76$ ). El contenido del SR en estos miocitos también era comparable antes y después de la exposición a CGS21680 ( $6.9 \pm 0.6$  amol·pF<sup>-1</sup> con CGS21680 vs.  $7.0 \pm 0.4$  amol·pF<sup>-1</sup> sin CGS21680,  $p=0.83$ ). Tal y como se ha descrito previamente por otros grupos, la amplitud de  $I_{Ca}$ , con una despolarización superior a 0 mV, era significativamente menor en las células de pacientes con FA. En cualquier caso, tal y como se muestra en la figura 5A, la amplitud de  $I_{Ca}$  no se vio significativamente afectada por la exposición a CGS21680 en ninguno de los dos grupos de pacientes.



**Figura 5. Efectos de la activación de los  $A_{2A}R$  sobre la corriente de calcio tipo-L.** **A:** Registros representativos de la corriente de calcio tipo-L en ausencia (control) y en presencia de CGS21680. **B-C:** Relaciones Intensidad-Voltaje obtenidas en ausencia (CON) y en presencia (CGS) del agonista para los  $A_{2A}R$ , para células de 11 pacientes con y 8 pacientes sin FA.

Además, la relación Intensidad-Voltaje para  $I_{Ca}$  no se vio afectada por CGS21680 en ninguno de los dos grupos de pacientes (figura 5B).

Además, en una serie de experimentos a parte utilizando miocitos de pacientes sin FA, se comprobó que el agonista beta-adrenérgico isoproterenol (ISO) sí incrementaba la amplitud de  $I_{Ca}$  y la liberación de calcio por cafeína confirmando que se podía inducir una estimulación de  $I_{Ca}$  vía PKA en estas células.

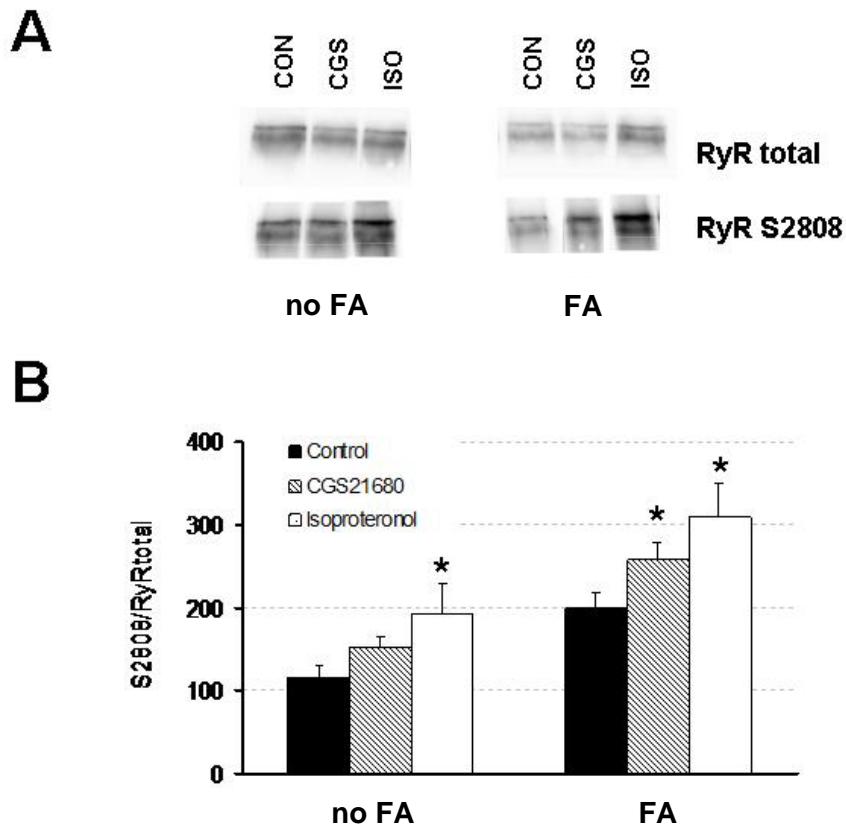




**Figura 6. Comparación del efecto de CGS21680 y de isoproterenol (ISO) sobre la corriente de calcio tipo-L.** Las barras representan la densidad de la  $I_{Ca}$  en cardiomiocitos sometidos a exposición consecutiva de soluciones control (CON), CGS21680 (CGS) y CGS21680+isoproterenol (CGS+ISO). Las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos se indican con los valores P.

### **1.3.3. La activación de los $A_{2A}R$ incrementa la fosforilación del receptor de rianodina en aurículas fibriladas**

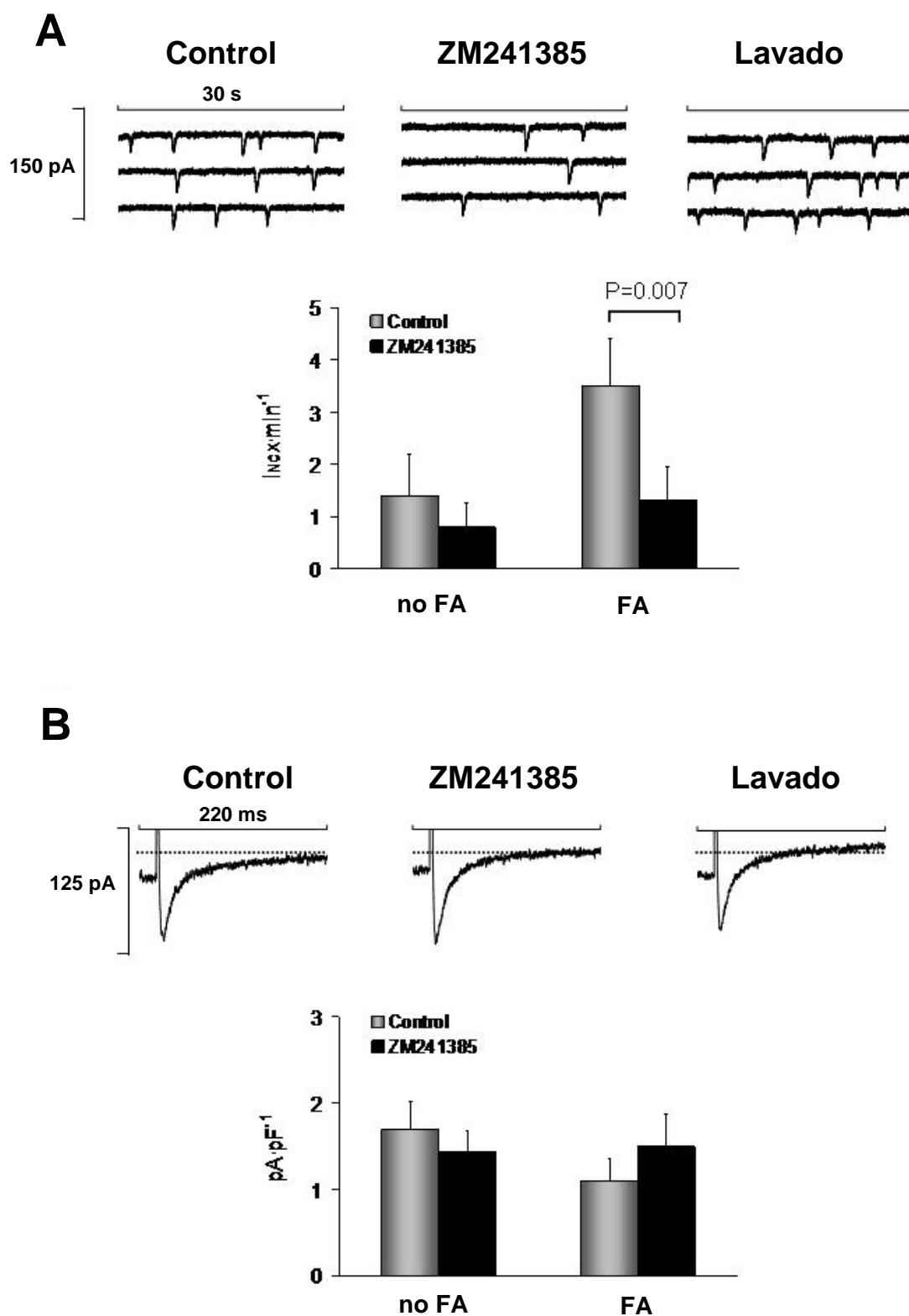
Para probar cómo la activación de los  $A_{2A}R$  afectaba a la fosforilación de los RyR2, usamos un anticuerpo fosfo-específico que reconoce el receptor de rianodina en su estado fosforilado por el residuo ser-2808. La figura 8 muestra que el ratio RyR2 fosforilado en ser-2808 : RyR2 total era significativamente mayor en el tejido auricular de pacientes con FA que en el de pacientes sin la arritmia. Además, la estimulación de los  $A_{2A}R$  con CGS21680 incrementaba la RyR2 fosforilada en ser-2808 en tejido de pacientes con FA. El efecto de isoproterenol sobre la fosforilación de RyR2 (figura 7B) se utilizó como control positivo para la RyR2 fosforilada en ser-2808 <sup>226</sup>. De acuerdo con la importancia del estado de fosforilación del RyR2 en la liberación de calcio del SR, la frecuencia de  $I_{NCX}$  espontáneas (figura 4B) era proporcional al ratio S2808 : RyR2 total (figura 7B), siendo menor en las muestras de pacientes sin FA incubadas con una solución control y más elevada en las muestras de pacientes con FA incubadas con CGS21680.



**Figura 7. Efectos de la activación de  $A_{2A}R$  sobre la fosforilación del RyR2 en ser-2808.** **A:** Westernblot del RyR2 total y del RyR2 fosforilado en ser-2808 (S2808) en tejido auricular de pacientes con FA. Las muestras de tejido se incubaron en una solución Tyrode oxigenada durante 20 min en condiciones control (CON), con 200 nM de CGS21680 (CGS), o con 1  $\mu$ M de isoproterenol (ISO). **B:** Densimetría del RyR2 fosforilado en ser-2808 relativa a RyR2 total. Los valores para todos los tratamientos fueron significativamente mayores en FA respecto a no FA ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ ).

### 1.3.5. Efecto de la inhibición de los $A_{2A}R$ sobre la dinámica del calcio del SR

Para comprobar si existe una relación casual entre la elevada activación de los  $A_{2A}R$  en pacientes con FA y la elevada incidencia de liberaciones espontáneas de calcio en los miocitos de los pacientes con esta arritmia, se comparó el efecto de los inhibidores selectivos de los  $A_{2A}R$  sobre la dinámica del calcio del SR y la  $I_{Ca}$  en miocitos auriculares de pacientes con y sin FA. La figura 8A muestra que el antagonista del  $A_{2A}R$ , ZM241385, reduce significativamente la frecuencia de liberaciones de calcio del SR en miocitos de pacientes con FA a los niveles observados en miocitos de pacientes sin la arritmia y que este efecto es reversible. Por el contrario, la exposición de los miocitos al antagonista, no afectó a las liberaciones de calcio del SR inducidas por cafeína ni a la amplitud de  $I_{Ca}$  (figura 8B).

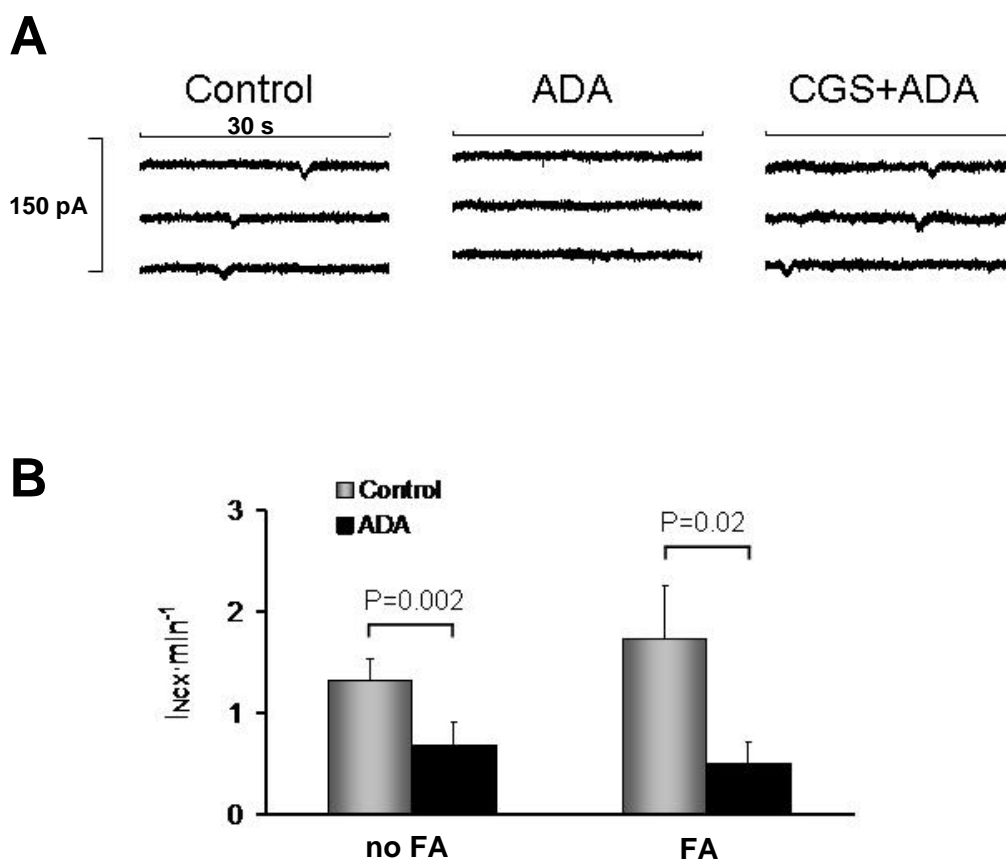


**Figura 8.** Efectos de la inhibición de los  $A_{2A}R$  sobre las corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas y sobre la  $I_{Ca}$ . **A:** Registros de las corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas antes (control), durante (ZM241385) y después (wash) de la exposición al miocito a 50 nM del antagonista ZM241385. La media muestra que ZM241385 reduce significativamente la frecuencia de  $I_{NCX}$  en miocitos de 6 pacientes con FA, aunque no en miocitos de pacientes

sin FA. El potencial de reposo utilizado fue de -80 mV. **B**: Registros de  $I_{Ca}$  antes (control), durante (ZM241385) y después (wash) de la exposición del mismo miocito a ZM241385. La media muestra que ZM24138 no tiene ningún efecto significativo sobre la amplitud de  $I_{Ca}$ , ni en los miocitos con FA ni en los de no FA.

### 1.3.6. La adenosina endógena modula la dinámica del calcio del SR a través de la activación de los $A_{2A}R$

La inhibición de las liberaciones espontáneas de calcio del SR por los antagonistas de  $A_{2A}R$  sugiere que actúan como agonistas reversos o que los  $A_{2A}R$  se activan por adenosina endógena. De acuerdo con esta última posibilidad, adenosina desaminasa exógena (ADA) redujo significativamente la frecuencia de corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas (figura 9A) y este efecto se pudo revertir con el agonista no degradable de los  $A_{2A}R$ , CGS21680. En cambio, ADA no tuvo efecto significativo sobre  $I_{Ca}$ , ni sobre las corrientes  $I_{NCX}$  inducidas por cafeína.



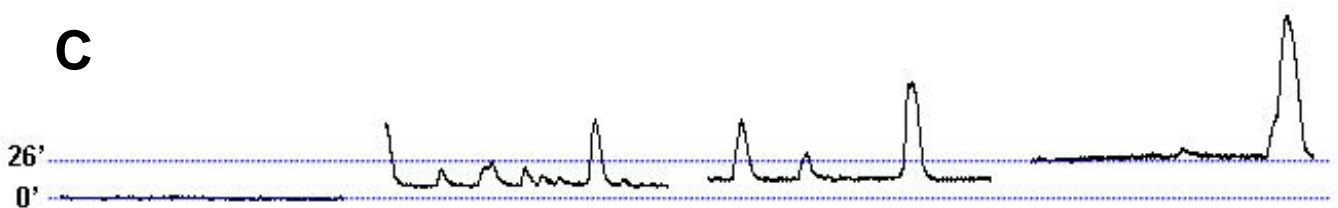
**Figura 9. Efectos de la adenosina desaminasa exógena sobre las  $I_{NCX}$  espontáneas y sobre la  $I_{Ca}$ .** **A**: Registros de las corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas antes (control) y después de la exposición al miocito a 2u/ml de adenosina desaminasa (ADA), seguido de la adición de 200 nM CGS21680 en presencia de ADA. El potencial de reposo utilizado fue de -80 mV. **B**: ADA reduce significativamente la frecuencia de  $I_{NCX}$  espontáneas en miocitos de 10 pacientes con FA y de 11 pacientes sin FA pacientes.

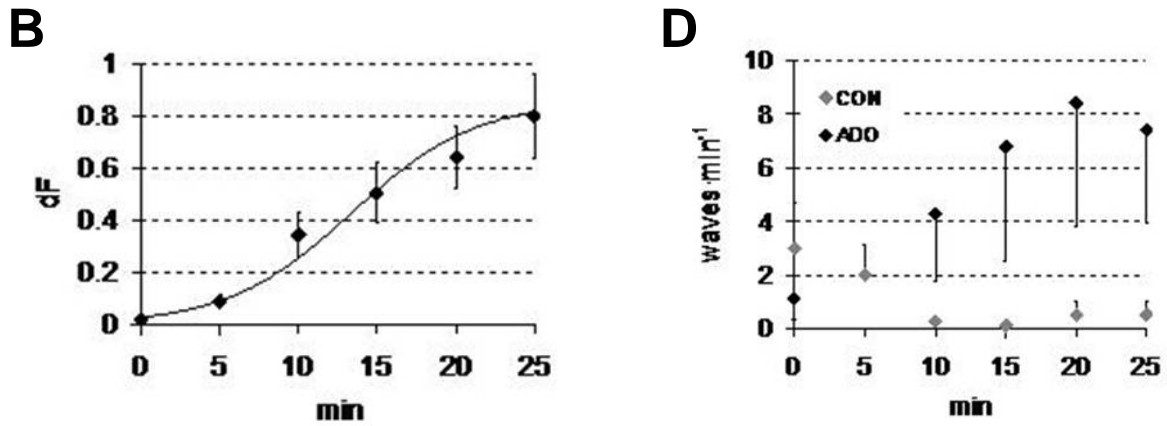
Para verificar que la adenosina endógena puede estimular liberaciones espontáneas de calcio, algunos miocitos auriculares humanos se sometieron a una configuración de la técnica de patch-clamp donde se rompe la membrana celular en la punta de la pipeta (ruptured-patch) permitiendo así infundir adenosina dentro de la célula a través de la pipeta de patch-clamp. Para seguir esta infusión, se incluyó en la solución de la pipeta 50  $\mu\text{M}$  de fluo-4. La infusión de fluo-4 se siguió a por el aumento en la intensidad de su fluorescencia con el tiempo, utilizando la microscopía confocal. La figura 10A muestra las imágenes grabadas a 0, 10, 18 y 26 minutos después de haber roto la membrana en la punta de la pipeta (también llamado ruptura del sello). En los 12 experimentos realizados se llegó a un aumento máximo de la fluorescencia de  $0.85 \pm 0.2$  en un  $t_{1/2}$  del aumento de  $13.4 \pm 3.9$  min. La señal de fluo-4, registrada a un potencial de reposo de  $-80$  mV, se muestra en la figura 10. Inicialmente, la infusión de adenosina induce numerosos *Ca sparks* y *mini-waves*, mientras que después predominan las grandes ondas de calcio que se propagan a lo largo del miocito. La figura 10D resume el efecto de la infusión de soluciones de pipeta con y sin adenosina. Los dos tratamientos tienen efectos opuestos, significativamente diferentes ( $p < 0.05$ , ANOVA de un factor), sobre la frecuencia de *Ca waves* que provocan corrientes  $I_{\text{NCX}}$  espontáneas. En cambio, La amplitud de  $I_{\text{Ca}}$ , después de la infusión de adenosina, era de un  $101 \pm 25\%$  ( $n=8$ ) respecto al valor inicial.

**A**



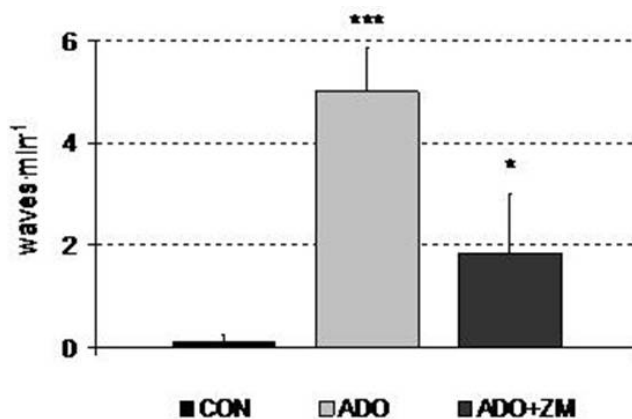
**C**





**Figura 10. Efecto de la perfusión intracelular con adenosina.** A: Imágenes de confocal de un miocito auricular infundido con fluo-4 y adenosina, 0, 10, 18 y 26 minutos después de la rotura del sello. B: Con el tiempo, el nivel basal de fluorescencia incrementó en estos 12 experimentos. La línea continua representa el fit hecho mediante una ecuación sigmoideal. C: Cuantificación de la señal de calcio registrada a un potencial de reposo de -80 mV a 0, 10, 18 y 26 minutos después de la rotura del sello de patch-clamp. Las líneas azules punteadas indican el nivel basal de fluorescencia a 0 y 26 minutos. D: Cambios en las ondas de calcio según el tiempo de infusión de una solución con adenosina (ADO) a través de la pipeta. Como referencia se muestra la infusión de una solución sin la adenosina (CON).

En una serie de experimentos, la perfusión de miocitos de 5 pacientes, con 150 nM de ZM241385, inhibió el efecto estimulador de la infusión con 30  $\mu$ M de adenosina (figura 11), confirmando que la adenosina actúa a través de la activación de los  $A_{2A}R$ .



**Figura 11. La inhibición de los  $A_{2A}R$  revierte el efecto de la adenosina sobre corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas.** Las columnas representan la frecuencia de corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas registrado en la misma célula inmediatamente después de la ruptura del sello (CON), después de infusión de 30  $\mu$ M adenosina (ADO) y después de perfusión extracelular con ZM241385 y perfusión intracelular con ADO (ADO+ZM).

## 1.4. Discusión

Este estudio revela que los miocitos auriculares aislados de pacientes con FA muestran una sobre-expresión de los A<sub>2A</sub>R funcionales, que promueve las liberaciones espontáneas de calcio del SR por un incremento de los RyR fosforilados en el residuo S2808. Este efecto se debe probablemente a la activación de un mayor número de A<sub>2A</sub>R por adenosina endógena, ya que la exposición tanto a inhibidores de A<sub>2A</sub>R como a adenosina desaminasa, reduce la frecuencia de ondas espontáneas de calcio.

### 1.4.1. Remodelado de los A<sub>2A</sub>R en fibrilación auricular

En este estudio mostramos que los niveles de mRNA de A<sub>2A</sub>R aumentan cuatro veces en pacientes con FA, lo que coincide con la elevada expresión de las formas monoméricas y homodiméricas funcionales<sup>244</sup> de los A<sub>2A</sub>R en pacientes con FA. Además, el solapamiento de la distribución de los A<sub>2A</sub>R y el RyR2 en la aurícula humana<sup>138</sup> hace viable su interacción. Estos descubrimientos sugiere que la FA puede remodelar receptores de la membrana celular que regulan la dinámica del calcio intracelular, y concuerda con el remodelado de otros receptores en pacientes con FA, entre los cuales se encuentran los receptores de angiotensina<sup>241, 242</sup>, receptores de IP<sub>3</sub><sup>243</sup>, receptores opioides<sup>245</sup> y receptores 5-HT<sub>4</sub><sup>246</sup>. El remodelado en FA de múltiples receptores podría provocar una variabilidad de efectos e, incluso, efectos opuestos en la dinámica del calcio intracelular. De hecho, la sobre-expresión de los receptores de angiotensina, 5-HT<sub>4</sub> e IP<sub>3</sub> favorecería la movilización del calcio intracelular<sup>243, 246, 247</sup>, mientras que la una menor expresión de los receptores de 5-HT<sub>4</sub> e IP<sub>3</sub> reducirían la amplitud de I<sub>Ca</sub> y la carga de calcio del SR<sup>248</sup>.

### 1.4.2. El remodelado de los A<sub>2A</sub>R está relacionado con la anormal dinámica anormal del calcio

Se ha descrito que las liberaciones espontáneas anormales de calcio del SR favorecen la incidencia de post-despolarizaciones arritmogénicas en miocitos aislados de pacientes con FA<sup>236</sup> y que se deben a un incremento de la actividad de RyR2<sup>3, 226</sup>. Aun no conoce el mecanismo específico que asocia la FA a la dinámica anormal del calcio intracelular, pero los resultados de este estudio sugieren como causa el remodelado de los A<sub>2A</sub>R. Así, tanto el ligando natural de estos receptores (adenosina) como el agonista selectiva CGS21680,

incrementan significativamente la frecuencia de *sparks* y ondas de calcio en pacientes con FA, mientras que el antagonista selectivo de los A<sub>2A</sub>R tiene el efecto contrario.

Hay diversas vías por las que la estimulación de los A<sub>2A</sub>R puede incrementar las liberaciones espontáneas de calcio del SR:

- afectando directamente la actividad del receptor de rianodina<sup>235, 239</sup>
- incrementando el contenido de calcio del SR<sup>249</sup>
- modulando la amplitud de I<sub>Ca</sub><sup>250</sup>
- promoviendo la activación cruzada entre receptores IP<sub>3</sub> y RyR<sup>142</sup>

Nuestros resultados indican que el mecanismo más probable por el que se incrementan las liberaciones espontáneas de calcio en la FA es por un aumento de la fosforilación del RyR2. Así, el ratio de RyR2 fosforilado en ser-2808 : RyR2 total era mayor en pacientes con FA que en pacientes que no presentaban la arritmia, y la estimulación de los A<sub>2A</sub>R con CGS21680 incrementaba significativamente la fosforilación del RyR2 en ser-2808 en pacientes con FA.

En cambio, nuestros resultados no sustentan una modulación de la dinámica del calcio por otros mecanismos. Así, CGS21680 no tuvo efectos significativos sobre la amplitud de la I<sub>Ca</sub>. Además, CGS21680 tampoco afectó ni a la amplitud y desaparición de los *Ca sparks*, ni a la amplitud de las corrientes I<sub>NCX</sub> espontáneas, ni a la cantidad de calcio liberado por una aplicación rápida de cafeína.

Todo esto indicaría que la activación de los A<sub>2A</sub>R no modifica la cantidad de calcio eliminado durante las corrientes I<sub>NCX</sub> espontáneas y, por consiguiente, no es probable que la activación de los A<sub>2A</sub>R incremente la entrada de calcio entre dos I<sub>NCX</sub> sucesivas. La falta de efecto de CGS21680 no se debió a defectos en la vía de señalización del A<sub>2A</sub>R puesto que la estimulación beta-adrenérgica incrementó la amplitud de I<sub>Ca</sub> y las I<sub>NCX</sub> inducidas por la aplicación de cafeína, como ya ha sido publicado en miocitos ventriculares de pequeños roedores<sup>248, 250, 251</sup>. Además, el efecto estimulador de CGS21680 era comparable en miocitos con el potencial de reposo fijado a -80 mV (figura 4B) y en miocitos no sometidos a patch-clamp (figura 3B), lo cual asegura que el efecto de CGS21680 no se debe a un efecto sobre el potencial de membrana en reposo que podría modular la liberación espontánea de calcio del SR<sup>252, 253</sup>.

De acuerdo con estos resultados, hay experimentos que muestran que la estimulación de los A<sub>2A</sub>R en ventrículo de cobaya incrementa el nivel de AMPc pero no la fosforilación de PLB<sup>188</sup>.



### 1.4.3. Implicaciones clínicas

Aunque el potencial arritmogénico de la liberación espontánea de calcio del SR en miocitos auriculares humanos no está directamente tratado en este estudio, otras investigaciones han mostrado la inducción de post-despolarizaciones y actividad repetitiva por liberaciones sarcoplasmáticas de calcio<sup>236</sup>, así como la capacidad de las post-despolarizaciones para reiniciar fibrilación auricular en preparaciones de aurícula derecha canina<sup>237</sup>. Además, la automaticidad anormal, uno de los dos principales mecanismos de arritmias auriculares, junto con la actividad repetitiva<sup>206</sup>, está favorecida por las liberaciones espontáneas de calcio del SR en células auriculares marcapasos latentes<sup>6</sup>. Por ello, circunstancias que favorezcan la liberación anormal de calcio del SR podrían, teóricamente, contribuir al mantenimiento o la recurrencia de la FA. La novedad de nuestro estudio es que muestra por primera vez un incremento en la expresión de los A<sub>2A</sub>R en pacientes con FA, que podría contribuir a la domesticación de la AF mediante la estimulación de una mayor liberación espontánea de calcio en miocitos auriculares de estos pacientes. El remodelado de los receptores opioides, de angiotensina y de IP3, como han establecido otros estudios en tejido auricular humano<sup>242, 243</sup>, podrían actuar en coordinación con los receptores de adenosina, ya que también intervienen en la regulación de la dinámica del calcio intracelular.

Interesantemente, este estudio muestra que la inhibición de los A<sub>2A</sub>R causa una fuerte reducción de las liberaciones de calcio del SR realizadas por RyR2 en miocitos de pacientes con FA sin comprometer la contribución de otros mecanismos reguladores del calcio como la carga de calcio del SR o la corriente de calcio tipo-L.

La prevención de la FA con drogas que bloquean los A<sub>2A</sub>R no se han evaluado todavía, pero nuestro estudio da motivos para considerarlos una opción válida. Así, inhibición de los A<sub>2A</sub>R reduce la liberación espontánea de calcio en miocitos de pacientes con FA a niveles observados en pacientes sin la FA, sin inhibir a otros mecanismos reguladores del calcio como la corriente de calcio tipo-L. De hecho, medicamentos dirigidos a otros receptores celulares sometidos a un remodelado en la FA, como los receptores de angiotensina, están dando buenos resultados<sup>254</sup>.

### 1.4.4. Consideraciones del modelo

Una de las complicaciones en la interpretación de datos obtenidos en cardiomiocitos humanos son las diferencias clínicas o terapéuticas entre pacientes, ya que podrían provocar una desviación en los resultados. En este estudio se contempló este asunto de

diferentes maneras. En primer lugar, se eliminaron de este estudio los miocitos de pacientes con tratamientos farmacológicos, como los antagonistas del calcio, que cabría esperar que interfirieran de forma directa en la homeostasis del calcio intracelular. Además, pacientes con una historia clínica sin fibrilación auricular solamente fueron incluidos en el estudio si el tamaño auricular (de la aurícula izquierda) era normal (diámetro de 40 mm o menos), para evitar posibles efectos causados por la dilatación auricular en el grupo control. No podemos descartar que otros parámetros clínicos o terapéuticos puedan tener impacto sobre nuestros datos, pero los resultados obtenidos están de acuerdo con publicaciones anteriores sobre el remodelado de la liberación espontánea de calcio y de la  $I_{Ca}$  en miocitos aislados de pacientes con fibrilación auricular<sup>3, 72</sup>. Además, la estimulación de las  $I_{NCX}$  espontáneas por la activación de los  $A_{2A}R$  esta de acuerdo con resultados anteriores de nuestro laboratorio<sup>138</sup>. Por ultimo, el uso de fármacos siempre conlleva el riesgo de efectos no específicos. Sin embargo, los antagonistas de los  $A_{2A}R$  utilizados son altamente selectivos para este receptor frente a los otros receptores de adenosina.

En resumen, a nuestro mejor entender, este es el primer estudio que demuestra una relación funcional entre el elevado nivel basal de liberaciones espontáneas de calcio del SR en miocitos de pacientes con FA y la sobre expresión de los  $A_{2A}R$ , así como la fosforilación de los RyR2. Nuestros resultados apuntan a la activación anormal de los  $A_{2A}R$  en FA como mecanismo para el asentamiento de la FA. Además, la disminución de las liberaciones espontáneas de calcio del SR gracias a antagonistas de los  $A_{2A}R$  observada en miocitos de pacientes con FA, proporciona un base fisiopatológica razonable para ensayar el bloqueo de los  $A_{2A}R$  como un nuevo enfoque para prevenir la recurrencia de la fibrilación auricular.



## 2. Regulación de la respuesta del calcio latido-latido por el calcio en miocitos auriculares humanos

### 2.1. Introducción

Los cambios latido-latido en la morfología del segmento ST y la onda T (alternancia eléctrica) y en la contracción (alternancia mecánica) es un fenómeno observado en varias patologías (cardiomiopatía, isquemia, insuficiencia cardíaca y fibrilación auricular (FA))<sup>7, 221, 255, 256</sup>, anunciando la aparición de FA<sup>7, 257</sup> y arritmias ventriculares severas<sup>258, 259</sup>. La alternancia en la amplitud y en la duración del potencial de acción suele ser el mecanismo subyacente de la alternancia eléctrica<sup>256</sup>. En condiciones fisiológicas, la alternancia eléctrica del potencial de acción puede inducirse artificialmente incrementando la frecuencia del corazón<sup>7, 224</sup>.

Modelos experimentales han revelado que el desarrollo de la alternancia eléctrica y mecánica depende de la concentración plasmática de calcio, de modo que la alternancia puede inducirse reduciendo la concentración plasmática de calcio con agentes quelantes de calcio como por ejemplo EDTA<sup>224, 260</sup>. Además, la alternancia eléctrica y mecánica se puede revertir mediante la administración de calcio en humanos<sup>256</sup>. Asimismo, se ha observado que la reducción del calcio que entra por los canales de calcio tipo-L, en miocitos ventriculares de rata, induce alternancia en el calcio causada por alternancia en el calcio liberado del SR<sup>8, 213, 214, 261</sup>. También se ha inducido la alternancia en los niveles del calcio intracelular en miocitos de mamífero mediante inhibición metabólica<sup>262, 263</sup>, o incrementando la frecuencia de estimulación<sup>213, 220</sup> y se ha atribuido a heterogeneidades inter y/o intra celulares en la dinámica del calcio<sup>213, 218, 220, 261</sup>. Se ha observado que, en la aurícula humana, la alternancia electromecánica podría preceder e inducir FA<sup>7</sup>, y a nivel celular la FA ha sido asociada a una disminución de la corriente de calcio tipo-L ( $I_{Ca}$ )<sup>72</sup> y un incremento en las liberaciones espontáneas de calcio del SR<sup>3</sup>. A pesar de estos estudios, no está claro cómo las alteraciones patológicas en la dinámica intracelular del calcio afectan a la incidencia y la naturaleza de la dinámica del calcio intracelular latido-latido cuando la frecuencia de estimulación se aumenta.

Con el fin de estudiar esta cuestión, hemos utilizado la técnica del patch-clamp y visualización del calcio intracelular por microscopía confocal para determinar cómo la estabilidad la dinámica del calcio latido-latido, depende de la densidad de  $I_{Ca}$  y la liberación espontáneas de calcio, en miocitos auriculares humanos. Nuestros resultados muestran que la naturaleza de la respuesta latido-latido de la dinámica del calcio intracelular se modula por la densidad de la  $I_{Ca}$  y por la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR en reposo. Además, la inhibición parcial de la  $I_{Ca}$  o del RyR2 redujo la incidencia de

alteraciones en la respuesta latido-latido, lo cual apoya el uso de fármacos que regulan la  $I_{Ca}$  o la actividad del RyR2, para mejorar la estabilidad latido-latido de la dinámica del calcio intracelular en miocitos auriculares humanos.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Miocitos auriculares humano**

Se aislaron miocitos de muestras de tejido auricular humano por digestión enzimática como se ha descrito anteriormente <sup>3</sup>. Se usaron un total de 177 miocitos de 114 pacientes para los experimentos de este estudio. Los miocitos se aislaron a partir de muestras de tejido de pacientes que no presentaban en su historia clínica antecedentes de FA. Los pacientes que han recibido tratamiento con antagonistas del calcio han sido excluidos del estudio.

Aunque las muestras de tejido obtenidas para el estudio es tejido que normalmente se descarta durante la cirugía, se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente para la obtención de las muestras. El protocolo ha sido aprobado por el comité ético del Hospital y cumple con la Declaración de Principios de Helsinki.

### **2.2.2. Imágenes de calcio por confocal**

Para visualizar los cambios en la concentración intracelular de calcio, los miocitos fueron incubados con 2.5  $\mu$ M de fluo-4AM durante 15 min, seguido por un lavado y de-esterificación de al menos 30 min. Se visualizó el calcio por microscopía confocal a una frecuencia de muestreo de 100 Hz utilizando un microscopio confocal de escaneo resonante Leica SP5 AOBS. Se excitó el fluo-4 a 488 nm y las imágenes se formaron por la emisión de fluorescencia captada entre 500 y 650 nm. Se fijó la energía del láser al 20% del máximo y esa energía se atenuó al 4%. Se cuantificaron los cambios globales del calcio intracelular usando una Región de Interés (ROI) que cubría la totalidad de la célula, y los cambios locales se cuantificaron con ROIs específicas cuando se consideró oportuno (ver figuras 16-18).

### **2.2.3. Técnica de patch-clamp**

Se midieron las corrientes iónicas (corriente de calcio tipo-L, la corriente de cola, las corrientes de intercambio Na-Ca espontáneas e inducidas por cafeína) mediante la técnica de patch-clamp perforado en miocitos auriculares humanos, tal y como se ha descrito anteriormente <sup>3</sup>. Se usó la integral de la corriente de intercambio Na-Ca inducida por la aplicación rápida de 10 mM de cafeína como medida del contenido de calcio del SR <sup>138</sup>. Las variaciones latido-latido en el calcio intracelular y en las corrientes iónicas fueron inducidas por un incremento paulatino en la frecuencia de las despolarizaciones repetitivas de 0.2 a 2 Hz. Las soluciones de stock de rianodina (100 mM), nifedipino (10 mM) y Bay-K8644 (1 mM) se prepararon por disolución en DMSO.

### **2.2.4. Análisis de datos y estadística**

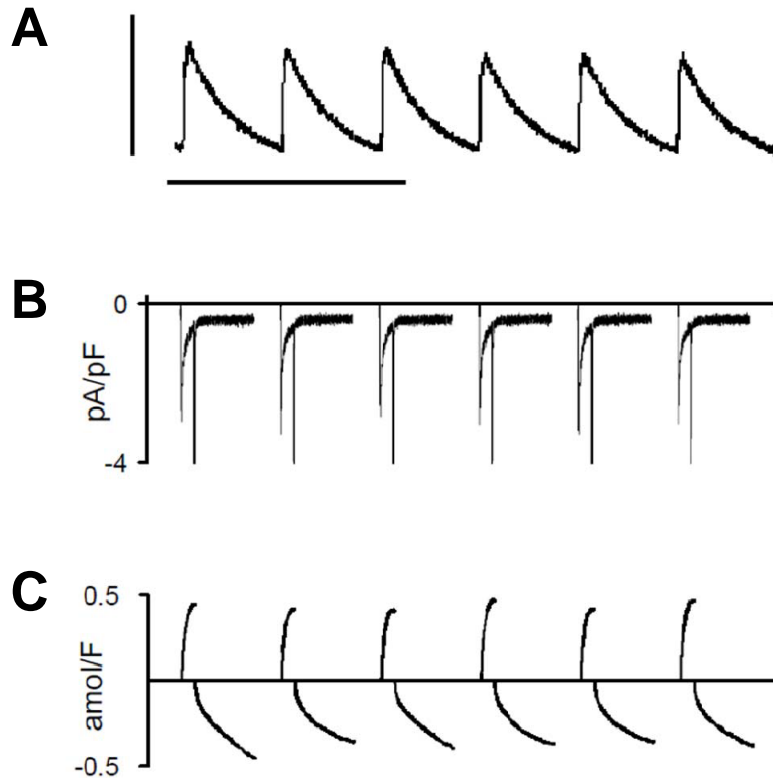
Los experimentos se realizaron sin el conocimiento de la historia clínica de los pacientes. Los valores utilizados para caracterizar los *Ca sparks* y las ondas de calcio de cada paciente se obtuvieron como la media de los miocitos del mismo paciente. Los valores de cada paciente fueron usados para el análisis estadístico y están expresados como la media  $\pm$  s.e.m. Se comprobó la normalidad de los datos. Se ha llevado a cabo el test t de Student para determinar si un efecto específico era significativo. En los experimentos donde se comparan múltiples variables o efectos se ha usado ANOVA y después el test Student-Newman-Keuls para evaluar si los efectos específicos eran significativos.

## **2.3. Resultados**

### **2.3.1. Dinámica del calcio intracelular latido-latido en miocitos auriculares humanos**

Con el fin de caracterizar la naturaleza de la respuesta latido-latido y la incidencia las de respuestas uniformes, alternantes e irregulares y su dependencia de la frecuencia de estimulación en miocitos auriculares humanos, se investigó su respuesta a un incremento paulatino en la frecuencia de estimulación de 0.2 a 2 Hz. A una frecuencia de 0.25 Hz, todos los miocitos examinados estaban en estado estacionario y presentaban una respuesta latido-latido uniforme. La figura 12 muestra registros consecutivos de incrementos transitorios de calcio intracelular (panel A) y las corrientes de membrana correspondientes (panel B) en un miocito representativo con una respuesta latido-latido

uniforme. La cuantificación de los flujos de calcio a través del sarcolema (panel c) muestra que la célula estaba en estado estacionario donde la salida de calcio ( $I_{tail}$ ) iguala a la entrada.

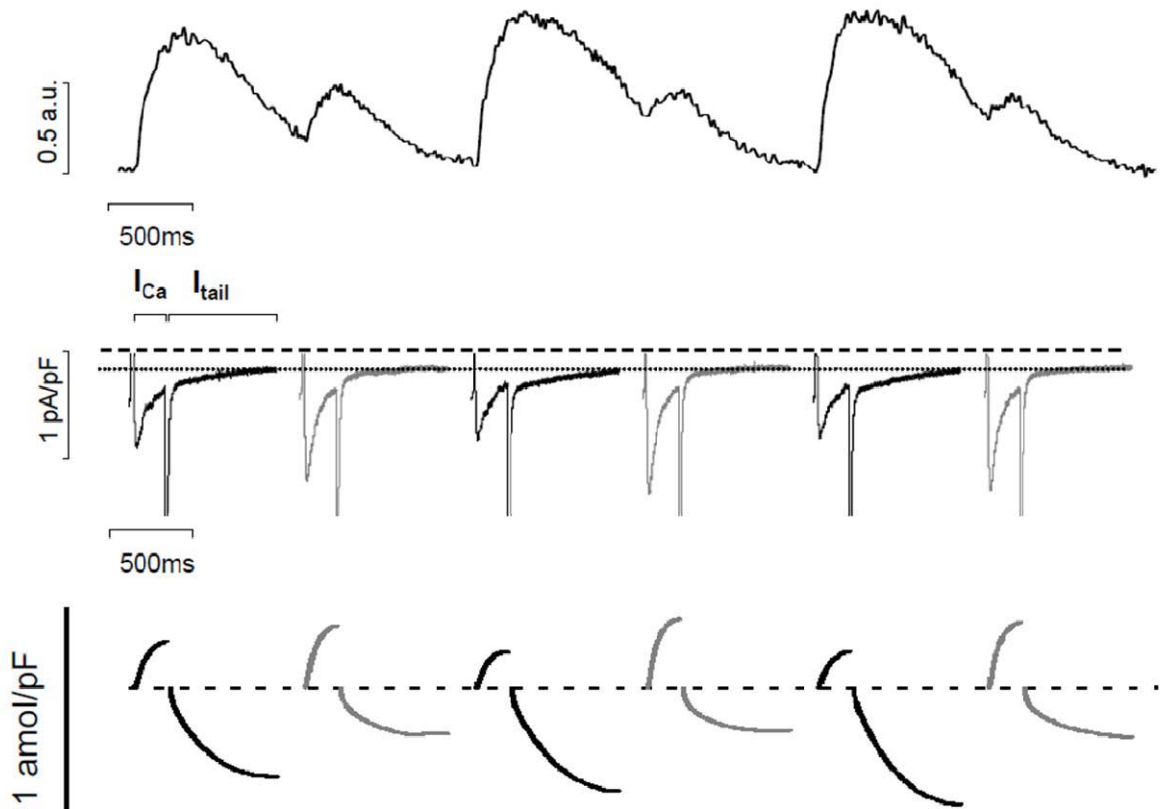


**Figura 12. Respuesta latido-latido uniforme en miocitos auriculares humanos.** **A:** Corrientes transitorias de calcio provocadas por despolarizaciones de membrana consecutivas de 0.25 Hz. Las barras de escala vertical y horizontal representan 0.5 u.a. y 10 s respectivamente. **B:** Corrientes de membrana correspondientes. La escala vertical representa 1 pA/pF y la horizontal 200 ms. **C:** Integral de las corrientes de membrana  $I_{Ca}$  e  $I_{tail}$  del panel B. La escala vertical representa 1 amol/pF y la horizontal 200 ms.

### 2.3.2. Efecto de la frecuencia de estimulación sobre la respuesta latido-latido en miocitos auriculares humanos

Cuando se incrementó la frecuencia de estimulación de forma escalonada de 0.2 a 2 Hz se obtuvieron tres diferentes respuestas latido-latido (uniformes, alternantes e irregulares). La respuesta uniforme, descrita en el apartado anterior, se observó a todas las frecuencias de estimulación en 12 de los 44 miocitos sometidos a este protocolo de estimulación. La respuesta alternante (que muestra la figura 13) se observó en 8 de los 44 miocitos y consistía en alternancias repetitivas en la amplitud de los incrementos transitorios de la concentración de calcio (panel superior), en la amplitud de la  $I_{Ca}$  y la corriente de cola

(panel central), y en los flujos de calcio a través del sarcolema (panel inferior). Cabe resaltar que las alternancias en la entrada de calcio ( $I_{Ca}$ ) estaban desfasadas con respecto a las alternancias en las corrientes de salida de calcio ( $I_{tail}$ ) y los incrementos transitorios de calcio.

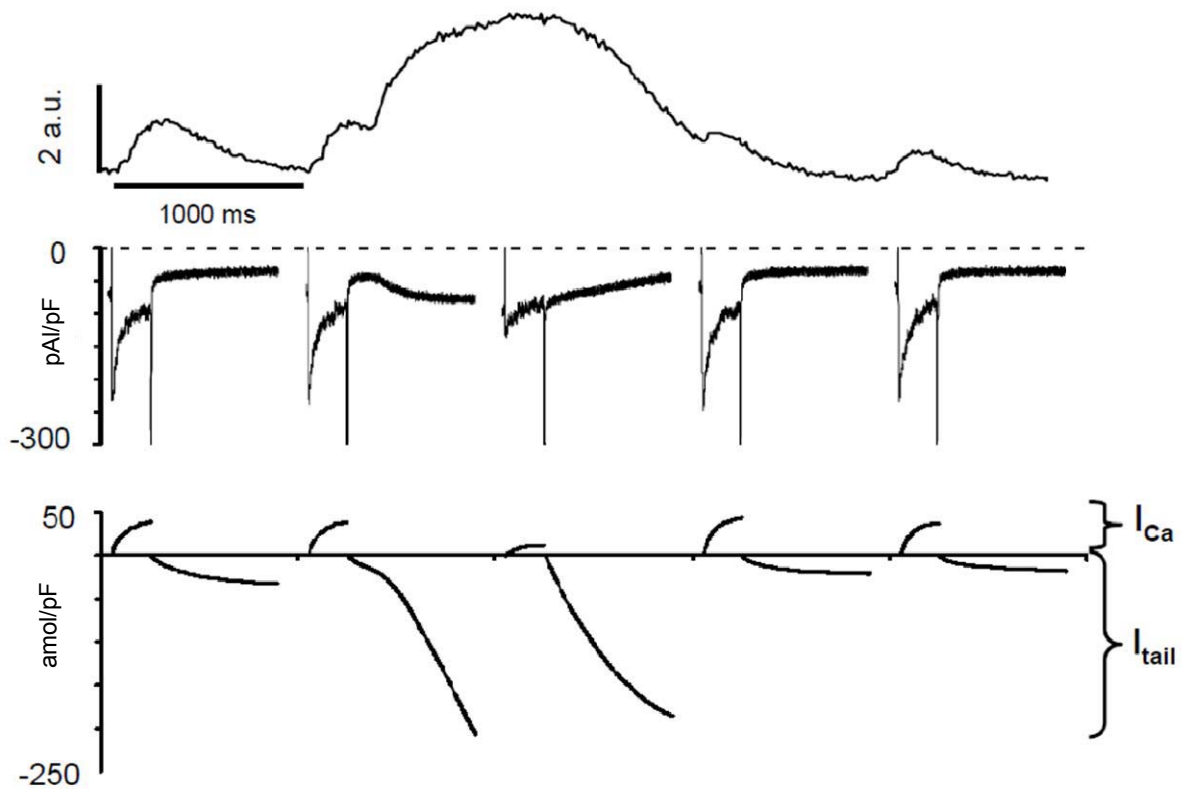


**Figura 13. Alternancia latido-latido en miocitos auriculares humanos.** Seis registros de corrientes consecutivas de un miocito con respuesta alternante en las corrientes transitorias de calcio (panel superior), las corrientes de membrana  $I_{Ca}$  e  $I_{tail}$  (panel del medio) y la integral de  $I_{Ca}$  e  $I_{tail}$  (panel inferior). Para apreciar la alternancia en  $I_{tail}$ , se ha dibujado una línea punteada a  $-80$  mV a lo largo del panel, y la línea discontinua indica  $0$  pA/pF.

En la mayoría (24 de 44) de los miocitos examinados, un aumento en la frecuencia inducía una respuesta irregular (figura 14). Esta respuesta consistía en patrones irregulares de pequeños incrementos transitorios de calcio, intercalados con grandes incrementos transitorios en la concentración de calcio, que abarcaban varios pulsos de estimulación (panel superior). El panel central de la figura 14 muestra las correspondientes respuestas de la  $I_{Ca}$  e  $I_{tail}$  y el panel inferior muestra los movimientos del calcio en el sarcolema durante cada pulso. Cabe destacar que el gran incremento en el nivel del calcio intracelular



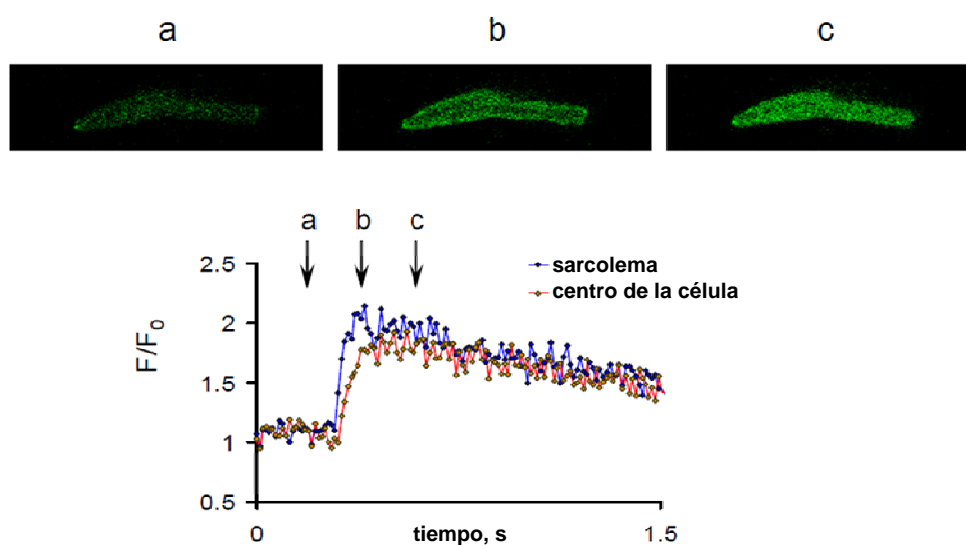
producido durante los incrementos transitorios de calcio grandes iba asociado con una depresión concurrente de la  $I_{Ca}$ . De hecho, la severidad de la depresión de  $I_{Ca}$  era proporcional a la amplitud del correspondiente incremento en la concentración de calcio. Además, la integral de la  $I_{tail}$  fue una fiel referencia del pico en el nivel citosólico de calcio durante cada despolarización en todos los miocitos con respuestas alternantes o irregulares. Por ello, los cambios en la integral de estas corrientes de cola en base a la respuesta latido-latido fueron usados para clasificar el patrón latido-latido en experimentos posteriores donde solamente se aplicó la técnica del patch-clamp en los miocitos.



**Figura 14. Alteraciones en la respuesta latido-latido en miocitos auriculares humanos.** Registros de corrientes consecutivas de un miocito con una respuesta latido-latido irregular en los incrementos transitorios de calcio (panel superior), las corrientes de membrana  $I_{Ca}$  e  $I_{tail}$  (panel central) y la integral de la  $I_{Ca}$  e  $I_{tail}$  (panel inferior). Destacar que el pico de  $I_{Ca}$  era inversamente proporcional a la amplitud de los incrementos transitorios de calcio.

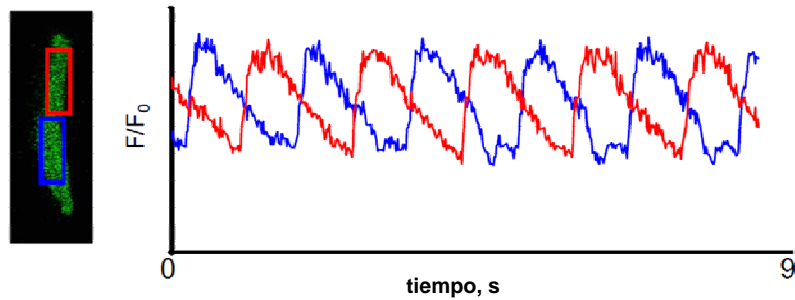
### 2.3.3. Efecto de la frecuencia de estimulación sobre la dinámica del calcio subcelular en miocitos auriculares humanos

La combinación de la técnica de patch-clamp con la de microscopía confocal permitió analizar cómo la frecuencia de estimulación afecta a la dinámica local del calcio. Específicamente, el análisis transversal de los incrementos transitorios en la concentración de calcio reveló un retraso temporal, entre las concentraciones registradas en el sarcolema y la región central, de los miocitos con una respuesta latido-latido uniforme (figura 15). Por el contrario, no se observaron heterogeneidades de los incrementos transitorios de calcio en el eje longitudinal de las células con una respuesta latido-latido uniforme.



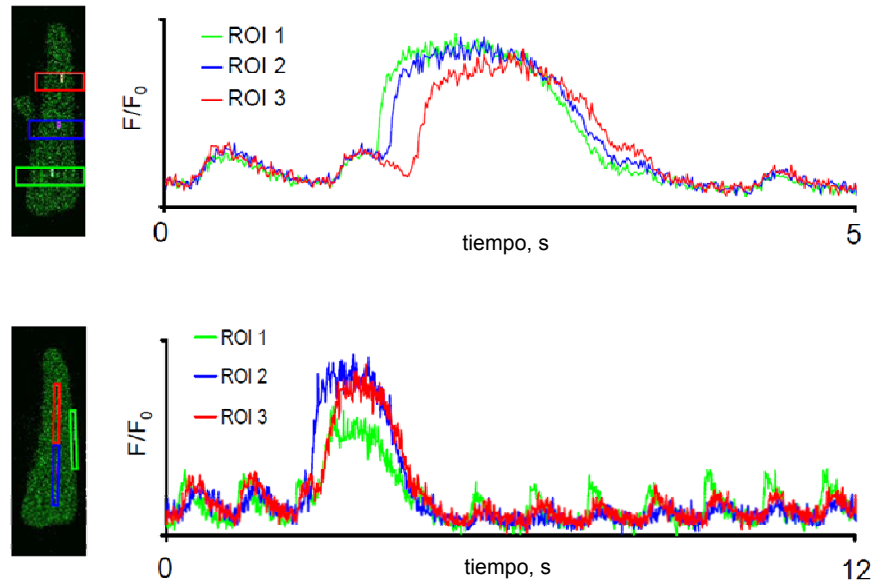
**Figura 15. Respuesta latido-latido uniforme de los incrementos transitorios en la concentración de calcio.** La parte superior del panel muestra imágenes consecutivas registradas 20 ms antes y 120 ms después de la despolarización de un miocito con un patrón latido-latido uniforme. La parte inferior muestra las cuantificaciones superpuestas del calcio en el sarcolema y en el centro de la célula.

Específicamente, el análisis transversal de los incrementos transitorios en la concentración de calcio reveló un retraso temporal entre las concentraciones registradas en el sarcolema y la región central de los miocitos con una respuesta latido-latido uniforme (figura 15). Por el contrario, no se observaron heterogeneidades de los incrementos transitorios de calcio en el eje longitudinal de las células con una respuesta latido-latido uniforme.



**Figura 16. Respuesta latido-latido alternante de los incrementos transitorios en la concentración de calcio.** Registros de un miocito, estimulado a 2 Hz, con alternancia discordante en el calcio a nivel subcelular. La imagen de la izquierda indica, mediante dos rectángulos, las áreas usadas en la cuantificación del calcio que se muestran a la derecha, mostrando la alternancia discordante de los incrementos transitorios de calcio.

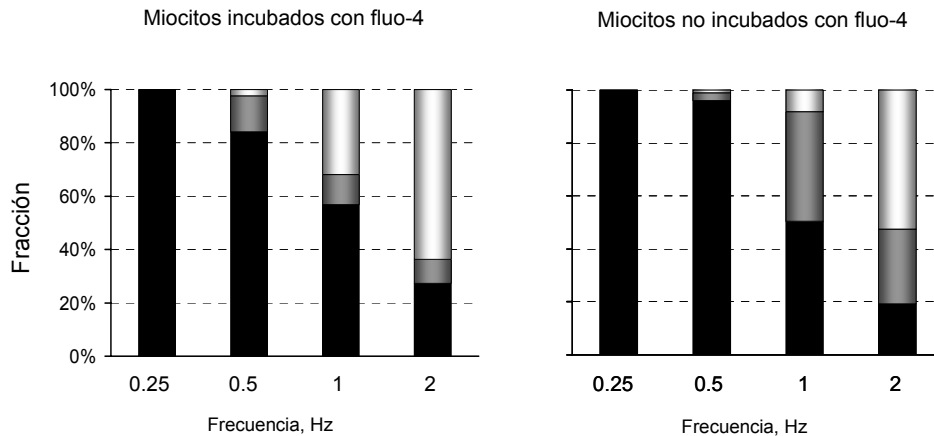
Por otro lado, el análisis de los incrementos transitorios de calcio locales reveló que unos pocos miocitos tenían alternancias discordantes en el nivel del calcio citosólico en diferentes regiones de una célula (figura 16). El análisis del calcio local también reveló que los miocitos con una respuesta latido-latido irregular mostraban heterogeneidad en los incrementos transitorios de calcio en el eje longitudinal. La figura 17 muestra un ejemplo donde se observó una heterogeneidad muy pronunciada en los incrementos transitorios de calcio grandes, registrada a lo largo del eje longitudinal en miocitos con respuestas latido-latido irregulares. Este análisis documenta específicamente que, mientras los incrementos transitorios pequeños eran uniformes a lo largo del eje longitudinal, los incrementos transitorios grandes eran ondas de calcio que se propagaban a través del miocito (figura 17, panel superior). Además, este análisis muestra que el retraso temporal entre el sarcolema y la región central del miocito estaba presente en los incrementos transitorios de calcio pequeños, pero no en las grandes. De hecho, la diferencia entre las concentraciones de calcio registradas en el sarcolema y en la región central, estaban exacerbadas después de un incremento transitorio en la concentración de calcio grande, lo que indica que los incrementos transitorios en el sarcolema probablemente reflejan entradas de calcio a través de los canales de calcio tipo-L (figura 17, panel inferior).



**Figura 17. Cuantificación de señales locales de calcio.** El panel superior muestra la imagen de un miocito (a la izquierda), indicando las regiones de interés (ROIs) utilizadas para la cuantificación de señales de calcio locales a través del eje longitudinal en un miocito con una respuesta irregular. Los incrementos transitorios correspondientes se muestran a la derecha de la figura. En la parte inferior se muestra una imagen del mismo miocito con las ROIs utilizadas para cuantificar los incrementos transitorios de calcio en el sarcolema y en el centro del miocito. Los incrementos transitorios correspondientes se muestran a la derecha de la figura.

#### 2.3.4. Mecanismos subyacentes a la inducción de la respuesta latido-latido alternante

Con el fin de dilucidar los mecanismos celulares subyacentes a la aparición de respuestas alternantes e irregulares por frecuencias de estimulación crecientes, investigamos primero la influencia que el tamponado de calcio intracelular pudiera tener sobre la respuesta latido-latido, comparando la respuesta de los 44 miocitos incubados con fluo-4 con la respuesta de 99 miocitos no incubados con el fluoróforo. Tal y como muestra la figura 18, la incubación con fluo-4 reduce las respuestas alternantes a todas las frecuencias de estimulación y se incrementa la incidencia de respuestas irregulares.

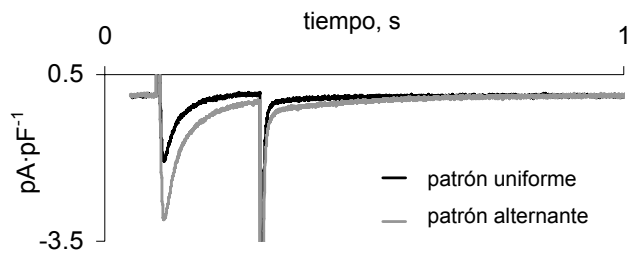


**Figura 18. Efecto del tamponado de calcio intracelular en la respuesta latido-latido.** A la izquierda, se muestra la distribución de las respuestas latido-latido según la frecuencia de estimulación en 44 miocitos auriculares humanos incubados con fluo-4. A la derecha, se muestra la distribución de la respuesta latido-latido según la frecuencia de estimulación en 99 miocitos auriculares humanos no incubados con fluo-4. La respuesta uniforme está representada en negra, la respuesta alternante en gris y la respuesta irregular en blanco.

Por este motivo, los experimentos posteriores se realizaron en miocitos sin fluo-4. Encontramos que 30 células de 133 (23%) presentaban una respuesta uniforme a todas las frecuencias de estimulación. El resto de las células, 78 (59%) presentaban primero una respuesta alternante. Las 25 células restantes (19%), tenían una respuesta irregular que no estaba precedida por una respuesta alternante.

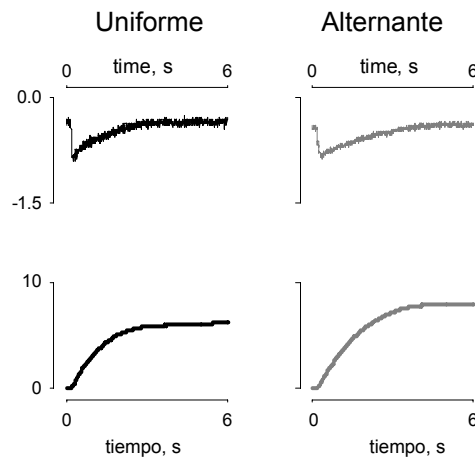
Para investigar si habían diferencias inherentes en los mecanismos específicos de la dinámica del calcio entre los miocitos que presentaban los tres diferentes patrones latido-latido, medimos la densidad de la  $I_{Ca}$  bajo condiciones en las que la entrada y la salida de calcio estuvieran en estado estacionario (0.2 Hz), así como el contenido de calcio del SR liberado por cafeína y la frecuencia de  $I_{NCX}$  espontáneas en reposo en todos los miocitos. Entonces se hizo la media de los miocitos que presentaban respuestas de patrón uniforme, alternante e irregular.

La figura 19 muestra que la densidad de  $I_{Ca}$  era significativamente mayor en las células que presentaban un patrón alternante cuando se incrementaba la frecuencia de estimulación que las células con un patrón uniforme.



**Figura 19. Influencia de  $I_{Ca}$  sobre la respuesta latido-latido.** La figura muestra registros representativos de la  $I_{Ca}$  obtenidos mediante una despolarización de 200 ms en un miocito con patrón uniforme y otro con patrón alternante.

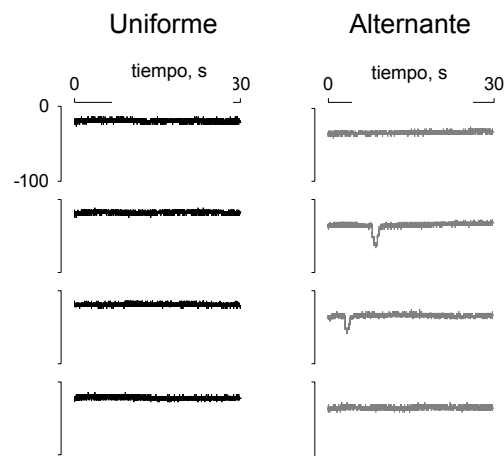
Por otro lado, los miocitos que presentaban un patrón irregular tenían una densidad de  $I_{Ca}$  comparable a la de miocitos con un patrón latido-latido uniforme, lo que sugiere que miocitos con amplitudes de  $I_{Ca}$  grandes son más propensos a presentar patrones latido-latido alternantes. La figura 20 muestra que la integral de la corriente  $I_{NCX}$  inducida por cafeína era más pequeña en miocitos con patrones uniformes y significativamente mayor en miocitos con patrones latido-latido irregulares ( $p=0.01$ ).



**Figura 20. Influencia del contenido de calcio del SR en la respuesta latido-latido.** La figura muestra registros representativos de la corriente obtenida mediante una aplicación rápida de cafeína y la integral correspondiente, en un miocito con patrón latido-latido uniforme y otro con una patrón latido-latido alternante.

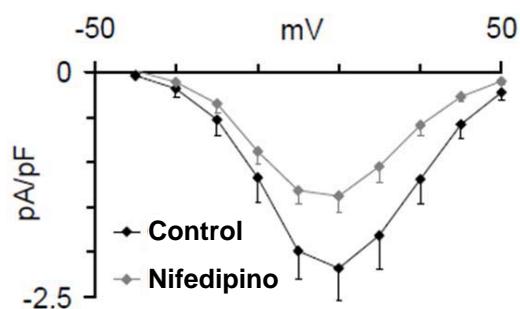
Esto último podría sugerir que las ondas de calcio observadas durante las respuestas latido-latido irregulares (figura 14) eran ondas de calcio inducidas por una sobrecarga de calcio. Además, la labilidad del calcio del SR, estimada por la frecuencia de corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas (figura 21), era mayor en miocitos con patrones alternantes, intermedia en miocitos con patrones irregulares y menor en los que tenían patrón uniforme ( $p=0.003$ ).

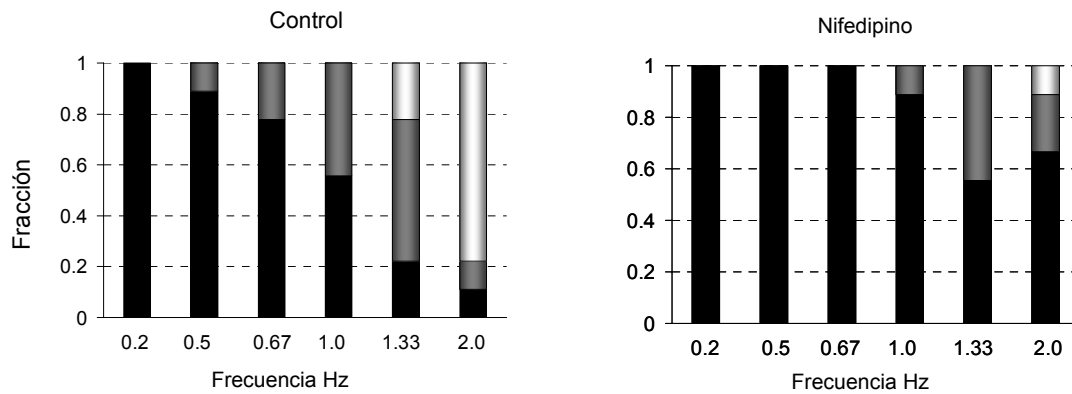
Esto sugiere que la alternancia se induce preferentemente en miocitos con el calcio del SR lábil.



**Figura 21. Influencia de las liberaciones de calcio del SR sobre la respuesta latido-latido.** Registros de corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas de un miocito con patrón latido-latido uniforme y uno con patrón latido-latido alternante.

Para comprobar si la densidad de  $I_{Ca}$  y el manejo del calcio por el SR determinan la respuesta latido-latido dependiente de frecuencia, se manipuló farmacológicamente los canales de calcio tipo-L y la liberación de calcio del SR. Primero, se inhibió parcialmente la  $I_{Ca}$  con el antagonista selectivo de los canales de calcio tipo-L, nifedipino, o se estimuló con el agonista Bay-K8644 en 9 células.

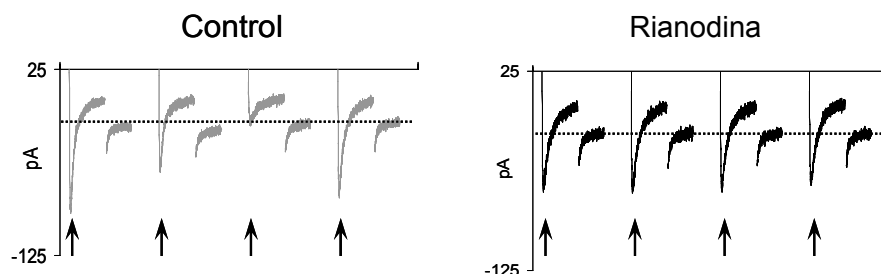




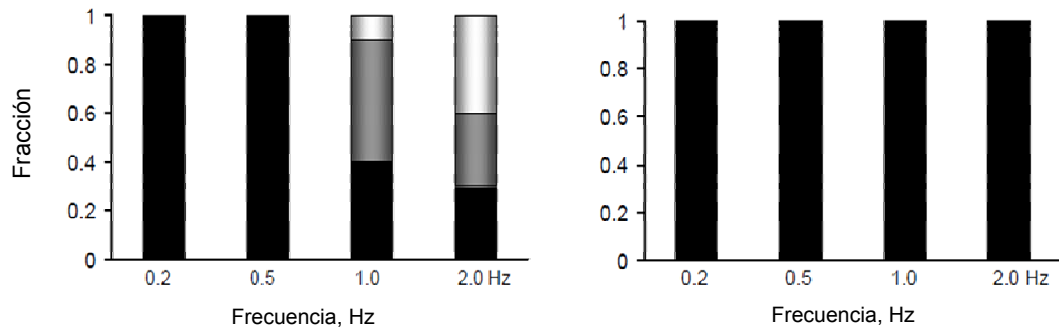
**Figura 22. La inhibición de  $I_{Ca}$  estabiliza la respuesta latido-latido.** Arriba se muestra la media del efecto de nifedipino sobre la curva Intensidad-Voltaje. En la parte inferior de la figura se observa la distribución de las respuestas latido-latido según la frecuencia de estimulación aplicada, el condiciones control (izquierda) y en presencia de 50 nM de nifedipino (derecha).

La figura 22 muestra que la reducción de  $I_{Ca}$  con 50 nM de nifedipino reduce el número de células con alternancia latido-latido. Además, el umbral de frecuencia de estimulación necesaria para la inducción de una respuesta alternante incrementó significativamente con la perfusión de nifedipino ( $p < 0.05$ ,  $n = 9$ ). La subsiguiente estimulación de  $I_{Ca}$  con 100 nM Bay-K8644 inducía variaciones latido-latido en todas las células y disminuyó el umbral de la frecuencia de estimulación necesaria para su inducción de  $1.30 \pm 0.21$  a  $0.87 \pm 0.10$  Hz ( $p < 0.05$ ).

Después, se bloqueó la liberación de calcio del SR con 150-400  $\mu\text{M}$  de rianodina ( $n = 10$ ) o con 250-1000  $\mu\text{M}$  de tetracaína ( $n = 9$ ). Tal y como muestra la figura 23, la inhibición de la liberación de calcio del SR eliminó completamente las respuestas no-uniformes a todas las frecuencias de estimulación ensayadas.







**Figura 23. La inhibición de la liberación de calcio del SR estabiliza la respuesta latido-latido.** Arriba se muestran registros de las corrientes de membrana antes (control) y después de la inhibición de la liberación de calcio del SR con 100  $\mu\text{M}$  de rianodina. Abajo, la distribución de las respuestas latido-latido según la frecuencia de estimulación aplicada (uniforme en negro, alternante en gris e irregular en blanco), el condiciones control (izquierda) y en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de rianodina (derecha).

## 2.4. Discusión

El hallazgo más importante de este estudio es que la densidad de la  $I_{\text{Ca}}$ , el contenido de calcio del SR y la incidencia de corrientes de intercambio Na-Ca espontáneas determinan la naturaleza y el umbral de la frecuencia de aparición de las alternancias o irregularidades en la respuesta latido-latido de miocitos auriculares humanos. Esto sugiere que un delicado feedback entre la amplitud de la  $I_{\text{Ca}}$  y la liberación de calcio del SR es el responsable del control dinámico del manejo del calcio intracelular latido-latido. En concreto, hemos comprobado que una inhibición parcial de la  $I_{\text{Ca}}$  o de la liberación de calcio del SR incrementa la incidencia de respuestas uniformes, lo que sugiere que estos mecanismos podrían ser nuevas dianas terapéuticas para estabilizar la respuesta latido-latido en miocitos auriculares humanos.

### 2.4.1. Origen de la alternancia latido-latido en miocitos auriculares humanos

En este estudio se analizó el efecto de la frecuencia de estimulación sobre la respuesta latido-latido en un total de 177 miocitos auriculares, aislados de 114 pacientes sometidos a cirugía cardíaca. De acuerdo con estudios clínicos <sup>258, 264</sup>, las respuestas alternantes o irregulares se indujeron mediante el incremento de la frecuencia de estimulación. Las alternancias en  $I_{\text{Ca}}$ , cuando se observaban, estaban desfasadas con respecto a las alternancias en las corrientes transitorias de calcio, sugiriendo que la alternancia de  $I_{\text{Ca}}$  es una consecuencia más que una causa de de la alternancia en el calcio. De hecho, la

amplitud de  $I_{Ca}$  por lo general era inversamente proporcional a la concentración de calcio diastólica en el momento de la activación de la  $I_{Ca}$  (ver figuras 13). Por el contrario, hubo siempre concordancia en el tiempo entre la amplitud del pico de los incrementos transitorios en la concentración de calcio y la integral de  $I_{tail}$ , y la inhibición de la liberación de calcio del SR eliminó completamente las respuestas alternantes e irregulares (ver figura 23) en todos los miocitos estudiados, sugiriendo que la inducción de irregularidades en la respuesta latido-latido dependen de la liberación de calcio del SR. Estos resultados concuerdan con estudios en modelos animales que sugieren que la alternancia en la liberación del calcio del SR es el factor clave para la génesis de alternancia del calcio intracelular<sup>213, 214, 220, 261</sup>.

Por otro lado hubo una heterogeneidad sorprendentemente grande en la naturaleza de las respuestas latido-latido y en la frecuencia de aparición de las mismas, entre los miocitos auriculares humanos estudiados. Esta heterogeneidad sugiere, por un lado, que la respuesta latido-latido viene determinada por una compleja interacción entre diferentes mecanismos reguladores del calcio. Por otro lado, esta heterogeneidad podría proporcionar un substrato celular para la génesis de alternancia discordante y de arritmias en tejido auricular humano. En efecto, mediciones de los incrementos transitorios de calcio en corazones perfundidos de rata han mostrado que un incremento en la frecuencia de estimulación puede producir una variación considerable en las respuestas latido-latido entre una serie de miocitos conectados<sup>220</sup>.

#### **2.4.2. Dependencia de la respuesta latido-latido del calcio**

La gran heterogeneidad en las respuestas latido-latido entre miocitos individuales también sugiere que dilucidar los mecanismos celulares por los que se rige tal heterogeneidad podría proporcionar dianas moleculares específicas para estabilizar farmacológicamente el manejo del calcio intracelular en base a la respuesta latido-latido.

En este sentido, nuestros datos muestran que la estabilidad de los incrementos transitorios en la concentración de calcio depende de mecanismos específicos tales como los canales de calcio tipo-L y los RyR2. Así, comparando la densidad de  $I_{Ca}$  (a 0.2 Hz, donde  $I_{Ca}$  está en un estado estacionario) en un total de 133 miocitos con patrones uniformes (26%), alternantes (57%) o irregulares (17%), se observó que los miocitos con patrones alternantes tenían una densidad de  $I_{Ca}$  significativamente mayor. Además, la inhibición parcial de  $I_{Ca}$  con nifedipino redujo la incidencia de alternancias latido-latido debido al incremento en el umbral para la inducción de las mismas, demostrando que una amplitud grande de  $I_{Ca}$  favorece la inducción de alternancia latido-latido dependiente de la frecuencia. De acuerdo con estos resultados, un modelo anatómico matemático en 3-D de

la aurícula humana ha mostrado recientemente que una premisa para el desarrollo de la alternancia eléctrica y la FA, en este modelo, es un incremento en la conducción de los canales de calcio tipo-L <sup>257</sup>. También en concordancia con nuestros datos, se han mostrado que una aplicación aguda del antagonista de  $I_{Ca}$  verapamil, suprime la inducción de la FA por repolarizaciones alternantes discordantes <sup>7</sup>.

Sin embargo, este estudio muestra que el control de la respuesta latido-latido también requiere el control de la liberación de calcio del SR. Así, miocitos con patrones alternantes tienen una incidencia de liberaciones espontáneas de calcio cuatro veces superior a los que tienen un patrón uniforme, y la inhibición de la liberación de calcio a través de los RyR2 suprime completamente irregularidades en la respuesta latido-latido. Nuestros resultados parecen estar en desacuerdo con resultados obtenidos en miocitos ventriculares de rata donde se indujo la alternancia reduciendo la probabilidad de apertura del receptor de rianodina con 50  $\mu$ M de tetracaína <sup>5</sup> o reduciendo la entrada de calcio a través de la sarcolema usando pequeños y cortos pulsos de despolarización <sup>214</sup>. Es sin embargo importante enfatizar que es esperable que estas intervenciones reducen la eficacia de la  $I_{Ca}$  en activar la liberación de calcio del SR. Como consecuencia, la carga de calcio del SR en estas condiciones experimentales será anormalmente elevada y derivará probablemente en una alternancia del calcio citosólico debido a ondas espontáneas activadas por sobrecarga de calcio del SR (tal y como se muestra en la figura 16) más que alternancia del calcio inducidas por el incremento en la frecuencia de estimulación (figuras 13-14). Además, es probable que existan diferencias en la dinámica del calcio intracelular específicas de especies y tejidos, cuando se comparan miocitos ventriculares de rata y miocitos auriculares humanos <sup>265</sup>.

### **2.4.3. Implicaciones clínicas**

El remodelado de diferentes corrientes iónicas en la FA han sido propuestos como explicación para la inducción <sup>3, 72</sup> o la perpetuación de esta arritmia <sup>3, 72, 266</sup>. Entre ellos, se han documentado en pacientes con fibrilación auricular, la reducción de la  $I_{Ca}$  <sup>72</sup>, el incremento en las liberaciones de calcio del SR <sup>3</sup> y la hiperfosforilación del receptor de rianodina <sup>226</sup>. Por ello se ha propuesto, como mecanismo de inducción y/o perpetuación de la fibrilación, las despolarizaciones anormales inducidas por liberaciones espontáneas de calcio. Nuestros resultados sugieren que el remodelado eléctrico auricular de la densidad de la  $I_{Ca}$  o de la actividad del receptor de rianodina, también pueden ser importantes para el desarrollo de respuestas latido-latido alternantes o irregulares. Concretamente, la elevada incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR registrada en pacientes con FA <sup>3</sup>,

podría facilitar la inducción de respuestas alternantes, un fenómeno que precede y promueve la aparición de la FA<sup>258, 259, 267</sup>. De manera similar, la mayor densidad de  $I_{Ca}$  observada en pacientes que desarrollaron fibrilación auricular post-operatoria<sup>72</sup> favorecería las respuestas alternantes que a la vez podría inducir la FA. La reducción farmacológica de la amplitud de la  $I_{Ca}$  o de la hiperactividad del receptor de rianodina también podrían, por lo tanto, ser medios terapéuticos para reducir o prevenir la incidencia de respuestas alternantes. En efecto, se ha mostrado que un tratamiento agudo con verapamil, suprime la inducción la FA por repolarizaciones alternantes discordantes F<sup>7</sup>. Además, cabe esperar que  $A_{2A}R$  o beta-adrenérgicos que favorecen la activación del RyR2<sup>138, 217</sup>, pueden ser dianas importantes a la hora de estabilizar la respuesta latido-latido. Por otro lado, la FA también ha sido relacionada a una reducción en la densidad de  $I_{Ca}$ <sup>72</sup>, un fenómeno que podría favorecer los patrones latido-latido uniformes. Estos resultados, sin embargo, no pueden determinar si el efecto estabilizante de la reducción de  $I_{Ca}$  supera la concurrente estimulación de la liberación espontánea de calcio del SR<sup>3</sup> en la FA.

Por ultimo, nuestros resultados también demuestran que el tamponado del calcio celular afecta a la respuesta latido-latido. Hay dos aspectos importantes de este hallazgo. En primer lugar, los indicadores fluorescentes para el calcio se usan, generalmente, sin tener mucho en consideración los errores producidos por la unión del calcio citosólico al indicador de calcio, aunque ya se ha descrito que grandes cantidades de fluoróforo se unen a proteínas celulares, incrementando así su capacidad para tamponar el calcio<sup>268</sup>. Los resultados que presentamos aquí demuestran que el tamponado del calcio intracelular por fluo-4 en efecto interfiere con la dinámica del calcio intracelular en cuanto a la respuesta latido-latido en los miocitos auriculares humanos. Concretamente, la incubación de miocitos auriculares humanos suprime patrones alternantes y favorece la inducción de patrones irregulares. En segundo lugar, el remodelado de la capacidad endógena de tamponar el calcio en la FA afectaría a la respuesta latido-latido. Desconocemos mediciones directas de la capacidad de tamponar el calcio intracelular en miocitos auriculares de pacientes con o sin la FA, pero se han descrito alteraciones estructurales y miolisis<sup>269</sup>. Por ello, una alteración del tamponado de calcio de los miofilamentos inducido por la miosilis podría potencialmente alterar la dinámica del calcio en miocitos auriculares de pacientes con FA.

En resumen, hemos mostrado que un aumento de la frecuencia de estimulación produce una respuesta heterogénea entre la población de miocitos auriculares humanos aislados, la cual podría constituir un substrato celular arritmogénico a frecuencias de latido elevados. Además, mostramos que la densidad de la  $I_{Ca}$  y la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio, determinan la estabilidad de la respuesta del calcio intracelular latido-latido. Estos

resultados sugieren que el canal de calcio tipo-L y los RyR2 pueden ser nuevas dianas para la estabilización de la respuesta latido-latido en miocitos auriculares humanos.

### 3. Los receptores de adenosina $A_{2A}$ regulan la respuesta latido-latido a frecuencias crecientes en miocitos auriculares humanos

#### 3.1. Introducción

La alternancia electromecánica es un fenómeno observado en diversas patologías<sup>7, 221, 255, 256</sup>, anunciando el advenimiento de la FA<sup>7, 257</sup>, y arritmias ventriculares<sup>258, 259</sup>. En condiciones fisiológicas, la alternancia del potencial de acción puede inducirse incrementando artificialmente la frecuencia cardíaca<sup>7, 224</sup>, y hay modelos experimentales que han demostrado que el desarrollo de alternancia eléctrica y mecánica está modulada por la concentración plasmática de calcio<sup>224, 260</sup>, y que es posible revertirla, en humanos, mediante la administración de calcio<sup>256</sup>. Asimismo, reduciendo la entrada de calcio a través de los canales de calcio tipo-L se induce alternancia en las corrientes transitorias de calcio en miocitos ventriculares de rata (alternancia en el calcio)<sup>8, 213, 214, 261</sup>. La alternancia en el calcio también puede inducirse por inhibición metabólica<sup>262, 263</sup> o incrementando la frecuencia de estimulación<sup>213, 220</sup>, y ha sido atribuida a heterogeneidades en la dinámica del calcio inter y/o intracelular<sup>8, 213, 214, 218, 220, 261</sup>. Tal y como muestran los resultados anteriores de esta tesis (capítulo 2 en resultados), las respuestas latido-latido alternantes e irregulares también se pueden inducir en miocitos auriculares humanos aislados incrementando la frecuencia de estimulación. Además, hemos mostrado que los miocitos con una amplitud grande de  $I_{Ca}$  y elevada incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR en reposo, son más propensos a presentar respuestas latido-latido alternantes cuando se incrementaba la frecuencia de estimulación, mientras que es más probables que los miocitos con menor incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR en reposo e  $I_{Ca}$  pequeña mantengan una respuesta latido-latido uniforme a elevadas frecuencias de estimulación. Así, la modulación e la amplitud de  $I_{Ca}$  y/o o la liberación de calcio del SR podría ser la clave para el control de la estabilidad de la respuesta latido-latido en los miocitos auriculares humanos. Teniendo esto en cuenta, es un hecho interesante que la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR es mayor en miocitos auriculares humanos de pacientes con FA<sup>138</sup>, una observación que probablemente esté relacionada con el incremento en la fosforilación del canal del SR (receptor de rianodina, RyR2) en muestras de tejido auricular de pacientes con FA<sup>226</sup>. De hecho, la activación de los  $A_{2A}R$  estimula la liberación espontánea de calcio del SR mediada por PKA en miocitos auriculares humanos<sup>138</sup>. Este efecto es mayor en miocitos de pacientes con FA debido al incremento en la expresión de los  $A_{2A}R$  en los miocitos de estos pacientes (capítulo 1 de Resultados). Aún más importante es el hecho que la inhibición de la activación de los  $A_{2A}R$  en miocitos auriculares de pacientes con FA reducen las liberaciones espontáneas de

calcio del SR en reposo hasta los niveles observados en los miocitos de pacientes sin FA (capítulo 1 de Resultados).

En este sentido, es posible que un incremento en la activación de los  $A_{2A}R$  en miocitos auriculares humanos de pacientes con FA favorezca la inducción de respuestas latido-latido no uniformes cuando la frecuencia de estimulación aumenta. Para comprobar esta hipótesis, hemos investigado cómo la modulación por PKA de la amplitud de  $I_{Ca}$  y de las liberaciones espontáneas de calcio del SR afecta a la respuesta latido-latido a frecuencias crecientes de estimulación. Para ello, hemos utilizado la visualización del calcio mediante microscopía confocal de dos dimensiones combinada con la técnica del patch-clamp. Nuestros resultados muestran que la inducción de respuestas latido-latido no uniformes (alternantes e irregulares) estaba asociada a una estimulación de las liberaciones espontáneas de calcio del SR en reposo mediada por PKA. Así, la estimulación beta-adrenérgica y la activación de los  $A_{2A}R$ , favoreciendo ambos la liberación espontánea de calcio del SR y la aparición de respuestas latido-latido no uniformes. Es importante destacar que tanto H-89 como la prevención de la activación de los  $A_{2A}R$  inhibieron la liberación espontánea de calcio del SR y redujeron las respuestas latido-latido no uniformes en condiciones control. Además, la inhibición de la activación de los  $A_{2A}R$  tuvo mayor efecto en los miocitos de pacientes con FA, sugiriendo que el grado de activación de los  $A_{2A}R$  regula la estabilidad de la respuesta latido-latido a elevadas frecuencias de estimulación.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Miocitos auriculares humano**

Se aislaron un total de 145 miocitos de 102 pacientes utilizando las muestras de tejido auricular del apéndice de la aurícula derecha. Este tejido, que normalmente se descarta durante la cirugía, se cortó en trozos pequeños y se sometió a sucesivas digestiones enzimáticas, como se ha descrito anteriormente <sup>3</sup>. Los pacientes que recibieron tratamiento con antagonistas del calcio fueron excluidos del estudio.

Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente para la obtención de las muestras utilizadas y este estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital y se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Principios de Helsinki.

### 3.2.2. Visualización del calcio intracelular por microscopía confocal

Para visualizar los cambios en la concentración del calcio intracelular, los miocitos fueron incubados con 2.5  $\mu\text{M}$  de fluo-4AM durante 15 min, seguido por un lavado y de-esterificación de al menos 30 min. Se visualizó el calcio intracelular (imágenes de 512x140 píxeles) a una frecuencia de muestreo de 100 Hz con un microscopio confocal de escaneo resonante (Leica SP5 AOBS). Se excitó el fluo-4 a 488 nm y la emisión de fluorescencia entre 500 y 650 nm fue detectada. Se fijó la potencia del láser al 20% y la atenuación al 4%. Se cuantificaron los cambios transitorios de calcio usando una Región de Interés (ROI) que cubría la totalidad de la célula, y la propagación de ondas de calcio se detectó utilizando ROIs subcelulares adyacentes.

### 3.2.3. Técnica de patch-clamp

Se midió la corriente de calcio tipo-L activada por pulsos de despolarización a 0mV durante 200ms y la corriente de cola activada por la posterior repolarización a -80mV. También se midieron las corrientes de intercambio Na-Ca espontáneas e inducidas por cafeína, con la técnica de patch-clamp perforado, en miocitos auriculares humanos, tal y como se ha descrito anteriormente <sup>3</sup>. Se usó la integral de la corriente de intercambio Na-Ca inducida por la aplicación rápida de 10 mM de cafeína, como medida del contenido de calcio del SR <sup>138</sup>. Las variaciones latido-latido en el calcio intracelular y en las corrientes iónicas fueron inducidas por un incremento paulatino en la frecuencia de las despolarizaciones repetitivas de 0.2 a 2 Hz. La adenosina fue infundida dentro de los miocitos a través de la pipeta de patch-clamp, utilizando la configuración *ruptured patch*. La solución extracelular contenía (en mM): 127 mM NaCl, 5 mM TEA, 10 mM HEPES, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.33 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM glucosa, 5 mM ácido pirúvico, 2 mM CaCl<sub>2</sub> y 1.8 mM MgCl<sub>2</sub>, ajustando el pH a 7.4 con NaOH a temperatura ambiente. La solución intracelular contenía (en mM): 109.2 mM ácido aspártico, 46.8 mM CsCl, 3 mM Mg<sub>2</sub>ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub> fosfocreatina, 0.42 mM Li<sub>2</sub>GTP y 10 mM HEPES, ajustando el pH a 7.2 con NaOH a temperatura ambiente. Las soluciones de stock de CGS21680 (200  $\mu\text{M}$ ), ZM (50  $\mu\text{M}$ ) y SCH (100  $\mu\text{M}$ ) se prepararon por disolución en DMSO.

Tal y como se muestra en la tabla 8, CGS21680 puede activar selectivamente los A<sub>2A</sub>R sin activar A<sub>1</sub>R ni A<sub>2B</sub>R. Teóricamente, CGS21680 podría también activar los A<sub>3</sub>R, pero esto tendría un efecto opuesto a la activación de los A<sub>2A</sub>R, así que el efecto observado de la activación de los A<sub>2A</sub>R por CGS21680 podría estar subestimado.



	A <sub>2A</sub> R:A <sub>2B</sub> R	A <sub>2A</sub> R:A <sub>1</sub> R	A <sub>2A</sub> R:A <sub>3</sub> R
CGS21680:	27/88800	27/289	27/67
ZM185236:	1/90	1/1000	1/500000
SCH58216:	1.3/70	1.3/420	1.3/130

**Tabla 8.** Selectividad de GS21680, ZM185236 y SCH58216 por los receptores de adenosina.

### 3.2.4. Análisis de datos y estadística

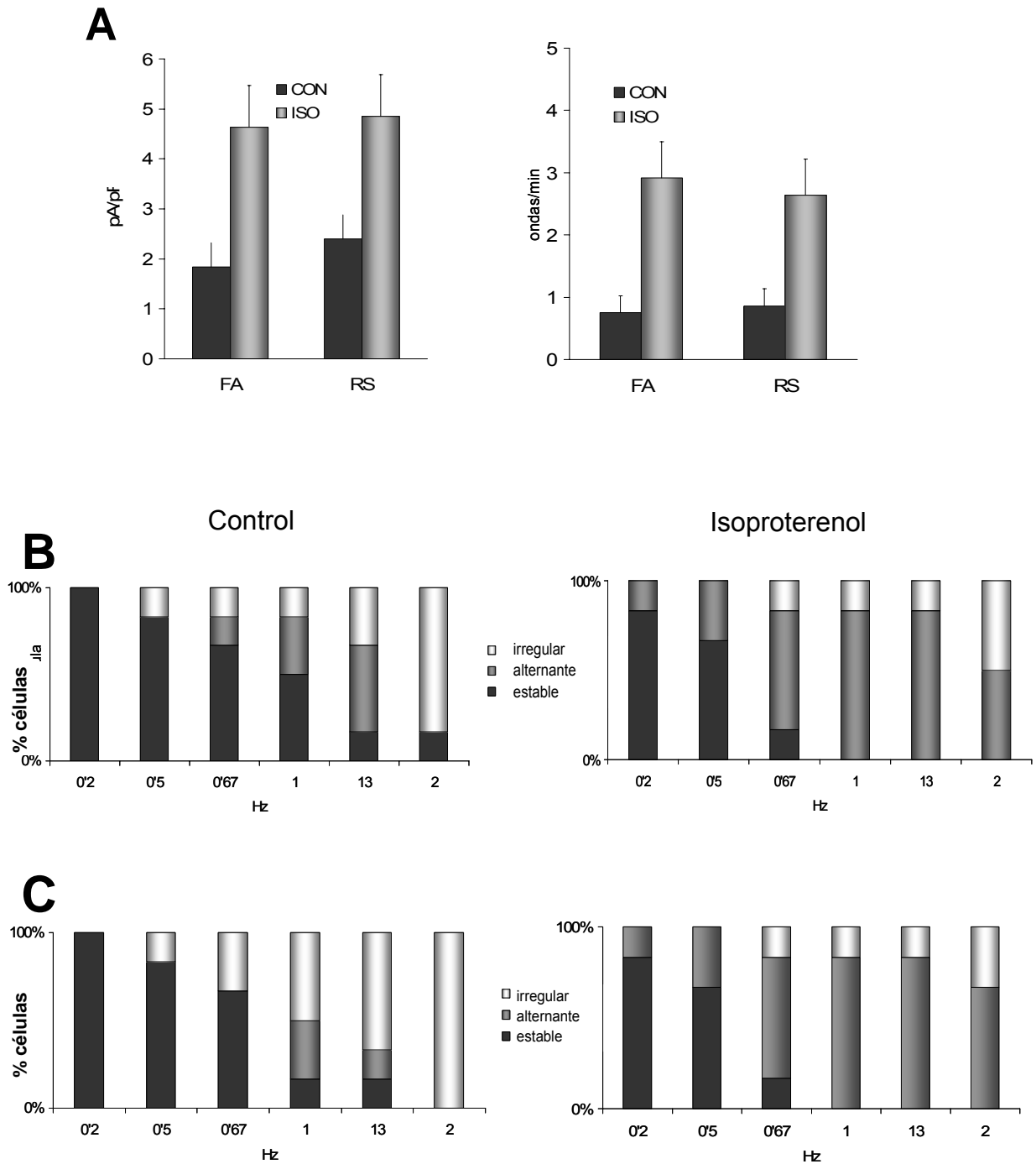
La media de los valores de cada paciente usados para el análisis estadístico está expresados como la media  $\pm$  s.e.m. Se comprobó la normalidad de los datos. Se ha llevado a cabo el test t-Student para identificar diferencias significativas de un efecto específico. Se consideró como significativo los valores con  $p < 0.05$ . En los experimentos donde se comparó múltiples variables o efectos se utilizó ANOVA y después el test Student-Newman-Keuls para evaluar si los efectos específicos eran significativos.

Los experimentos se realizaron sin el conocimiento previo de la historia clínica de los pacientes.

## 3.3. Resultados

### 3.3.1. Modulación de la respuesta del calcio latido-latido por la proteína kinasa A

Para saber si la fosforilación mediada por proteína kinasa A (PKA) modula la respuesta latido-latido a frecuencias crecientes de estimulación de los miocitos auriculares humanos, a través de la regulación de la amplitud de la corriente de calcio tipo-L y/o de la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR, utilizamos en primer lugar la estimulación beta-adrenérgica. Tal y como muestra la figura 24 A-C, ISO estimuló  $I_{Ca}$  e incrementó la frecuencia de  $I_{NCX}$  espontáneas simultáneamente (panel A), reduciendo drásticamente el umbral de frecuencia para la inducción de respuestas latido-latido no uniformes, especialmente respuestas alternantes (figure 24B).



**Figura 24. La estimulación beta-adrenérgica favorece la inducción de alteraciones latido-latido. A:** La estimulación beta-adrenérgica indujo, en miocitos auriculares humanos, el incremento por 2-3 de la amplitud de  $I_{Ca}$  (panel de la derecha) y de la frecuencia de  $I_{NCX}$  espontáneas (panel de la izquierda). **B:** La distribución, dependiendo de si los miocitos presentan respuestas latido-latido uniformes, alternantes o irregulares, de 7 miocitos antes (panel de la izquierda) y después (panel de a derecha) de la estimulación beta-adrenérgica con 30 nM de ISO. Los miocitos se obtuvieron del tejido auricular de 6 pacientes sin FA. **C:** distribución correspondiente para 6 miocitos de 6 pacientes con FA.

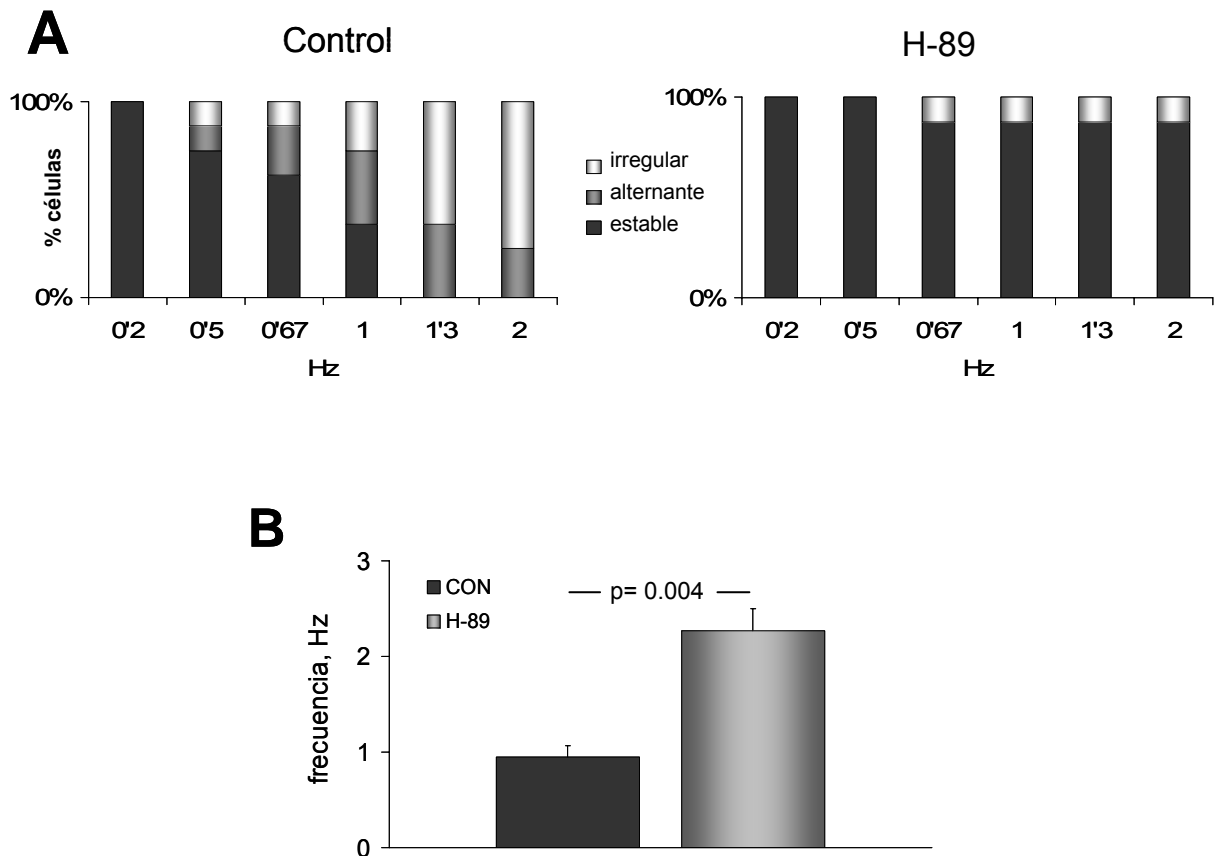
El efecto de ISO era similar en los miocitos de pacientes con y sin FA (figura 24C). De hecho, tanto la  $I_{Ca}$  como la frecuencia de  $I_{NCX}$  espontáneas fue comparable entre los miocitos de los dos grupos de pacientes después de la estimulación con ISO.

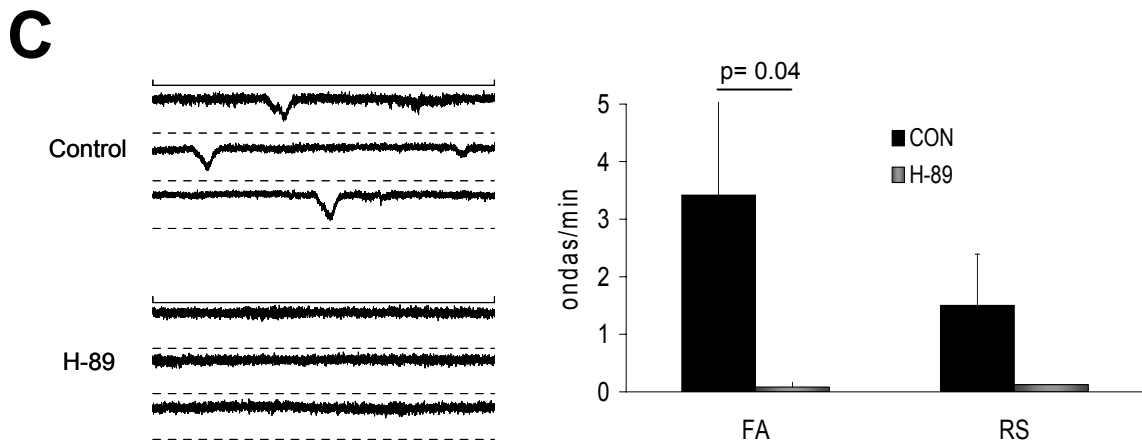
Se comprobó si la inhibición parcial de  $I_{Ca}$  era capaz de revertir los efectos de ISO, mediante la exposición a nifedipino en presencia de ISO. La figura 25 muestra registros representativos de la  $I_{Ca}$  a 0.5, 1 y 2 Hz en condiciones control (paneles de la izquierda), con ISO (paneles centrales) y en presencia de ISO+nifedipino (paneles de la derecha). Hay que destacar que el fomento de las respuestas alternantes a bajas frecuencias de estimulación provocada por ISO, se podía revertir mediante la adición de nifedipino.



**Figura 25. La inhibición de  $I_{Ca}$  revierte el efecto del isoproterenol sobre la respuesta latido-latido.** Registros consecutivos de la corriente de calcio de un miocito sometido a repetidas estimulaciones a 0.5 (arriba), 1 (en el medio) y 2 Hz (abajo) en condiciones control (paneles de la izquierda), en presencia de 0 nM ISO (paneles del medio) y con 30 nM ISO + 30 nM nifedipino (ISO+NIF, paneles de la derecha).

Para determinar si la fosforilación mediada por proteína kinasa A (PKA) también modula la respuesta latido-latido sin estimulación beta-adrenérgica, utilizamos el inhibidor selectivo de PKA, H-89. La figura 26 muestra que H-89 estabilizó la respuesta latido-latido a crecientes frecuencias de estimulación (panel A) incrementado el umbral de inducción de respuestas no uniformes (panel B). Este efecto se debió básicamente a la reducción de las liberaciones espontáneas de calcio del SR, ya que H-89 eliminó completamente las corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas (panel C) sin afectar significativamente a la amplitud de  $I_{Ca}$ .

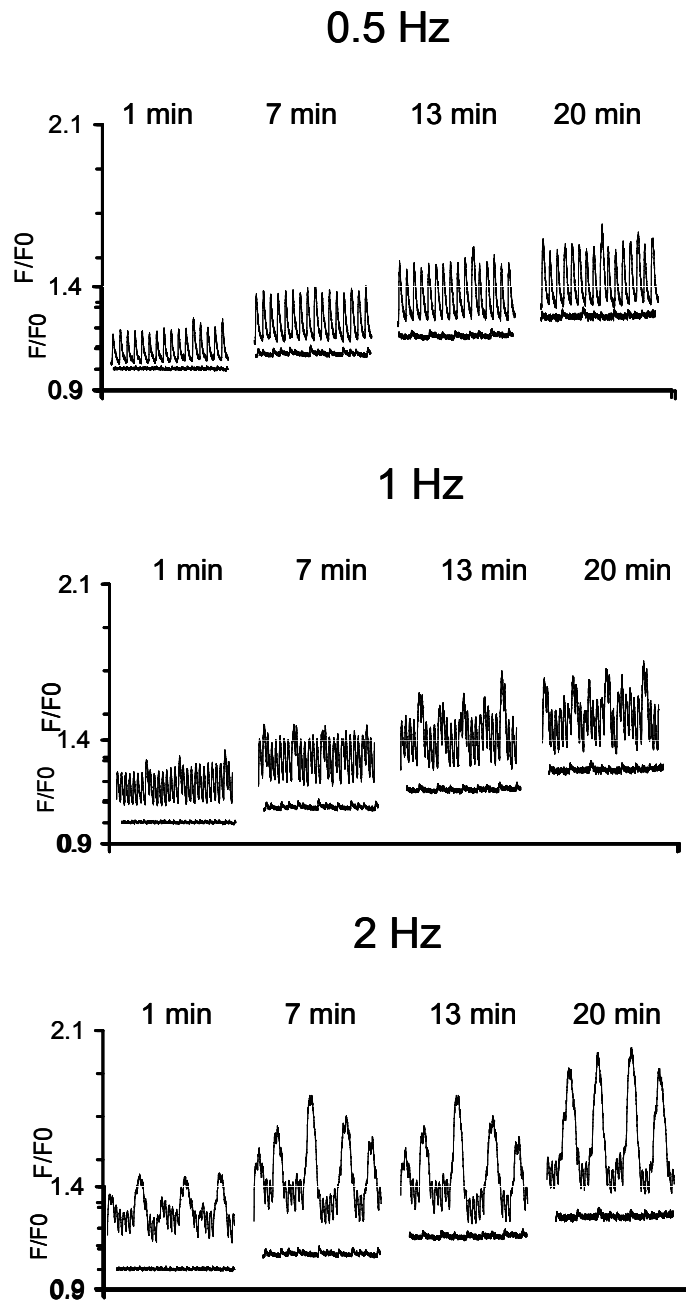




**Figura 26. Las respuestas latido-latido no uniformes están causadas por la activación de PKA.** A: Distribución de las respuestas latido-latido uniformes, alternantes e irregulares según la frecuencia de estimulación, de 8 miocitos antes (izquierda) y después (derecha) de la inhibición de PKA con 1  $\mu$ M de H-89. B: Efecto del H-89 sobre el umbral de frecuencia para la inducción de respuestas latido-latido no uniformes. C: El panel de la izquierda muestra los registros de  $I_{NCX}$  espontáneas antes y después de la exposición del miocito al H-89. El panel de la derecha resume el efecto de H-89 sobre la incidencia de corrientes  $I_{NCX}$  espontáneas en miocitos de pacientes con y sin FA.

### 3.3.2. Modulación de la respuesta del calcio latido-latido por los $A_{2A}R$

Tal y como muestran resultados recientes de nuestro laboratorio (<sup>138</sup> y capítulo 1 de los Resultados) la activación de los  $A_{2A}R$  incrementan las liberaciones espontáneas de calcio del SR, y puesto que este incremento puede promover las respuestas alternantes o irregulares (capítulo 2 de los Resultados), investigamos si y cómo la activación de estos receptores afectan a la respuesta latido-latido. Para ello, visualizamos los cambios en la concentración de calcio citosólico por microscopía confocal y medimos los cambios en los flujos de calcio del sarcolema con la técnica de patch-clamp, cuando se activan los  $A_{2A}R$  con adenosina. En la figura 27 se observa cómo la infusión de adenosina a través de la pipeta de patch-clamp favorece la liberación espontánea de calcio y la inducción de respuestas alternantes e irregulares al incrementar paulatinamente la frecuencia de estimulación. Así, la frecuencia para la inducción de respuestas no uniformes (alternantes o irregulares) descendió de 1.5 Hz, justo después del comienzo de la infusión de adenosina, a 1.2, 0.9 y 0.6 Hz después de 6, 12 y 18 minutos del comienzo de la infusión de adenosina (ADO).



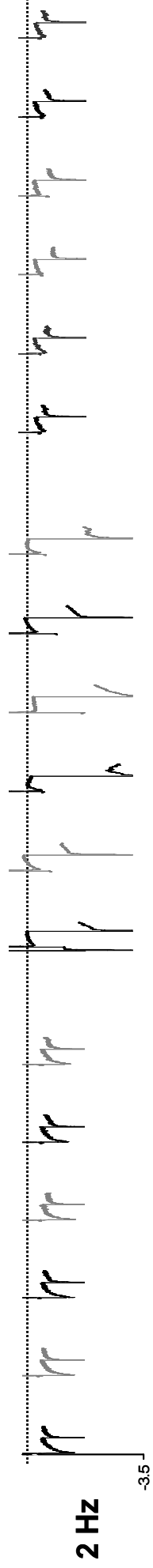
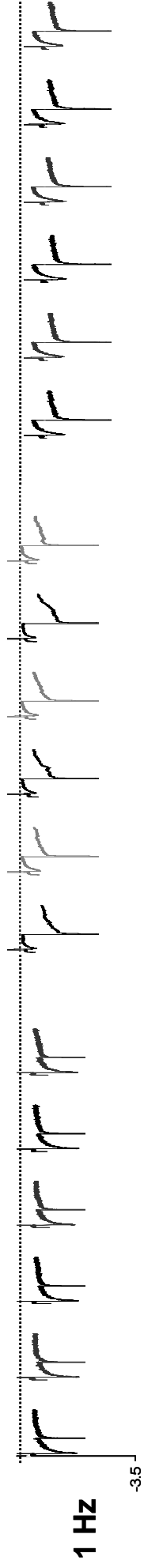
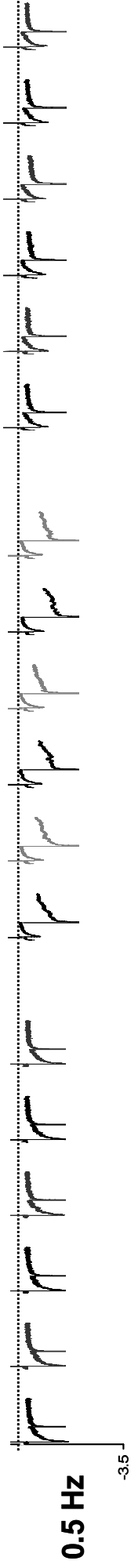
**Figura 27. Efecto de la infusión de adenosina sobre la respuesta latido-latido.** Efecto de la infusión de adenosina sobre los incrementos transitorios en la concentración de calcio, recogidos durante estimulación continua a 0.5 (arriba), 1 (en el medio) y 2 Hz (abajo). Los registros se obtuvieron a 1, 7, 13 y 20 min después de empezar la infusión de adenosina a través de la pipeta de patch-clamp. Las líneas debajo de los incrementos en la concentración de calcio corresponden al registro de la fluorescencia hecho con un potencial de membrana de -80 mV.

**A**

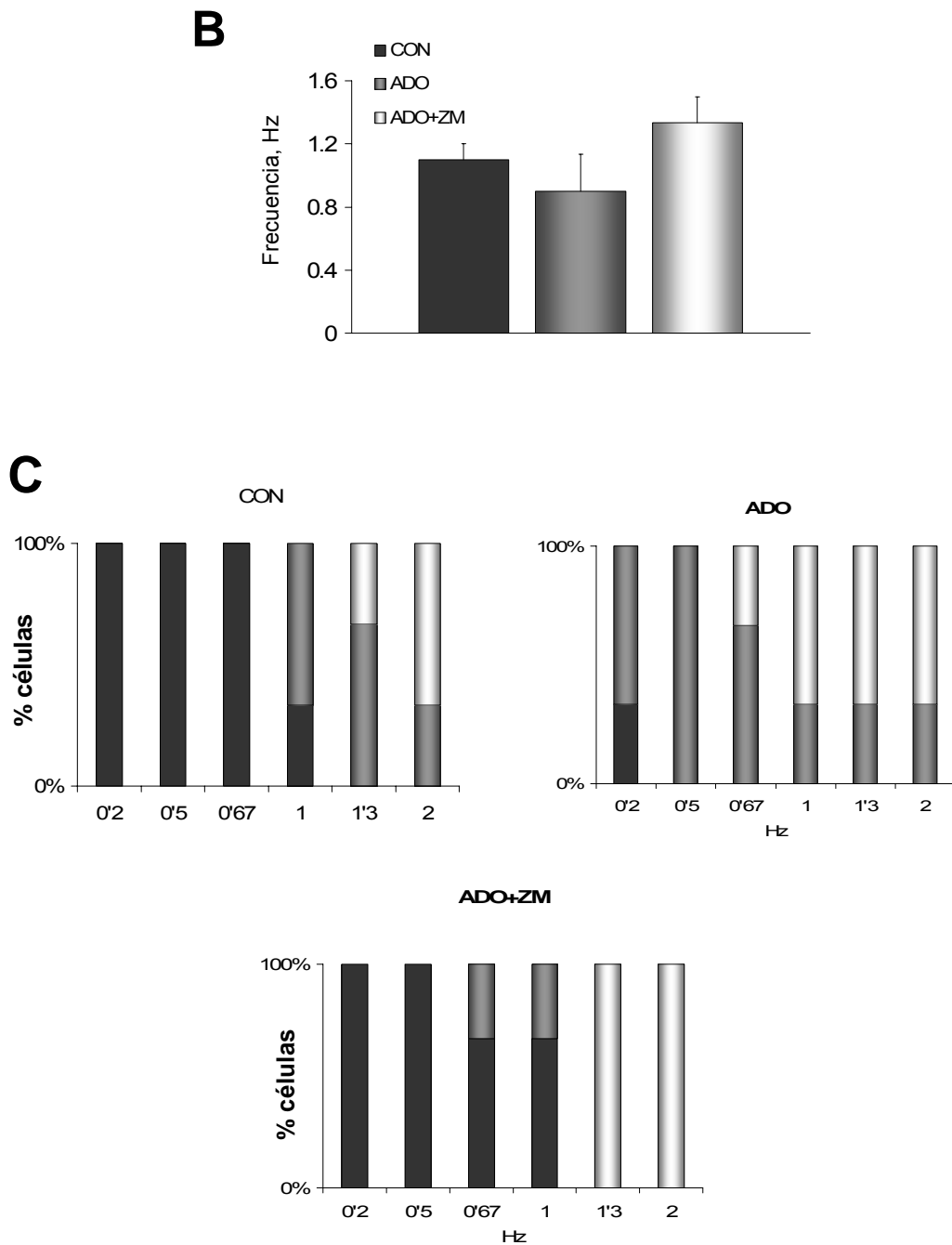
**Control**

**ADO**

**ADO+ZM**





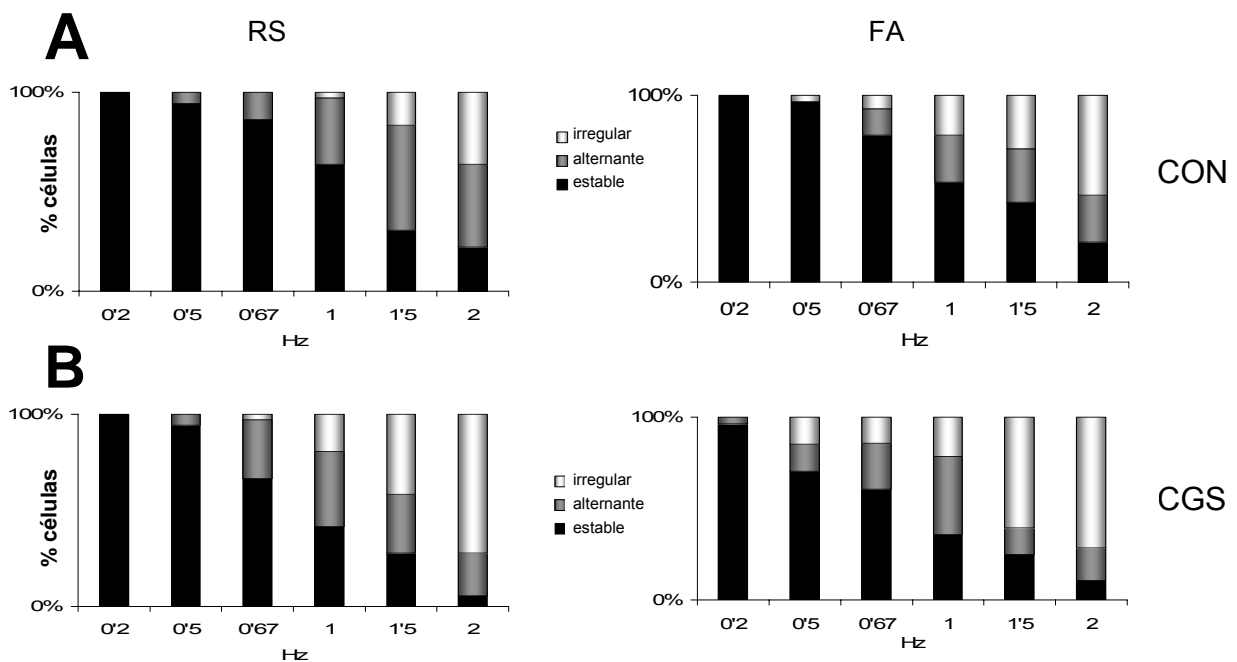


**Figura 28. La inhibición de los  $A_{2A}R$  revierte el efecto de la infusión de adenosina. A:** Registros consecutivos de la corriente de calcio en condiciones control con estimulación a 0.5 Hz (arriba), 1 Hz (centro) y 2 Hz (abajo), en condiciones control (izquierda), después de 15 min desde la infusión de adenosina (en medio) y exponiendo al miocito después de exponerlo a ZM241385, en presencia continua de adenosina (derecha). **B:** Frecuencia de aparición de las respuestas latido-latido no uniformes en una situación control, con ADO y con ADO+ ZM241385. **C:** Distribución de las respuestas latido-latido uniforme (negro), alternante (gris) o irregular (blanco) según la frecuencia de estimulación, en condiciones control, con ADO y con ADO+ ZM241385.

Para verificar que el fomento de respuestas no uniformes se debía a la activación de los  $A_{2A}R$ , los miocitos perfundidos con ADO fueron expuestos a 150 nM ZM241385. La figura 28 A muestra registros representativos a 0.5, 1 y 2 Hz antes (a la izquierda), después de la exposición a adenosina (en el medio) y después de la exposición a ZM241385 en presencia de ADO (a la derecha). Se observa que ZM241385 era capaz de revertir el efecto de ADO sobre la frecuencia de la aparición de respuestas no uniformes. Figura 28 C resume la distribución de las respuestas uniformes, alternantes o irregulares en función de la frecuencia de estimulación en condiciones control, con ADO y con ADO+ ZM241385.

### 3.3.3. Efecto de la activación de los $A_{2A}R$ sobre la estabilidad de la dinámica del calcio intracelular en miocitos de pacientes con y sin FA

Para confirmar que las liberaciones espontáneas de calcio mediadas por la estimulación de  $A_{2A}R$  desestabilizan la respuesta latido-latido, se investigó el efecto de un incremento gradual de la frecuencia de estimulación en ausencia y en presencia del agonista selectivo del  $A_{2A}R$ , CGS21680. Dado que resultados previos de esta tesis (capítulo 1 de Resultados) muestran que la expresión de los  $A_{2A}R$  es superior en pacientes con FA, comparamos también las respuestas de los miocitos de pacientes con y sin FA.



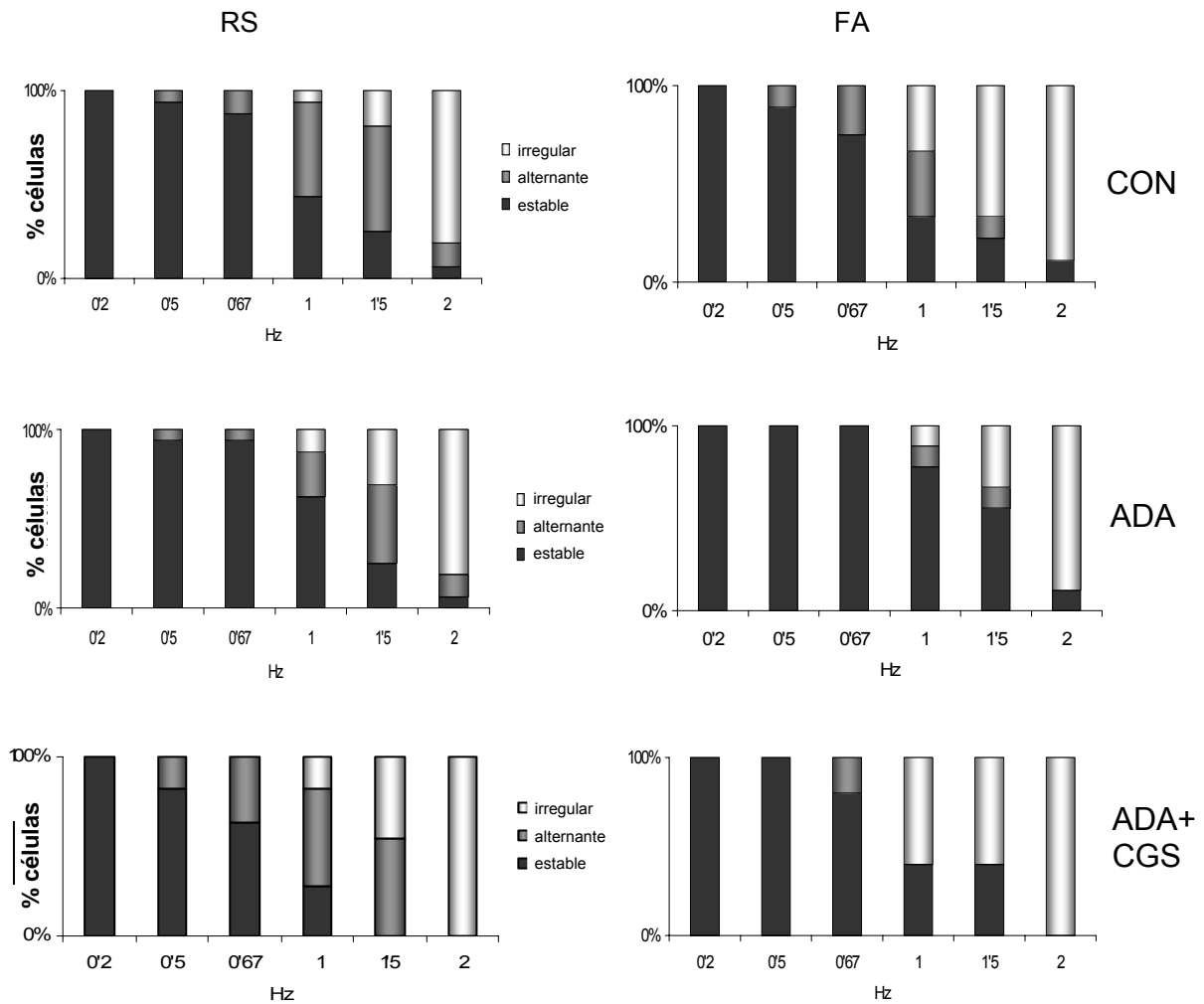
**C**

**Figura 29. La estimulación de los  $A_{2A}R$  favorece la inducción de respuestas no uniformes.** **A:** Distribución de las respuestas uniformes, alternantes e irregulares en función de la frecuencia de estimulación, de miocitos de pacientes con y sin FA (n=35 y 28) en condiciones control. **B:** Distribución correspondiente después de la estimulación de los  $A_{2A}R$  con CGS21680. **C:** Registros consecutivos de un miocito obtenidos bajo estimulación continua a 0.5 (arriba), 1 (en el medio) y 2 Hz (abajo), en control, con CGS21680 y con CGS21680+H-89. La línea curva gris en la estimulación a 2Hz con CGS21680 representa el incremento transitorio en la concentración de calcio que ha experimentado la célula durante la estimulación.

En la figura 29 se observa que CGS21680 favorece la aparición de respuestas latido-latido irregulares a frecuencias de estimulación más bajas y que este efecto tiende a ser más pronunciado en los miocitos de pacientes con FA (panel A). Ya que cabe esperar que la activación de los  $A_{2A}R$  incremente las liberaciones espontáneas de calcio del SR a través de la fosforilación de RyR2 vía PKA<sup>138</sup>, según han demostrado experimentos de esta tesis (capítulo 1 de los Resultados), investigamos si el inhibidor de PKA, H-89, revertía el efecto de CGS21680 sobre la respuesta del calcio latido-latido. La figura 29 C muestra, que la subsiguiente exposición a H-89, de algunos de los miocitos que se expusieron a CGS21680, en presencia continua de CGS21680, estabilizaba la respuesta latido-latido a todas las frecuencias de estimulación ensayadas. Esa observación era consistente en miocitos de 7 pacientes, sugiriendo que el efecto de CGS21680 se debe a la estimulación de  $I_{NCX}$  espontáneas mediada por la PKA, ya que H-89 también eliminó las corrientes de  $I_{NCX}$  espontáneas, pero también tuvo efecto sobre la  $I_{Ca}$ .

### 3.3.4. La inhibición de los $A_{2A}R$ estabiliza la respuesta del calcio latido-latido

Los resultados del primer capítulo de esta tesis muestran que inhibición de la activación de los  $A_{2A}R$  reduce las liberaciones espontáneas de calcio en miocitos de pacientes con FA al nivel observado en pacientes sin FA. Dado que esto favorece una respuesta latido-latido uniforme, la inhibición de los  $A_{2A}R$  podría, teóricamente, estabilizar la respuesta latido-latido del calcio en miocitos de pacientes con FA. Para comprobar esta hipótesis, utilizamos adenosina desaminasa (ADA) exógena para prevenir la activación de los  $A_{2A}R$ . La figura 30 muestra que ADA en miocitos de pacientes sin FA (paneles izquierdos) tuvo un efecto pequeño sobre la distribución de las respuestas uniformes, alternantes e irregulares a frecuencias crecientes de estimulación (panel A) y sobre el umbral de frecuencia para la inducción de respuestas no uniformes (panel B). En cambio, ADA incrementó la fracción de respuestas uniformes (panel A) y aumentó el umbral para la inducción de respuestas no uniformes de 1.2 a 1.7 Hz,  $p=0.05$  (panel B) en miocitos de 5 pacientes con FA.



**Figura 30. La adenosina desaminasa exógena favorece respuestas latido-latido uniformes.** La distribución de las respuestas latido-latido uniformes, alternantes e irregulares según la frecuencia de estimulación, en un total de 11 miocitos de pacientes sin FA (paneles de la izquierda) y 5 miocitos de pacientes con FA (paneles de la derecha), en condiciones control (paneles superiores), con adenosina desaminasa (ADA, paneles centrales) y con ADA+CGS21680 (paneles inferiores).

### 3.4. Discusión

El descubrimiento más importante de este estudio es que la estimulación de la corriente de calcio tipo-L y/o de las liberaciones espontáneas de calcio del SR, por la activación de los receptores acoplados a proteínas Gs ( $\beta$ AR y  $A_{2A}$ R), favorece la inducción de respuestas latido-latido no uniformes y reduce el umbral de frecuencia al que aparecen en miocitos auriculares humanos. Además, la reducción de las liberaciones espontáneas de calcio del SR causada por la inhibición de la activación de los  $A_{2A}$ R estabiliza la respuesta latido-latido

gracias al incremento en el umbral para la inducción de respuestas no uniformes. Este efecto es más pronunciado en miocitos de pacientes con FA, donde el nivel basal de liberaciones espontáneas de calcio del SR es superior, sugiriendo que un control farmacológico de la activación de los A<sub>2A</sub>R podría ser clave para estabilizar de la respuesta del calcio latido-latido.

### **3.4.1. Papel de la PKA en la regulación de la estabilidad de la dinámica del calcio**

Este estudio analiza cómo la señalización mediado por la PKA afecta a la respuesta latido-latido en un total de 145 miocitos auriculares humanos aislados del tejido de 102 pacientes. De acuerdo con estudios clínicos <sup>258</sup> y con los resultados anteriores expuestos en esta tesis, las respuestas alternantes o irregulares en los incrementos transitorios de calcio y en la integral de I<sub>tail</sub>, se indujeron con el aumento en la frecuencia de estimulación. Según estos estudios, las respuestas no uniformes están favorecidas por I<sub>Ca</sub> grandes y/o elevadas incidencias de liberaciones espontáneas de calcio del SR en reposo (capítulo 2 de los Resultados). Por ello, es factible que la frecuencia para la inducción de respuestas no uniformes venga determinada por la activación basal de I<sub>Ca</sub> y/o la liberación de calcio del SR. Además, existen evidencias experimentales que apoyan la existencia de un tono de AMPc basal en miocitos auriculares humanos <sup>270</sup> (capítulo 3 de Resultados, figura 24). Los resultados de este estudio muestran que la activación basal de las liberaciones de calcio del SR mediada por PKA es, de hecho, el motivo subyacente de la inducción de respuestas latido-latido no uniformes en condiciones control cuando se incrementa la frecuencia de estimulación (ver figura 26 en Resultados). Además, nuestros datos muestran que la activación de PKA con ISO <sup>271</sup> reduce el umbral de frecuencia para la inducción de respuestas latido-latido no uniformes, mientras que la inhibición parcial de la I<sub>Ca</sub> con nifedipino revirtió el efecto de ISO, corroborando que tanto la I<sub>Ca</sub> como la liberación de calcio del SR pueden contribuir al fomento de respuestas latido-latido no uniformes (ver también capítulo 2 de los Resultados).

### **3.4.2. A<sub>2A</sub>R modula la respuesta latido-latido en fibrilación auricular**

Según algunos estudios, la isquemia auricular localizada contribuye al desarrollo de la fibrilación auricular <sup>272</sup> y los apéndices auriculares son regiones susceptibles de sufrir períodos con circulación deficiente en pacientes con FA <sup>273</sup>. Además, se ha mostrado que hay un considerable incremento en los niveles intersticiales de adenosina durante la isquemia miocárdica <sup>274</sup> y por ello es plausible, que los miocitos de los apéndices auriculares estén sometidos a fluctuaciones en los niveles intracelulares y/o intersticiales de

adenosina. Teniendo en cuenta que la activación de los  $A_{2A}R$  estimula la liberación espontánea de calcio del SR<sup>138</sup>, incrementos en la concentración intracelular y/o intersticial de adenosina podrían estimular las liberaciones espontáneas de calcio del SR (capítulo 1 de Resultados) y favorecer las respuestas alternantes e irregulares. Estos dos fenómenos podrían contribuir a la arritmogénesis auricular y, las fluctuaciones en los niveles de adenosina, podrían incluso contribuir en la perpetuación de la FA. Además, la mayor expresión de los  $A_{2A}R$  en pacientes con FA (capítulo 1 de Resultados) facilitaría el reinicio de la FA por un incremento en la concentración intersticial de adenosina. La FA a la vez podría favorecer la circulación deficiente en los apéndices auriculares, incrementando aún más los niveles de adenosina, completando el círculo vicioso de la autoperpetuación. De acuerdo con esta hipótesis, la activación selectiva de los  $A_{2A}R$  con CGS21680 favoreció la inducción de respuestas no uniformes a frecuencias de estimulación más bajas en miocitos auriculares de pacientes con FA que en miocitos sin la arritmia.

Además, la activación de los  $A_{2A}R$  disminuyó el umbral para la inducción de respuestas no uniformes sin afectar a su naturaleza (ver figura 29 de Resultados). Esta diferencia entre la estimulación beta-adrenérgica y la estimulación mediada por los  $A_{2A}R$  podría residir en la compartimentación de la señal de los  $A_{2A}R$ . Así, la activación de los  $A_{2A}R$  estimula selectivamente la liberación de calcio del SR sin afectar a la amplitud de la  $I_{Ca}$  ni al contenido del SR<sup>138</sup> (ver capítulo 1 de Resultados, figuras 3-5), mientras que ISO induce la estimulación simultánea de la  $I_{Ca}$ <sup>275</sup>, el llenado de calcio del SR<sup>275</sup> y la liberación de calcio del SR<sup>276</sup>.

### **3.4.3. Regulación de la respuesta latido-latido en la fibrilación auricular**

Anteriormente, se ha relacionado la hiperfosforilación del RyR2 vía PKA<sup>226</sup> con la elevada incidencia basal de liberaciones espontáneas de calcio del SR<sup>3</sup>. Además, la elevada expresión de los  $A_{2A}R$  en pacientes con FA estar ligada a la elevada tasa de liberaciones espontáneas de calcio, ya que la inhibición de los  $A_{2A}R$  en miocitos de pacientes con FA reduce la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio a niveles observados en las células de pacientes sin la arritmia (capítulo 1 de los Resultados, figura 8). Estas observaciones, combinadas con la relación inversa entre la frecuencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR y una respuesta uniforme (capítulo 2 de Resultados), sugieren que un control farmacológico de la activación de los  $A_{2A}R$  podría constituir una manera de controlar la respuesta latido-latido a altas frecuencias de estimulación en miocitos de pacientes con FA. De acuerdo con ello, los resultados de este estudio muestran que la degradación de adenosina por adenosina desaminasa exógena incrementa el umbral

de frecuencia para la inducción de respuestas latido-latido no uniformes en miocitos de pacientes con FA (ver figura 30 de Resultados). Además, la infusión de soluciones con o sin adenosina a través de la pipeta de patch-clamp mostró que pequeños cambios en la concentración citosólica de adenosina tienen un impacto considerable en la respuesta latido-latido. Los cambios más pronunciados en los niveles citosólicos de adenosina inducían ondas espontáneas de calcio y reducían dramáticamente la estabilidad de la respuesta latido-latido. Aún así, los efectos de elevados niveles de adenosina citosólica se podían revertir inhibiendo los  $A_{2A}R$  (ver figura 27 en Resultados). Por ello, es plausible que cambios fisiológicamente relevantes en los niveles citosólicos de adenosina, como los aumentos inducidos por estrés o isquemia <sup>274</sup>, puedan desestabilizar la respuesta latido-latido por una reducción del umbral de la frecuencia para la inducción de respuestas no uniformes.

#### **3.4.4. Implicaciones clínicas del estudio**

La inducción o mantenimiento de la FA ha sido asociada a un remodelado importante de las corrientes iónicas y los mecanismos que envuelven la dinámica del calcio celular <sup>3, 72, 237, 266</sup>. Además, la FA también ha sido relacionada con un incremento en las liberaciones espontáneas de calcio del SR <sup>3</sup> y la hiperfosforilación del RyR2 <sup>226</sup>. Este estudio muestra que el remodelado de las señales mediadas por PKA y, específicamente, el remodelado de la señalización de los  $A_{2A}R$ , podría también contribuir al desarrollo de respuestas latido-latido alternantes o irregulares en miocitos auriculares humanos, un fenómeno que precede y promueve el reinicio de la FA <sup>258, 259, 267</sup>. Más concretamente, nuestros resultados muestran que una reducción de la liberación espontánea de calcio del SR inducida por la PKA, es esencial para lograr una estabilización de la respuesta latido-latido a altas frecuencias de estimulación. Así, la inhibición de la PKA con H-89 eliminó las respuestas latido-latido alternantes e irregulares a todas las frecuencias de estimulación comprobadas. Sin embargo, H-89 puede comprometer la contractilidad cardíaca, reduciendo de forma simultánea la  $I_{Ca}$ , el contenido de calcio del SR, y la liberación de calcio del SR. En cambio, la inhibición selectiva de los  $A_{2A}R$  estabilizó la respuesta latido-latido sin afectar ni a la  $I_{Ca}$  ni al contenido de calcio del SR. Además, esa inhibición tuvo mayor efecto en los miocitos de pacientes con FA. Estos resultados concuerdan con la elevada expresión de los  $A_{2A}R$  en FA (ver figuras 1 y 2 de los Resultados), y sugieren que el control farmacológico de la activación de los  $A_{2A}R$  podría ser la clave para reducir selectivamente las liberaciones espontáneas de calcio del SR y estabilizar la respuesta latido-latido sin comprometer la contractilidad en miocitos auriculares de pacientes con FA. Tal y como se ha mencionado



anteriormente, la estabilización del ritmo auricular podría tener un efecto de retroalimentación positiva, reduciendo los periodos de perfusión deficiente e isquemia en los apéndices auriculares así y minimizar anomalías en la regulación del calcio intracelular inducidas por la adenosina.

En resumen, hemos mostrado por primera vez que la inducción de respuestas latido-latido alternantes o irregulares por un aumento en la frecuencia de estimulación se asocia a una estimulación basal de la liberación espontánea de calcio del SR mediada por PKA, en miocitos auriculares humanos. Además, la estimulación de las liberaciones espontáneas de calcio, mediada por la activación de receptores beta-adrenérgicos o de los  $A_{2A}R$ , reduce el umbral de frecuencia para la inducción de respuestas latido-latido no uniformes. El efecto de la activación de los  $A_{2A}R$  fue notablemente mayor en los miocitos de pacientes con FA, y la inhibición de los mismos incrementó significativamente el umbral para la inducción de respuestas no uniformes en los miocitos auriculares de estos pacientes. Esto sugiere que un control farmacológico de la activación de los  $A_{2A}R$  podría ser un nuevo mecanismo para estabilizar la respuesta latido-latido a altas frecuencias de estimulación en miocitos auriculares de pacientes con FA.

## VII. DISCUSIÓN

---



## **La fibrilación auricular y los receptores de adenosina A<sub>2A</sub>**

La FA es la arritmia cardíaca más prevalente y se espera que su impacto aumente en los próximos años <sup>227</sup>. Además, su presencia degrada la calidad de vida del paciente y provoca un aumento sostenido en los gastos públicos de salud.

Desde un punto de vista electrofisiológico existen varios mecanismos que contribuyen a desencadenar y perpetuar la FA. Entre ellos, los focos ectópicos juegan un papel importante en desencadenar la arritmia. Es decir, existe una zona en la aurícula que funciona como un foco ectópico, que genera actividad repetitiva. Esta actividad repetitiva se induce por despolarizaciones celulares anormales, que se producen cuando el calcio del SR se libera de forma espontánea y estudios anteriores de nuestro laboratorio han mostrado que la fibrilación auricular se asocia a un remodelado eléctrico que conlleva un aumento en la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR. Las liberaciones espontáneas de calcio del SR pueden dar lugar a ondas de calcio que recorren todo el citosol y así generar despolarizaciones anormales <sup>236</sup>.

Por otro lado, la FA se perpetúa por mecanismos de reentrada que generan diferentes frentes de onda, debido a alteraciones en la propagación del estímulo a través del tejido. Así, las zonas fibróticas derivadas de un remodelado estructural forman puntos de bloqueo, que contribuyen a crear circuitos aleatorios que despolarizan diferentes zonas de la aurícula de forma caótica y que perpetúan la FA. La misma FA genera a la vez modificaciones electrofisiológicas y estructurales que favorecen su persistencia: dilatación auricular, fibrosis miofibrilar, acortamiento de los períodos refractarios auriculares y de la velocidad de conducción. Este remodelado múltiple hace más difícil el éxito de una intervención quirúrgica o un agente terapéutico, y un problema con fármacos actualmente utilizados para tratar la FA es que pueden tener efectos proarrítmicos a largo plazo <sup>222, 228</sup>.

Una de las nuevas pautas de tratamiento de la FA es la técnica ablativa de los focos ectópicos, aunque solo se utiliza en pacientes seleccionados <sup>223, 229</sup>. La ablación se basa en los conocimientos actuales de los mecanismos electrofisiológicos endógenos de la FA, utilizando la abolición de focos ectópicos y la modificación de las variables electrofisiológicas que alargan los períodos refractarios acortados, que aumentan la velocidad de conducción disminuida y que reducen la masa de tejido auricular excitable <sup>230</sup>. Pero los procedimientos ablativos en la FA conllevan riesgos y complicaciones como taponamiento cardíaco, estenosis de las venas pulmonares, fístulas atrio-esofágicas, trombo-embolismos, arritmias.

Debido a esta complejidad del remodelado estructural y eléctrico en la FA, existen todavía muchos pacientes con FA donde los tratamientos actuales son incapaces de revertir la FA al ritmo sinusal y mantener los pacientes en ritmo sinusal. Por ello, sigue habiendo una gran necesidad de encontrar nuevas dianas para el tratamiento de la FA y, partiendo de los

mecanismos celulares y moleculares que se han asociado a la FA, esta tesis ha explorado el potencial de los A<sub>2A</sub>R como una nueva diana terapéutica en la FA. Así, es conocido que la FA se asocia a un aumento en las liberaciones espontáneas de calcio del SR<sup>3, 236, 237</sup> y resultados recientes de nuestro laboratorio han mostrado que la liberación espontánea de calcio del SR se modula por la activación de los A<sub>2A</sub>R, sugiriendo que estos receptores podrían ser una diana para el control farmacológico de la liberación anormal de calcio en la FA. Para comprobar esta hipótesis de trabajo, la tesis consiste en tres subproyectos que investigan la expresión y función de los A<sub>2A</sub>R en el miocardio auricular humano, y su potencial en el tratamiento de la FA, utilizando el miocito auricular humano como modelo experimental.

### **Remodelado y función de los A<sub>2A</sub>R en la FA**

En el primer subproyecto de esta tesis hemos comprobado que existe un remodelado de la expresión de los A<sub>2A</sub>R en pacientes con FA, que funcionalmente está asociado a una mayor liberación espontánea de calcio en los miocitos auriculares de estos pacientes. Además, la inhibición selectiva de los A<sub>2A</sub>R en miocitos de pacientes con AF reduce la incidencia de liberaciones espontáneas a niveles observados en pacientes sin AF, afirmando que los A<sub>2A</sub>R podrían ser una nueva diana terapéutica en la FA que permite reducir la inducción de FA por despolarizaciones anormales.

Específicamente, los resultados de este estudio demuestran que los niveles de mRNA de A<sub>2A</sub>R se multiplican por cuatro en pacientes con FA y que la expresión de la forma dimérica del receptor (que es la forma funcional) aumenta de manera aún más dramática. Además, la distribución de los A<sub>2A</sub>R y los RyR2 se solapa en tejido y miocitos auriculares humanos<sup>138</sup>, facilitando así la señalización entre los A<sub>2A</sub>R y los RyR2. Hay diversos estudios que muestran el remodelado de otros receptores en fibrilación auricular<sup>242, 243</sup>. Pero cambios en la expresión y funcionalidad de los A<sub>2A</sub>R podrían ser de particular importancia en desencadenar y la perpetuar la FA, puesto que afectarían de manera directa a la liberación espontánea de calcio, favoreciendo la inducción de post-despolarizaciones y actividad repetitiva<sup>236</sup> y la automaticidad anormal<sup>206</sup> en pacientes con la FA. De hecho, nuestros resultados muestran que la activación de los A<sub>2A</sub>R por su agonista selectivo, incrementa la frecuencia de ondas de calcio en células de pacientes con FA por un aumento en la fosforilación del RyR2, sin afectar a la I<sub>Ca</sub> ni al contenido de calcio del SR.

El primer estudio de esta tesis sugiere que un incremento en la expresión y regulación de los A<sub>2A</sub>R en los pacientes con FA podría promover y mantener la arritmia, a través de un aumento en las liberaciones espontáneas de calcio del SR<sup>3, 236, 237</sup>, aunque no son los únicos receptores que sufren un remodelado que afecta a la dinámica del calcio intracelular<sup>242, 243</sup>. El remodelado de otros receptores, como los receptores de angiotensina o de IP<sub>3</sub>,

por ejemplo, tendría efectos concordantes con el remodelado de los  $A_{2A}R$ , afectando todos ellos a la regulación del calcio intracelular. De hecho, ya existen medicamentos dirigidos a los receptores de angiotensina, que están dando buenos resultados <sup>254</sup>. Sin embargo, la compartimentación de la respuesta a la inhibición de los  $A_{2A}R$ , reduciendo mayormente las liberaciones espontáneas de calcio sin afectar a otros mecanismos reguladores del calcio, hace de los  $A_{2A}R$  una opción atractiva como tratamiento de la FA porque su inhibición no comprometería a la contractilidad cardíaca.

### **Regulación del calcio intracelular latido-latido por el propio calcio**

Una limitación del primer estudio es que los efectos funcionales de los  $A_{2A}R$  asociados a su remodelado en la FA se basan, principalmente, en la modulación de la liberación espontánea de calcio en reposo, un fenómeno que tiene el potencial de inducir despolarizaciones anormales y actividad repetitiva. <sup>236</sup> Para comprobar si esta observación se extiende al miocardio auricular latiendo, el segundo sub-estudio investiga si miocitos auriculares aislados, sometidos a estimulación repetitiva, tienen el potencial de funcionar como focos ectópicos. Para este propósito se ha utilizado la técnica de patch-clamp para someter a los miocitos a frecuencias crecientes de estimulación y medir la respuesta latido-latido de las corrientes iónicas. Simultáneamente, se utilizó la visualización de calcio por microscopía confocal para caracterizar los correspondientes cambios en el calcio citoplasmático.

Una de las novedades de esta tesis es que hemos podido identificar mecanismos reguladores del calcio que determinan la naturaleza y la estabilidad de la respuesta latido-latido. Así, el segundo estudio muestra que un incremento en la frecuencia de estimulación puede inducir tres distintos patrones de respuesta latido-latido (uniforme, alternante o irregular) según la amplitud de la  $I_{Ca}$ , la frecuencia de  $I_{NCX}$  espontáneas, y el contenido de calcio del SR.

Observamos que una respuesta uniforme se asocia a una  $I_{Ca}$  pequeña y a pocas liberaciones espontáneas de calcio. En cambio, la aparición de respuestas no-uniformes es más temprana y más clara en cardiomiocitos con la  $I_{Ca}$  grande y con mayor incidencia de  $I_{NCX}$  espontáneas o con mayor contenido de calcio del SR. Entre la población de miocitos con respuestas no-uniformes, los que presentan respuestas alternantes tienen la  $I_{Ca}$  grande y la frecuencia de  $I_{NCX}$  elevada, mientras que las que presentan respuestas irregulares tienen mayor contenido de calcio del SR. Además la utilización de inhibidores selectivos de la  $I_{Ca}$  y el RyR2 confirmaba estas observaciones, sugiriendo que la manipulación farmacológica de la liberación de calcio del SR y/o la amplitud de la  $I_{Ca}$  podría ser una estrategia terapéutica para estabilizar la respuesta latido-latido a frecuencias de estimulación elevadas. De acuerdo con ello, se ha demostrado que un tratamiento agudo

con un antagonista de  $I_{Ca}$  suprime la inducción de las repolarizaciones alternantes discordantes que preceden a la FA <sup>7</sup>.

Otra novedad de esta tesis es la demostración de la activación de ondas de calcio en miocitos con respuestas latido-latido irregulares que podrían formar la base celular para la inducción de la actividad repetitiva, e incluso la re-entrada, que pueden llevar a la FA.

Así, las ondas de calcio inducidas a altas frecuencias de estimulación podrían actuar como “puntos singulares” en el tejido auricular que temporalmente no son despolarizables por el impulso normal, generando así zonas de bloqueo local para la formación de reentradas. Es tentador especular acerca de la generación de una re-entrada duradera dependiente de la frecuencia de las ondas de calcio y de la densidad de miocitos que presentan patrones irregulares con ondas de calcio. Además, la heterogeneidad en las respuestas observada en la población de miocitos estudiados podría ser, en sí misma, un substrato para la génesis de respuestas discordantes a frecuencias elevadas y de arritmias en el tejido auricular humano, tal como se ha observado en un modelo animal de corazón perfundido

220

En relación con estos resultados, es importante recordar que los experimentos de esta tesis se han realizado en miocitos auriculares humanos a temperatura ambiente. Asumiendo que la  $Q_{10}$  para procesos biológicos es  $\sim 2$ , eso significa que una frecuencia de estimulación de 0.5 Hz a temperatura ambiente correspondería a  $\sim 1.2$  Hz (o 72 latidos/min) a 37°C. Así, la gran mayoría de los miocitos (96%, ver figura 18 en Resultados) tendrían una respuesta latido-latido uniforme a 72 latidos/min, mientras las respuestas alternantes e irregulares principalmente se observaron a frecuencias superiores a 1 Hz, lo cual correspondería a frecuencias superiores a 150 latidos/min a 37°C. En cambio, la frecuencia de latidos fisiológicamente relevante para miocitos de pacientes con FA sería superior a 240/min a 37°C lo cual correspondería a una frecuencia de estimulación de  $\sim 1.6$  Hz a temperatura ambiente. A esta frecuencia los miocitos auriculares humanos sí presentan una gran heterogeneidad en la respuesta latido-latido con predominancia de respuestas alternantes e irregulares (ver figura 18 en Resultados) que podrían contribuir a la perpetuación de la FA por la inducción de la actividad repetitiva o por re-entrada.

Así pues, la elevada incidencia de despolarizaciones espontáneas observada en células de pacientes con FA <sup>3</sup>, podría facilitar alteraciones en la respuesta latido-latido, un fenómeno que precede y promueve la aparición de FA <sup>258, 259, 267</sup>. Puesto que la activación de los  $A_{2A}R$  promueve la estimulación del RyR2 dependiente de AMPc <sup>138</sup>, estos receptores podrían ser una diana terapéutica para la estabilización de la respuesta latido-latido inhibiendo la activación de los  $A_{2A}R$ . Por ello, el tercer objetivo de esta tesis se basó en investigar el

papel que juegan los receptores acoplados a proteínas  $G_s$ , y particularmente los  $A_{2A}R$ , en la regulación de la respuesta latido-latido a frecuencias crecientes de estimulación.

### **Papel de los $A_{2A}R$ en la regulación de la respuesta latido-latido**

Siguiendo esta línea y basándonos en los resultados anteriores de esta tesis, mostramos en el tercer sub-estudio que la naturaleza y el umbral de frecuencia para la inducción de respuestas latido-latido alternantes e irregulares, están relacionados con el grado de estimulación de la corriente de calcio tipo-L y de la tasa de liberaciones espontáneas de calcio del SR mediada por la PKA. Así, la estimulación beta-adrenérgica con isoproterenol incrementó la amplitud de la  $I_{Ca}$ , la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR y las respuestas latido-latido no uniformes, y este efecto se revirtió con la exposición de los cardiomiocitos al inhibidor de la PKA, H-89. La estimulación de los  $A_{2A}R$  tuvo efectos similares a la estimulación beta-adrenérgica sobre las  $I_{NCX}$  espontáneas y la respuesta latido-latido, pero sin afectar a la  $I_{Ca}$ , ni al contenido de calcio del SR.

En condiciones basales, es decir sin estimulación alguna, la inhibición de la PKA también redujo fuertemente la incidencia de respuestas no-uniformes y eliminó, casi por completo, la liberación espontánea de calcio. Esto último concuerda con la capacidad de la inhibición de los  $A_{2A}R$  de disminuir la frecuencia de liberaciones espontáneas de calcio en pacientes con FA a los niveles observados en pacientes sin FA (ver figuras 26 y 30 en Resultados). De acuerdo con ello, la inhibición de la activación de los  $A_{2A}R$  favoreció una respuesta latido-latido uniforme y este efecto era mayor en los cardiomiocitos de pacientes con FA.

En resumen, nuestros resultados muestran que una reducción en las liberaciones espontáneas de calcio del SR mediante la vía del AMPc, es el camino para la estabilización de la respuesta latido-latido a altas frecuencias de estimulación.

### **Relevancia clínica de los tres trabajos realizados**

El principal uso terapéutico de la adenosina es la estimulación de los receptores  $A_1$  en el tratamiento de la taquicardia supraventricular paroxística<sup>277</sup>. Pero, puesto que el 50 % de los fármacos que existen actualmente en el mercado tienen como diana terapéutica un receptor de membrana acoplado a una proteína G, existe un interés creciente por la modulación de los receptores de adenosina como tratamiento para muchas y diversas patologías.

En el sistema cardiovascular, el receptor  $A_1$  está implicado en el control del ritmo cardíaco. Por este motivo la adenosina se usa como antiarrítmica en taquicardias por reentrada que implican al nodo AV<sup>278</sup>. Los antagonistas de  $A_1$  también pueden ayudar en el tratamiento de la fibrilación<sup>274</sup> y de la isquemia miocárdica<sup>279</sup>. En el tejido auricular, la adenosina activa, mediante el receptor  $A_1$ , una corriente de potasio tiempo-dependiente igual que la



corriente de potasio estimulada por acetilcolina. La adenosina puede también tener efectos cardiovasculares a través de los  $A_{2A}R$ . Así, se utiliza adenosina para identificar focos ectópicos en pacientes con FA <sup>228</sup> y la administración del agonista de estos receptores, CGS21680, puede inducir taquicardia en fetos de cordero <sup>280</sup>. También se ha mostrado que la administración de un antagonista, SCH58261, puede bloquear incrementos de ritmo cardíacos y de presión sanguínea inducidos por un agonista del receptor <sup>281</sup>. Además, la activación de los  $A_{2A}R$  puede modular la función adrenérgica <sup>187</sup>.

A pesar de que la terapia farmacológica enfocada a los receptores de adenosina sea complicada debido al hecho de que la distribución de estos receptores en el organismo es muy amplia, la localización y características específicas de los subtipos expresados en cardiomiocitos, como por ejemplo la compartimentación de la respuesta a la activación de los  $A_{2A}R$  y su sobre-expresión en pacientes con FA, hace interesante la propuesta de tratamientos para enfermedades cardiovasculares a partir de la modulación de estos receptores.

Teniendo en cuenta que la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR está incrementada en FA, que los  $A_{2A}R$  modulan la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio del SR vía PKA y que la expresión de estos receptores aumenta en la FA, el planteamiento de los  $A_{2A}R$  como diana farmacológica en la FA es una opción con base fisiológica. De hecho, los resultados de los tres estudios que conforman esta tesis confieren una base razonable para el uso terapéutico de los antagonistas de los  $A_{2A}R$  como método de control de las liberaciones espontáneas de calcio del SR y de estabilización de la respuesta latido-a-latido a ritmos auriculares elevados. Si bien los resultados de esta tesis muestran que el control farmacológico tanto de la amplitud de la  $I_{Ca}$  como de la liberación de calcio del SR serviría para estabiliza la respuesta latido-latido, la modulación de las liberaciones espontáneas de calcio del SR a través de los  $A_{2A}R$  proporciona, gracias a la compartimentación de la respuesta de la activación de estos receptores, un mecanismo de actuación que no afectaría de forma negativa a otros elementos de la homeostasis de la dinámica del calcio intracelular. Así, esta tesis propone los  $A_{2A}R$  como nueva diana terapéutica en arritmias cardíacas y especialmente en la FA.

## VIII. CONCLUSIONES

---



1. El elevado nivel de liberaciones espontáneas de calcio, observado en miocitos auriculares de pacientes con FA, se asocia a un aumento de la expresión de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  en estos pacientes.
2. Esta observación se explica por la activación de un mayor número de receptores de adenosina  $A_{2A}$  por adenosina endógena en miocitos de pacientes con FA, que aumenta la fosforilación del RyR2 estimulando la liberación espontánea de calcio del SR.
3. La inhibición de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  reduce la liberación espontánea de calcio en miocitos de pacientes con FA a los niveles observados en miocitos de pacientes sin esta arritmia, sin afectar a los canales de calcio ni al contenido de calcio del SR.
4. El incremento de la frecuencia de estimulación induce alternancia o irregularidades en la liberación latido-latido de calcio del SR, que a la vez produce alternancia o irregularidades en la contracción celular y en la corriente de calcio tipo-L.
5. Los miocitos auriculares humanos con mayor amplitud de la  $I_{Ca}$  y con elevada incidencia de liberaciones espontáneas de calcio son más propensos a presentar una respuesta alternante, mientras una  $I_{Ca}$  pequeña y una liberación espontánea de calcio de baja incidencia favorecen una respuesta latido-latido uniforme.
6. La respuesta latido-latido se puede regular a través de una manipulación farmacológica directa de los canales de calcio de tipo-L, de SERCA, y del RyR.
7. La inducción de respuestas latido-latido no-uniformes esta ligada a una estimulación basal de la liberación de calcio del SR mediado por PKA, y la manipulación farmacológica de la activación de receptores acoplados a proteínas  $G_s$  o a PKA, regula la inducción de respuestas no-uniformes.
8. La disminución de la liberación espontánea de calcio y de las respuestas latido-latido no-uniformes por antagonistas de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  en mioitos de pacientes con FA, proporciona un base fisiopatológica para ensayar el bloqueo de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  como una nueva terapia para prevenir la recurrencia de la fibrilación auricular.



## **IX. BIBLIOGRAFIA**

---



1. Blatter, L. A.; Kockskamper, J.; Sheehan, K. A.; Zima, A. V.; Huser, J.; Lipsius, S. L., Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes. *J Physiol* **2003**, 546, (Pt 1), 19-31.
2. Cranefield, P. F.; Aronson, R. S., Torsade de pointes and other pause-induced ventricular tachycardias: the short-long-short sequence and early afterdepolarizations. *Pacing Clin Electrophysiol* **1988**, 11, (6 Pt 1), 670-8.
3. Hove-Madsen, L.; Llach, A.; Bayes-Genis, A.; Roura, S.; Rodriguez Font, E.; Aris, A.; Cinca, J., Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation* **2004**, 110, (11), 1358-63.
4. Kockskamper, J.; Sheehan, K. A.; Bare, D. J.; Lipsius, S. L.; Mignery, G. A.; Blatter, L. A., Activation and propagation of Ca<sup>2+</sup> release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Biophys J* **2001**, 81, (5), 2590-605.
5. Diaz, M. E.; Eisner, D. A.; O'Neill, S. C., Depressed ryanodine receptor activity increases variability and duration of the systolic Ca<sup>2+</sup> transient in rat ventricular myocytes. *Circ Res* **2002**, 91, (7), 585-93.
6. Huser, J.; Blatter, L. A.; Lipsius, S. L., Intracellular Ca<sup>2+</sup> release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J Physiol* **2000**, 524 Pt 2, 415-22.
7. Hiromoto, K.; Shimizu, H.; Furukawa, Y.; Kanemori, T.; Mine, T.; Masuyama, T.; Ohyanagi, M., Discordant repolarization alternans-induced atrial fibrillation is suppressed by verapamil. *Circ J* **2005**, 69, (11), 1368-73.
8. Kockskamper, J.; Blatter, L. A., Subcellular Ca<sup>2+</sup> alternans represents a novel mechanism for the generation of arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> waves in cat atrial myocytes. *J Physiol* **2002**, 545, (Pt 1), 65-79.
9. Fabiato, A., Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* **1985**, 85, (2), 291-320.
10. Eisner, D. A.; Lederer, W. J., Na-Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity. *Am J Physiol* **1985**, 248, (3 Pt 1), C189-202.
11. Clapham, D. E., Calcium signaling. *Cell* **1995**, 80, (2), 259-68.
12. Ringer, S., A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* **1883**, 4, (1), 29-42 3.
13. Woods, N. M.; Cuthbertson, K. S.; Cobbold, P. H., Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature* **1986**, 319, (6054), 600-2.
14. Franzini-Armstrong, C., Details of the I band struture as revealed by the localization of ferritin. *Tissue Cell* **1970**, 2, (2), 327-38.
15. Bers, D. M., Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. . **2001**.
16. Rees, D. A.; Charlton, J.; Ataliotis, P.; Woods, A.; Stones, A. J.; Bayley, S. A., Myosin regulation and calcium transients in fibroblast shape change, attachment, and patching. *Cell Motil Cytoskeleton* **1989**, 13, (2), 112-22.
17. Sandow, A., Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J Biol Med* **1952**, 25, (3), 176-201.
18. Fill, M.; Copello, J. A., Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* **2002**, 82, (4), 893-922.
19. Sandow, A., Fundamental mechanics of skeletal muscle contraction. *Am J Phys Med* **1952**, 31, (2), 103-25.
20. Stephenson, D. G.; Lamb, G. D.; Stephenson, G. M., Events of the excitation-contraction-relaxation (E-C-R) cycle in fast- and slow-twitch mammalian muscle fibres relevant to muscle fatigue. *Acta Physiol Scand* **1998**, 162, (3), 229-45.



21. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; Freeman, W. H., *Biochemistry*. **2002**.
22. Vandenberg, C. A.; Horn, R., Inactivation viewed through single sodium channels. *J Gen Physiol* **1984**, 84, (4), 535-64.
23. Kunze, D. L.; Lacerda, A. E.; Wilson, D. L.; Brown, A. M., Cardiac Na currents and the inactivating, reopening, and waiting properties of single cardiac Na channels. *J Gen Physiol* **1985**, 86, (5), 691-719.
24. Berridge, M. J., Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* **1997**, 499 ( Pt 2), 291-306.
25. Lipp, P.; Niggli, E., Sodium current-induced calcium signals in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* **1994**, 474, (3), 439-46.
26. Miura, Y.; Kimura, J., Sodium-calcium exchange current. Dependence on internal Ca and Na and competitive binding of external Na and Ca. *J Gen Physiol* **1989**, 93, (6), 1129-45.
27. Bers, D. M.; Bridge, J. H.; Spitzer, K. W., Intracellular Ca<sup>2+</sup> transients during rapid cooling contractures in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* **1989**, 417, 537-53.
28. Callewaert, G.; Carmeliet, E.; Vereecke, J., Single cardiac Purkinje cells: general electrophysiology and voltage-clamp analysis of the pace-maker current. *J Physiol* **1984**, 349, 643-61.
29. Noble, D., The initiation of the heart beat. *Adv Sci* **1966**, 23, (114), 412-8.
30. Tsien, R. W.; Carpenter, D. O., Ionic mechanisms of pacemaker activity in cardiac Purkinje fibers. *Fed Proc* **1978**, 37, (8), 2127-31.
31. Delmar, M.; Jalife, J.; Michaels, D. C., Effects of changes in excitability and intercellular coupling on synchronization in the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* **1986**, 370, 127-50.
32. Beuckelmann, D. J.; Wier, W. G., Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J Physiol* **1988**, 405, 233-55.
33. Endo, M.; Tanaka, M.; Ogawa, Y., Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* **1970**, 228, (5266), 34-6.
34. Beuckelmann, D. J.; Wier, W. G., Sodium-calcium exchange in guinea-pig cardiac cells: exchange current and changes in intracellular Ca<sup>2+</sup>. *J Physiol* **1989**, 414, 499-520.
35. Bootman, M. D.; Berridge, M. J., The elemental principles of calcium signaling. *Cell* **1995**, 83, (5), 675-8.
36. Yue, D. T.; Marban, E.; Wier, W. G., Relationship between force and intracellular [Ca<sup>2+</sup>] in tetanized mammalian heart muscle. *J Gen Physiol* **1986**, 87, (2), 223-42.
37. Backx, P. H.; Gao, W. D.; Azan-Backx, M. D.; Marban, E., The relationship between contractile force and intracellular [Ca<sup>2+</sup>] in intact rat cardiac trabeculae. *J Gen Physiol* **1995**, 105, (1), 1-19.
38. Puglisi, J. L.; Yuan, W.; Bassani, J. W.; Bers, D. M., Ca(2+) influx through Ca(2+) channels in rabbit ventricular myocytes during action potential clamp: influence of temperature. *Circ Res* **1999**, 85, (6), e7-e16.
39. Tamrazi, A.; Katzenellenbogen, J. A., Site-specific fluorescent labeling of estrogen receptors and structure-activity relationships of ligands in terms of receptor dimer stability. *Methods Enzymol* **2003**, 364, 37-53.
40. Anson, B. D.; Roberts, W. M., Sodium channel distribution on uninnervated and innervated embryonic skeletal myotubes. *J Neurobiol* **2001**, 48, (1), 42-57.
41. Kotsias, B. A.; Venosa, R. A., Sodium influx during action potential in innervated and denervated rat skeletal muscles. *Muscle Nerve* **2001**, 24, (8), 1026-33.
42. Medhurst, A. D.; Rennie, G.; Chapman, C. G.; Meadows, H.; Duckworth, M. D.; Kelsell, R. E.; Gloger, II; Pangalos, M. N., Distribution analysis of human two pore domain

potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res* **2001**, 86, (1-2), 101-14.

43. Shapiro, M. S.; Gomeza, J.; Hamilton, S. E.; Hille, B.; Loose, M. D.; Nathanson, N. M.; Roche, J. P.; Wess, J., Identification of subtypes of muscarinic receptors that regulate Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channel activity in sympathetic neurons. *Life Sci* **2001**, 68, (22-23), 2481-7.

44. Fatt, P.; Katz, B., The effect of inhibitory nerve impulses on a crustacean muscle fibre. *J Physiol* **1953**, 121, (2), 374-89.

45. Hagiwara, S.; Byerly, L., Membrane biophysics of calcium currents. *Fed Proc* **1981**, 40, (8), 2220-5.

46. Reuter, H., The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol* **1967**, 192, (2), 479-92.

47. Carbone, E.; Lux, H. D., A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* **1984**, 310, (5977), 501-2.

48. Fedulova, S. A.; Kostyuk, P. G.; Veselovsky, N. S., Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* **1985**, 359, 431-46.

49. Hillman, D.; Chen, S.; Aung, T. T.; Cherksey, B.; Sugimori, M.; Llinas, R. R., Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, 88, (16), 7076-80.

50. Randall, A.; Tsien, R. W., Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* **1995**, 15, (4), 2995-3012.

51. Cherksey, B. D.; Sugimori, M.; Llinas, R. R., Properties of calcium channels isolated with spider toxin, FTX. *Ann N Y Acad Sci* **1991**, 635, 80-9.

52. Bourinet, E.; Soong, T. W.; Sutton, K.; Slaymaker, S.; Mathews, E.; Monteil, A.; Zamponi, G. W.; Nargeot, J.; Snutch, T. P., Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* **1999**, 2, (5), 407-15.

53. Campbell, D. L.; Rasmusson, R. L.; Strauss, H. C., Theoretical study of the voltage and concentration dependence of the anomalous mole fraction effect in single calcium channels. New insights into the characterization of multi-ion channels. *Biophys J* **1988**, 54, (5), 945-54.

54. Bodi, I.; Mikala, G.; Koch, S. E.; Akhter, S. A.; Schwartz, A., The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* **2005**, 115, (12), 3306-17.

55. Ertel, E. A.; Campbell, K. P.; Harpold, M. M.; Hofmann, F.; Mori, Y.; Perez-Reyes, E.; Schwartz, A.; Snutch, T. P.; Tanabe, T.; Birnbaumer, L.; Tsien, R. W.; Catterall, W. A., Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **2000**, 25, (3), 533-5.

56. Curtis, B. M.; Catterall, W. A., Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1985**, 82, (8), 2528-32.

57. Hosey, M. M.; Borsotto, M.; Lazdunski, M., Phosphorylation and dephosphorylation of dihydropyridine-sensitive voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in skeletal muscle membranes by cAMP- and Ca<sup>2+</sup>-dependent processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, 83, (11), 3733-7.

58. Imagawa, T.; Leung, A. T.; Campbell, K. P., Phosphorylation of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel by an intrinsic protein kinase in isolated triads from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **1987**, 262, (17), 8333-9.

59. Nastainczyk, W.; Rohrkasten, A.; Sieber, M.; Rudolph, C.; Schachtele, C.; Marme, D.; Hofmann, F., Phosphorylation of the purified receptor for calcium channel blockers by cAMP kinase and protein kinase C. *Eur J Biochem* **1987**, 169, (1), 137-42.

60. O'Callahan, C. M.; Hosey, M. M., Multiple phosphorylation sites in the 165-kilodalton peptide associated with dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Biochemistry* **1988**, 27, (16), 6071-7.

61. Mikami, A.; Imoto, K.; Tanabe, T.; Niidome, T.; Mori, Y.; Takeshima, H.; Narumiya, S.; Numa, S., Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* **1989**, 340, (6230), 230-3.
62. Perez-Reyes, E.; Wei, X. Y.; Castellano, A.; Birnbaumer, L., Molecular diversity of L-type calcium channels. Evidence for alternative splicing of the transcripts of three non-allelic genes. *J Biol Chem* **1990**, 265, (33), 20430-6.
63. Snutch, T. P.; Tomlinson, W. J.; Leonard, J. P.; Gilbert, M. M., Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron* **1991**, 7, (1), 45-57.
64. Takahashi, M.; Seagar, M. J.; Jones, J. F.; Reber, B. F.; Catterall, W. A., Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, 84, (15), 5478-82.
65. Van Petegem, F.; Minor, D. L., Jr., The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. *Biochem Soc Trans* **2006**, 34, (Pt 5), 887-93.
66. Ferreira, G.; Yi, J.; Rios, E.; Shirokov, R., Ion-dependent inactivation of barium current through L-type calcium channels. *J Gen Physiol* **1997**, 109, (4), 449-61.
67. Brehm, P.; Eckert, R.; Tillotson, D., Calcium-mediated inactivation of calcium current in Paramecium. *J Physiol* **1980**, 306, 193-203.
68. Lee, K. S.; Marban, E.; Tsien, R. W., Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* **1985**, 364, 395-411.
69. Piacentino, V., 3rd; Weber, C. R.; Chen, X.; Weisser-Thomas, J.; Margulies, K. B.; Bers, D. M.; Houser, S. R., Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* **2003**, 92, (6), 651-8.
70. Cheng, T. H.; Lee, F. Y.; Wei, J.; Lin, C. I., Comparison of calcium-current in isolated atrial myocytes from failing and nonfailing human hearts. *Mol Cell Biochem* **1996**, 157, (1-2), 157-62.
71. Barrere-Lemaire, S.; Piot, C.; Leclercq, F.; Nargeot, J.; Richard, S., Facilitation of L-type calcium currents by diastolic depolarization in cardiac cells: impairment in heart failure. *Cardiovasc Res* **2000**, 47, (2), 336-49.
72. Van Wagoner, D. R.; Pond, A. L.; Lamorgese, M.; Rossie, S. S.; McCarthy, P. M.; Nerbonne, J. M., Atrial L-type Ca<sup>2+</sup> currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* **1999**, 85, (5), 428-36.
73. Nicoll, D. A.; Longoni, S.; Philipson, K. D., Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Science* **1990**, 250, (4980), 562-5.
74. Li, Z.; Matsuoka, S.; Hryshko, L. V.; Nicoll, D. A.; Bersohn, M. M.; Burke, E. P.; Lifton, R. P.; Philipson, K. D., Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Biol Chem* **1994**, 269, (26), 17434-9.
75. Nicoll, D. A.; Quednau, B. D.; Qui, Z.; Xia, Y. R.; Lusic, A. J.; Philipson, K. D., Cloning of a third mammalian Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCX3. *J Biol Chem* **1996**, 271, (40), 24914-21.
76. Durkin, J. T.; Ahrens, D. C.; Pan, Y. C.; Reeves, J. P., Purification and amino-terminal sequence of the bovine cardiac sodium-calcium exchanger: evidence for the presence of a signal sequence. *Arch Biochem Biophys* **1991**, 290, (2), 369-75.
77. Hryshko, L. V.; Nicoll, D. A.; Weiss, J. N.; Philipson, K. D., Biosynthesis and initial processing of the cardiac sarcolemmal Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Biochim Biophys Acta* **1993**, 1151, (1), 35-42.
78. Nicoll, D. A.; Ottolia, M.; Lu, L.; Lu, Y.; Philipson, K. D., A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Biol Chem* **1999**, 274, (2), 910-7.

79. Furman, I.; Cook, O.; Kasir, J.; Low, W.; Rahamimoff, H., The putative amino-terminal signal peptide of the cloned rat brain Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger gene (RBE-1) is not mandatory for functional expression. *J Biol Chem* **1995**, 270, (32), 19120-7.
80. Loo, T. W.; Ho, C.; Clarke, D. M., Expression of a functionally active human renal sodium-calcium exchanger lacking a signal sequence. *J Biol Chem* **1995**, 270, (33), 19345-50.
81. Philipson, K. D.; Nicoll, D. A., Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol* **2000**, 62, 111-33.
82. Blaustein, M. P.; Lederer, W. J., Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* **1999**, 79, (3), 763-854.
83. Hilgemann, D. W., New insights into the molecular and cellular workings of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Am J Physiol Cell Physiol* **2004**, 287, (5), C1167-72.
84. Hobai, I. A.; O'Rourke, B., The potential of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange blockers in the treatment of cardiac disease. *Expert Opin Investig Drugs* **2004**, 13, (6), 653-64.
85. Wongcharoen, W.; Chen, Y. C.; Chen, Y. J.; Chang, C. M.; Yeh, H. I.; Lin, C. I.; Chen, S. A., Effects of a Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitor on pulmonary vein electrical activity and ouabain-induced arrhythmogenicity. *Cardiovasc Res* **2006**, 70, (3), 497-508.
86. Reddy, A. S.; Narasimhulu, S. B.; Safadi, F.; Golovkin, M., A plant kinesin heavy chain-like protein is a calmodulin-binding protein. *Plant J* **1996**, 10, (1), 9-21.
87. Tada, M.; Katz, A. M., Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol* **1982**, 44, 401-23.
88. Brandl, C. J.; deLeon, S.; Martin, D. R.; MacLennan, D. H., Adult forms of the Ca<sup>2+</sup>ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* **1987**, 262, (8), 3768-74.
89. MacLennan, D. H.; Rice, W. J.; Odermatt, A., Structure/function analysis of the Ca<sup>2+</sup> binding and translocation domain of SERCA1 and the role in Brody disease of the ATP2A1 gene encoding SERCA1. *Ann N Y Acad Sci* **1997**, 834, 175-85.
90. Tada, M.; Toyofuku, T., Molecular regulation of phospholamban function and expression. *Trends Cardiovasc Med* **1998**, 8, (8), 330-40.
91. Hicks, M. J.; Shigekawa, M.; Katz, A. M., Mechanism by which cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulates calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* **1979**, 44, (3), 384-91.
92. Inui, M.; Chamberlain, B. K.; Saito, A.; Fleischer, S., The nature of the modulation of Ca<sup>2+</sup> transport as studied by reconstitution of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **1986**, 261, (4), 1794-800.
93. Kirchberger, M. A.; Tada, M.; Katz, A. M., Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **1974**, 249, (19), 6166-73.
94. Tada, M., [Impedance loci of the giant squid axon during transient and constant conditions]. *Shigaku* **1986**, 74, (5), 1132-45.
95. Le Peuch, C. J.; Haiech, J.; Demaille, J. G., Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry* **1979**, 18, (23), 5150-7.
96. Simmerman, H. K.; Collins, J. H.; Theibert, J. L.; Wegener, A. D.; Jones, L. R., Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem* **1986**, 261, (28), 13333-41.
97. Iwasa, Y.; Hosey, M. M., Phosphorylation of cardiac sarcolemma proteins by the calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **1984**, 259, (1), 534-40.

98. Thastrup, O.; Cullen, P. J.; Drobak, B. K.; Hanley, M. R.; Dawson, A. P., Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, 87, (7), 2466-70.
99. Seidler, F. J.; Mills, E., Non-neurogenic stimulation of adrenomedullary secretion during endotoxemia in the one day old rat. *Life Sci* **1989**, 45, (5), 379-81.
100. Nakamura, H.; Nakasaki, Y.; Matsuda, N.; Shigekawa, M., Inhibition of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone. *J Biochem* **1992**, 112, (6), 750-5.
101. Fabiato, A., Use of aequorin for the appraisal of the hypothesis of the release of calcium from the sarcoplasmic reticulum induced by a change of pH in skinned cardiac cells. *Cell Calcium* **1985**, 6, (1-2), 95-108.
102. Fabiato, A.; Fabiato, F., Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* **1978**, 276, 233-55.
103. Kranias, E. G.; Bers, D. M., Calcium and cardiomyopathies. *Subcell Biochem* **2007**, 45, 523-37.
104. He, H.; Giordano, F. J.; Hilal-Dandan, R.; Choi, D. J.; Rockman, H. A.; McDonough, P. M.; Bluhm, W. F.; Meyer, M.; Sayen, M. R.; Swanson, E.; Dillmann, W. H., Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* **1997**, 100, (2), 380-9.
105. Wu, C. K.; Tseng, C. D.; Huang, Y. T.; Hsieh, C. S.; Tsai, W. S.; Lin, J. L.; Chiang, F. T.; Tsai, C. T., Angiotensin II does not influence expression of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase in atrial myocytes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **2009**, 10, (3), 121-6.
106. Loukianov, E.; Ji, Y.; Grupp, I. L.; Kirkpatrick, D. L.; Baker, D. L.; Loukianova, T.; Grupp, G.; Lytton, J.; Walsh, R. A.; Periasamy, M., Enhanced myocardial contractility and increased  $\text{Ca}^{2+}$  transport function in transgenic hearts expressing the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Circ Res* **1998**, 83, (9), 889-97.
107. Venetucci, L. A.; Trafford, A. W.; O'Neill, S. C.; Eisner, D. A., Na/Ca exchange: regulator of intracellular calcium and source of arrhythmias in the heart. *Ann N Y Acad Sci* **2007**, 1099, 315-25.
108. Hajdu, S.; Leonard, E., Cardioglobulin. Assay methods. *Circ Res* **1961**, 9, 881-90.
109. Jenden, D. J.; Fairhurst, A. S., The pharmacology of ryanodine. *Pharmacol Rev* **1969**, 21, (1), 1-25.
110. Sutko, J. L.; Willerson, J. T., Ryanodine alteration of the contractile state of rat ventricular myocardium. Comparison with dog, cat, and rabbit ventricular tissues. *Circ Res* **1980**, 46, (3), 332-43.
111. Priori, S. G.; Napolitano, C., Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release channels. *J Clin Invest* **2005**, 115, (8), 2033-8.
112. Inui, M.; Saito, A.; Fleischer, S., Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem* **1987**, 262, (32), 15637-42.
113. Coronado, R.; Morrisette, J.; Sukhareva, M.; Vaughan, D. M., Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* **1994**, 266, (6 Pt 1), C1485-504.
114. Hakamata, Y.; Nakai, J.; Takeshima, H.; Imoto, K., Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* **1992**, 312, (2-3), 229-35.
115. Meissner, G., Ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* **1994**, 56, 485-508.

116. Schneider, M. F., Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu Rev Physiol* **1994**, 56, 463-84.
117. Zucchi, R.; Ronca-Testoni, S., The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* **1997**, 49, (1), 1-51.
118. Gyorke, S.; Fill, M., Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca(2+)-induced Ca<sup>2+</sup> release in heart. *Science* **1993**, 260, (5109), 807-9.
119. Clapper, D. L.; Walseth, T. F.; Dargie, P. J.; Lee, H. C., Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem* **1987**, 262, (20), 9561-8.
120. Galione, A.; Lee, H. C.; Busa, W. B., Ca(2+)-induced Ca<sup>2+</sup> release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* **1991**, 253, (5024), 1143-6.
121. Rousseau, E.; Ladine, J.; Liu, Q. Y.; Meissner, G., Activation of the Ca<sup>2+</sup> release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch Biochem Biophys* **1988**, 267, (1), 75-86.
122. Nayler, W. G.; Daile, P.; Chipperfield, D.; Gan, K., Effect of ryanodine on calcium in cardiac muscle. *Am J Physiol* **1970**, 219, (6), 1620-6.
123. Fairhurst, A. S.; Hasselbach, W., Calcium efflux from a heavy sarcotubular fraction. Effects of ryanodine, caffeine and magnesium. *Eur J Biochem* **1970**, 13, (3), 504-9.
124. Sitsapesan, R.; Williams, A. J., Regulation of the gating of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel by luminal Ca<sup>2+</sup>. *J Membr Biol* **1994**, 137, (3), 215-26.
125. Lukyanenko, V.; Gyorke, I.; Gyorke, S., Regulation of calcium release by calcium inside the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes. *Pflugers Arch* **1996**, 432, (6), 1047-54.
126. Xu, L.; Tripathy, A.; Pasek, D. A.; Meissner, G., Potential for pharmacology of ryanodine receptor/calcium release channels. *Ann N Y Acad Sci* **1998**, 853, 130-48.
127. Bers, D. M.; Fill, M., Coordinated feet and the dance of ryanodine receptors. *Science* **1998**, 281, (5378), 790-1.
128. Witcher, D. R.; Kovacs, R. J.; Schulman, H.; Cefali, D. C.; Jones, L. R., Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* **1991**, 266, (17), 11144-52.
129. Ojeda, F.; Folch, H.; Guarda, M. I.; Jastorff, B.; Diehl, H. A., Induction of apoptosis in thymocytes: new evidence for an interaction of PKC and PKA pathways. *Biol Chem Hoppe Seyler* **1995**, 376, (6), 389-93.
130. Kaftan, E.; Marks, A. R.; Ehrlich, B. E., Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca(2+)-release channels from cardiac muscle. *Circ Res* **1996**, 78, (6), 990-7.
131. Birkeland, J. A.; Sejersted, O. M.; Taraldsen, T.; Sjaastad, I., EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J* **2005**, 39, (1-2), 13-23.
132. Wehrens, X. H.; Lehnart, S. E.; Marks, A. R., Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol* **2005**, 67, 69-98.
133. Kontula, K.; Laitinen, P. J.; Lehtonen, A.; Toivonen, L.; Viitasalo, M.; Swan, H., Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: recent mechanistic insights. *Cardiovasc Res* **2005**, 67, (3), 379-87.
134. Cheng, B.; McMahon, D. G.; Mattson, M. P., Modulation of calcium current, intracellular calcium levels and cell survival by glucose deprivation and growth factors in hippocampal neurons. *Brain Res* **1993**, 607, (1-2), 275-85.
135. Thorn, P.; Lawrie, A. M.; Smith, P. M.; Gallacher, D. V.; Petersen, O. H., Ca<sup>2+</sup> oscillations in pancreatic acinar cells: spatiotemporal relationships and functional implications. *Cell Calcium* **1993**, 14, (10), 746-57.

136. Gilkey, J. C.; Jaffe, L. F.; Ridgway, E. B.; Reynolds, G. T., A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. *J Cell Biol* **1978**, 76, (2), 448-66.
137. Marks, A. R., Ryanodine receptors, FKBP12, and heart failure. *Front Biosci* **2002**, 7, d970-7.
138. Hove-Madsen, L.; Prat-Vidal, C.; Llach, A.; Ciruela, F.; Casado, V.; Lluís, C.; Bayes-Genis, A.; Cinca, J.; Franco, R., Adenosine A2A receptors are expressed in human atrial myocytes and modulate spontaneous sarcoplasmic reticulum calcium release. *Cardiovasc Res* **2006**, 72, (2), 292-302.
139. Berridge, M. J., Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* **1987**, 494, 39-51.
140. Marks, A. R., Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol* **1997**, 272, (2 Pt 2), H597-605.
141. Taylor, C. W., Inositol trisphosphate receptors: Ca<sup>2+</sup>-modulated intracellular Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochim Biophys Acta* **1998**, 1436, (1-2), 19-33.
142. Moschella, M. C.; Marks, A. R., Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in cardiac myocytes. *J Cell Biol* **1993**, 120, (5), 1137-46.
143. Alberts, *Biología molecular de la célula*. **2004**.
144. Vries, L. D.; Zheng, B.; Fischer, T.; Elenko, E.; Farquhar, M. G., The regulator of G protein signaling family. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2000**, 40, (1), 235-271.
145. Gambassi, G.; Spurgeon, H. A.; Ziman, B. D.; Lakatta, E. G.; Capogrossi, M. C., Opposing effects of alpha 1-adrenergic receptor subtypes on Ca<sup>2+</sup> and pH homeostasis in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* **1998**, 274, (4 Pt 2), H1152-62.
146. Beavo, J. A., Multiple isozymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **1988**, 22, 1-38.
147. Beavo, J. A.; Reifsnnyder, D. H., Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **1990**, 11, (4), 150-5.
148. Schmitz, W.; von der Leyen, H.; Meyer, W.; Neumann, J.; Scholz, H., Phosphodiesterase inhibition and positive inotropic effects. *J Cardiovasc Pharmacol* **1989**, 14 Suppl 3, S11-4.
149. Francis, S. H.; Turko, I. V.; Grimes, K. A.; Corbin, J. D., Histidine-607 and histidine-643 provide important interactions for metal support of catalysis in phosphodiesterase-5. *Biochemistry* **2000**, 39, (31), 9591-6.
150. Xiao, R. P.; Hohl, C.; Altschuld, R.; Jones, L.; Livingston, B.; Ziman, B.; Tantini, B.; Lakatta, E. G., Beta 2-adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca<sup>2+</sup> dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation. *J Biol Chem* **1994**, 269, (29), 19151-6.
151. Xiao, R. P.; Lakatta, E. G., Beta 1-adrenoceptor stimulation and beta 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> current in single rat ventricular cells. *Circ Res* **1993**, 73, (2), 286-300.
152. Jurevicius, J.; Skeberdis, V. A.; Fischmeister, R., Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in cAMP compartmentation following beta2-adrenergic stimulation of I<sub>Ca,L</sub> in frog ventricular myocytes. *J Physiol* **2003**, 551, (Pt 1), 239-52.
153. Devic, E.; Xiang, Y.; Gould, D.; Kobilka, B., Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* **2001**, 60, (3), 577-83.
154. Skeberdis VA, G. V., Zablockaitė D, Treinys R, Mačianskienė R, Bogdelis A, Jurevičius J, Fischmeister R, β3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca<sup>2+</sup> current. *J Clin Invest* **2008**, 118, 3219-3227.

155. Leblais, V.; Demolombe, S.; Vallette, G.; Langin, D.; Baro, I.; Escande, D.; Gauthier, C., beta3-adrenoceptor control the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J Biol Chem* **1999**, *274*, (10), 6107-13.
156. Gauthier, C.; Leblais, V.; Kobzik, L.; Trochu, J. N.; Khandoudi, N.; Bril, A.; Balligand, J. L.; Le Marec, H., The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* **1998**, *102*, (7), 1377-84.
157. Brodde, O. E.; Bruck, H.; Leineweber, K., Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J Pharmacol Sci* **2006**, *100*, (5), 323-37.
158. Simiand, J.; Keane, P. E.; Guitard, J.; Langlois, X.; Gonalons, N.; Martin, P.; Bianchetti, A.; Le Fur, G.; Soubrie, P., Antidepressant profile in rodents of SR 58611A, a new selective agonist for atypical beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **1992**, *219*, (2), 193-201.
159. Muzzin, P.; Seydoux, J.; Giacobino, J. P.; Venter, J. C.; Fraser, C., Discrepancies between the affinities of binding and action of the novel beta-adrenergic agonist BRL 37344 in rat brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **1988**, *156*, (1), 375-82.
160. Boron, W. F.; Boulpaep, E. L., The electrogenic Na/HCO<sub>3</sub> cotransporter. *Kidney Int* **1989**, *36*, (3), 392-402.
161. Waeber, C.; Schoeffter, P.; Hoyer, D.; Palacios, J. M., The serotonin 5-HT<sub>1D</sub> receptor: a progress review. *Neurochem Res* **1990**, *15*, (6), 567-82.
162. Castro, L.; Mialet-Perez, J.; Guillemeau, A.; Stillitano, F.; Zolk, O.; Eschenhagen, T.; Lezoualc'h, F.; Bochet, P.; Fischmeister, R., Differential functional effects of two 5-HT<sub>4</sub> receptor isoforms in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **2005**, *39*, (2), 335-44.
163. Lezoualc'h, F.; Steplewski, K.; Sartiani, L.; Mugelli, A.; Fischmeister, R.; Bril, A., Quantitative mRNA analysis of serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor isoforms, calcium handling proteins and ion channels in human atrial fibrillation *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, *357*, (1), 218-224.
164. Brake, A. J.; Wagenbach, M. J.; Julius, D., New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **1994**, *371*, (6497), 519-23.
165. Burnstock, G.; Kennedy, C., Is there a basis for distinguishing two types of P<sub>2</sub>-purinoceptor? *Gen Pharmacol* **1985**, *16*, (5), 433-40.
166. Gordon, J.; Guy, G.; Walker, L.; Nathan, P.; Exley, R.; Clemens, M., Autocrine growth of human B lymphocytes: maintained response to autostimulatory factors is the special feature of immortalization by Epstein-Barr virus--a hypothesis. *Med Oncol Tumor Pharmacother* **1986**, *3*, (3-4), 269-73.
167. Hourani, S. M.; Cusack, N. J., Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacol Rev* **1991**, *43*, (3), 243-98.
168. Lerman, B. B.; Belardinelli, L., Cardiac electrophysiology of adenosine. Basic and clinical concepts. *Circulation* **1991**, *83*, (5), 1499-509.
169. Meghji, P.; Holmquist, C. A.; Newby, A. C., Adenosine formation and release from neonatal-rat heart cells in culture. *Biochem J* **1985**, *229*, (3), 799-805.
170. Bardenheuer, H.; Whelton, B.; Sparks, H. V., Jr., Adenosine release by the isolated guinea pig heart in response to isoproterenol, acetylcholine, and acidosis: the minimal role of vascular endothelium. *Circ Res* **1987**, *61*, (4), 594-600.
171. Franco, R.; Centelles, J. J., Release of adenosine deaminase from rat intestinal mucosa. *Biochem Soc Trans* **1990**, *18*, (4), 641-2.
172. Aran, J. M.; Colomer, D.; Matutes, E.; Vives-Corrans, J. L.; Franco, R., Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear blood cells: immunochemical



- localization using light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* **1991**, 39, (8), 1001-8.
173. Baldwin, S. A.; Mackey, J. R.; Cass, C. E.; Young, J. D., Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* **1999**, 5, (5), 216-24.
174. Moser, G. H.; Schrader, J.; Deussen, A., Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* **1989**, 256, (4 Pt 1), C799-806.
175. Prat-Vidal, C., Papel de los receptores de adenosina, de la ecto-adenosina desaminasa y del CD26 en la fisiopatología del sistema cardiovascular. **2005**.
176. Dalziel, H. H.; Westfall, D. P., Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Rev* **1994**, 46, (4), 449-66.
177. Ralevic, V.; Burnstock, G., Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **1998**, 50, (3), 413-92.
178. Shen, W. K.; Kurachi, Y., Mechanisms of adenosine-mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin Proc* **1995**, 70, (3), 274-91.
179. Dobson, J. G., Jr., Protein kinase regulation of cardiac phosphorylase activity and contractility. *Am J Physiol* **1978**, 234, (5), H638-45.
180. Parratt, J. R.; Kane, K. A., KATP channels in ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res* **1994**, 28, (6), 783-7.
181. Tsuchida, A.; Liu, G. S.; Wilborn, W. H.; Downey, J. M., Pretreatment with the adenosine A1 selective agonist, 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine (CCPA), causes a sustained limitation of infarct size in rabbits. *Cardiovasc Res* **1993**, 27, (4), 652-6.
182. Yao, Z.; Gross, G. J., Glibenclamide antagonizes adenosine A1 receptor-mediated cardioprotection in stunned canine myocardium. *Circulation* **1993**, 88, (1), 235-44.
183. Lasley, R. D.; Noble, M. A.; Konyon, P. J.; Mentzer, R. M., Jr., Different effects of an adenosine A1 analogue and ischemic preconditioning in isolated rabbit hearts. *Ann Thorac Surg* **1995**, 60, (6), 1698-703.
184. George, E. E.; Romano, F. D.; Dobson, J. G., Jr., Adenosine and acetylcholine reduce isoproterenol-induced protein phosphorylation of rat myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **1991**, 23, (6), 749-64.
185. Wakeno, M.; Minamino, T.; Seguchi, O.; Okazaki, H.; Tsukamoto, O.; Okada, K.; Hirata, A.; Fujita, M.; Asanuma, H.; Kim, J.; Komamura, K.; Takashima, S.; Mochizuki, N.; Kitakaze, M., Long-term stimulation of adenosine A2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats. *Circulation* **2006**, 114, (18), 1923-32.
186. Xi, J.; McIntosh, R.; Shen, X.; Lee, S.; Chanoi, G.; Criswell, H.; Zvara, D.; Xu, Z., Adenosine A2A and A2B receptors work in concert to induce a strong protection against reperfusion injury in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* **2009**, 47, (5), 684-90.
187. Norton, G. R.; Woodiwiss, A. J.; McGinn, R. J.; Lorbar, M.; Chung, E. S.; Honeyman, T. W.; Fenton, R. A.; Dobson, J. G., Jr.; Meyer, T. E., Adenosine A1 receptor-mediated antiadrenergic effects are modulated by A2a receptor activation in rat heart. *Am J Physiol* **1999**, 276, (2 Pt 2), H341-9.
188. Boknik, P.; Neumann, J.; Schmitz, W.; Scholz, H.; Wenzlaff, H., Characterization of biochemical effects of CGS 21680C, an A2-adenosine receptor agonist, in the mammalian ventricle. *J Cardiovasc Pharmacol* **1997**, 30, (6), 750-8.
189. Feoktistov, I.; Murray, J. J.; Biaggioni, I., Positive modulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels by adenosine A2b receptors, prostacyclin, and prostaglandin E1 via a cholera toxin-sensitive mechanism in human erythroleukemia cells. *Mol Pharmacol* **1994**, 45, (6), 1160-7.

190. Mogul, D. J.; Adams, M. E.; Fox, A. P., Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca<sup>2+</sup> current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron* **1993**, 10, (2), 327-34.
191. Mateo, J.; Castro, E.; Zwiller, J.; Aunis, D.; Miras-Portugal, M. T., 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine inhibits Ca<sup>2+</sup> influx and activates a protein phosphatase in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* **1995**, 64, (1), 77-84.
192. Furukawa, S.; Satoh, K.; Taira, N., Opening of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels responsible for adenosine A2 receptor-mediated vasodepression does not involve a pertussis toxin-sensitive G protein. *Eur J Pharmacol* **1993**, 236, (2), 255-62.
193. Conti, A.; Monopoli, A.; Gamba, M.; Borea, P. A.; Ongini, E., Effects of selective A1 and A2 adenosine receptor agonists on cardiovascular tissues. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1993**, 348, (1), 108-12.
194. Rubino, A.; Burnstock, G., Changes in sympathetic neurotransmission and adrenergic control of cardiac contractility during 1,3-dipropyl-8-sulphophenylxanthine-induced hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* **1995**, 275, (1), 422-8.
195. Salvatore, C. A.; Jacobson, M. A.; Taylor, H. E.; Linden, J.; Johnson, R. G., Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, (21), 10365-9.
196. Zhou, Q. Y.; Li, C.; Olah, M. E.; Johnson, R. A.; Stiles, G. L.; Civelli, O., Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, 89, (16), 7432-6.
197. Linden, J., Cloned adenosine A3 receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends Pharmacol Sci* **1994**, 15, (8), 298-306.
198. Maggirwar, S. B.; Dhanraj, D. N.; Somani, S. M.; Ramkumar, V., Adenosine acts as an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, 201, (2), 508-15.
199. Tsien, R. W.; Bean, B. P.; Hess, P.; Lansman, J. B.; Nilius, B.; Nowycky, M. C., Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. *J Mol Cell Cardiol* **1986**, 18, (7), 691-710.
200. Fischmeister, R.; Hartzell, H. C., Mechanism of action of acetylcholine on calcium current in single cells from frog ventricle. *J Physiol* **1986**, 376, 183-202.
201. Fischmeister, R.; Hartzell, H. C., Cyclic guanosine 3',5'-monophosphate regulates the calcium current in single cells from frog ventricle. *J Physiol* **1987**, 387, 453-72.
202. Li, H. T.; Long, C. S.; Gray, M. O.; Rokosh, D. G.; Honbo, N. Y.; Karliner, J. S., Cross talk between angiotensin AT1 and alpha 1-adrenergic receptors: angiotensin II downregulates alpha 1a-adrenergic receptor subtype mRNA and density in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res* **1997**, 81, (3), 396-403.
203. Lipsius, S. L.; Huser, J.; Blatter, L. A., Intracellular Ca<sup>2+</sup> release sparks atrial pacemaker activity. *News Physiol Sci* **2001**, 16, 101-6.
204. Vinogradova, T. M.; Lakatta, E. G., Regulation of basal and reserve cardiac pacemaker function by interactions of cAMP-mediated PKA-dependent Ca<sup>2+</sup> cycling with surface membrane channels. *J Mol Cell Cardiol* **2009**, 47, (4), 456-74.
205. Maltsev, V. A.; Lakatta, E. G., Normal heart rhythm is initiated and regulated by an intracellular calcium clock within pacemaker cells. *Heart Lung Circ* **2007**, 16, (5), 335-48.
206. Mary-Rabine, L.; Albert, A.; Pham, T. D.; Hordof, A.; Fenoglio, J. J., Jr.; Malm, J. R.; Rosen, M. R., The relationship of human atrial cellular electrophysiology to clinical function and ultrastructure. *Circ Res* **1983**, 52, (2), 188-99.
207. January, C. T.; Riddle, J. M., Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca<sup>2+</sup> current. *Circ Res* **1989**, 64, (5), 977-90.

208. Luo, C. H.; Rudy, Y., A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. II. Afterdepolarizations, triggered activity, and potentiation. *Circ Res* **1994**, 74, (6), 1097-113.
209. Sipido, K. R.; Callewaert, G.; Carmeliet, E., Inhibition and rapid recovery of Ca<sup>2+</sup> current during Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* **1995**, 76, (1), 102-9.
210. Satoh, H.; Blatter, L. A.; Bers, D. M., Effects of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, SR Ca<sup>2+</sup> load, and rest on Ca<sup>2+</sup> spark frequency in ventricular myocytes. *Am J Physiol* **1997**, 272, (2 Pt 2), H657-68.
211. Belardinelli, L.; Isenberg, G., Actions of adenosine and isoproterenol on isolated mammalian ventricular myocytes. *Circ Res* **1983**, 53, (3), 287-97.
212. Priori, S. G.; Napolitano, C.; Tiso, N.; Memmi, M.; Vignati, G.; Bloise, R.; Sorrentino, V.; Danieli, G. A., Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* **2001**, 103, (2), 196-200.
213. Picht, E.; DeSantiago, J.; Blatter, L. A.; Bers, D. M., Cardiac alternans do not rely on diastolic sarcoplasmic reticulum calcium content fluctuations. *Circ Res* **2006**, 99, (7), 740-8.
214. Diaz, M. E.; O'Neill, S. C.; Eisner, D. A., Sarcoplasmic reticulum calcium content fluctuation is the key to cardiac alternans. *Circ Res* **2004**, 94, (5), 650-6.
215. Jiang, D.; Xiao, B.; Yang, D.; Wang, R.; Choi, P.; Zhang, L.; Cheng, H.; Chen, S. R., RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca<sup>2+</sup> release (SOICR). *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, (35), 13062-7.
216. Dipla, K.; Mattiello, J. A.; Margulies, K. B.; Jeevanandam, V.; Houser, S. R., The sarcoplasmic reticulum and the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger both contribute to the Ca<sup>2+</sup> transient of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* **1999**, 84, (4), 435-44.
217. Reiken, S.; Wehrens, X. H.; Vest, J. A.; Barbone, A.; Klotz, S.; Mancini, D.; Burkhoff, D.; Marks, A. R., Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation* **2003**, 107, (19), 2459-66.
218. Shiferaw, Y.; Karma, A., Turing instability mediated by voltage and calcium diffusion in paced cardiac cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, (15), 5670-5.
219. Pruvot, E. J.; Katra, R. P.; Rosenbaum, D. S.; Laurita, K. R., Role of calcium cycling versus restitution in the mechanism of repolarization alternans. *Circ Res* **2004**, 94, (8), 1083-90.
220. Aistrup, G. L.; Kelly, J. E.; Kapur, S.; Kowalczyk, M.; Sysman-Wolpin, I.; Kadish, A. H.; Wasserstrom, J. A., Pacing-induced heterogeneities in intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling, cardiac alternans, and ventricular arrhythmias in intact rat heart. *Circ Res* **2006**, 99, (7), e65-73.
221. Qu, Z.; Garfinkel, A.; Chen, P. S.; Weiss, J. N., Mechanisms of discordant alternans and induction of reentry in simulated cardiac tissue. *Circulation* **2000**, 102, (14), 1664-70.
222. Kirchhof, P.; Breithardt, G., New concepts for old drugs to maintain sinus rhythm in patients with atrial fibrillation. *Heart Rhythm* **2007**, 4, (6), 790-3.
223. Wazni, O. M.; Marrouche, N. F.; Martin, D. O.; Verma, A.; Bhargava, M.; Saliba, W.; Bash, D.; Schweikert, R.; Brachmann, J.; Gunther, J.; Gutleben, K.; Pisano, E.; Potenza, D.; Fanelli, R.; Raviele, A.; Themistoclakis, S.; Rossillo, A.; Bonso, A.; Natale, A., Radiofrequency ablation vs antiarrhythmic drugs as first-line treatment of symptomatic atrial fibrillation: a randomized trial. *Jama* **2005**, 293, (21), 2634-40.
224. Cinca, J.; Sassine, A.; Deceuninck, P.; Roca, J.; Gagne, P.; Morena, H.; Puech, P., The dependence of T wave alternans on diastolic resting period duration. *Eur J Cardiol* **1978**, 7, (4), 299-309.

225. Goldhaber, J. I.; Xie, L. H.; Duong, T.; Motter, C.; Khuu, K.; Weiss, J. N., Action potential duration restitution and alternans in rabbit ventricular myocytes: the key role of intracellular calcium cycling. *Circ Res* **2005**, 96, (4), 459-66.
226. Vest, J. A.; Wehrens, X. H.; Reiken, S. R.; Lehnart, S. E.; Dobrev, D.; Chandra, P.; Danilo, P.; Ravens, U.; Rosen, M. R.; Marks, A. R., Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation. *Circulation* **2005**, 111, (16), 2025-32.
227. Miyasaka, Y.; Barnes, M. E.; Petersen, R. C.; Cha, S. S.; Bailey, K. R.; Gersh, B. J.; Casacang-Verzosa, G.; Abhayaratna, W. P.; Seward, J. B.; Iwasaka, T.; Tsang, T. S., Risk of dementia in stroke-free patients diagnosed with atrial fibrillation: data from a community-based cohort. *Eur Heart J* **2007**, 28, (16), 1962-7.
228. Fuster, V.; Ryden, L. E.; Cannom, D. S.; Crijns, H. J.; Curtis, A. B.; Ellenbogen, K. A.; Halperin, J. L.; Le Heuzey, J. Y.; Neal Kay, G.; Lowe, J. E.; Bertil Olsson, S.; Prystowsky, E. N.; Tamargo, J. L.; Wann, S., [Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation. Executive summary]. *Rev Esp Cardiol* **2006**, 59, (12), 1329.
229. Kalifa, J.; Tanaka, K.; Zaitsev, A. V.; Warren, M.; Vaidyanathan, R.; Auerbach, D.; Pandit, S.; Vikstrom, K. L.; Ploutz-Snyder, R.; Talkachou, A.; Atienza, F.; Guiraudon, G.; Jalife, J.; Berenfeld, O., Mechanisms of wave fractionation at boundaries of high-frequency excitation in the posterior left atrium of the isolated sheep heart during atrial fibrillation. *Circulation* **2006**, 113, (5), 626-33.
230. Konings, K. T.; Smeets, J. L.; Penn, O. C.; Wellens, H. J.; Allessie, M. A., Configuration of unipolar atrial electrograms during electrically induced atrial fibrillation in humans. *Circulation* **1997**, 95, (5), 1231-41.
231. Nattel, S.; Maguy, A.; Le Bouter, S.; Yeh, Y. H., Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* **2007**, 87, (2), 425-56.
232. Canals, M.; Marcellino, D.; Fanelli, F.; Ciruela, F.; de Benedetti, P.; Goldberg, S. R.; Neve, K.; Fuxe, K.; Agnati, L. F.; Woods, A. S.; Ferre, S.; Lluís, C.; Bouvier, M.; Franco, R., Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem* **2003**, 278, (47), 46741-9.
233. Herrera, C.; Casado, V.; Ciruela, F.; Schofield, P.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R., Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol* **2001**, 59, (1), 127-34.
234. Pogwizd, S. M.; Schlotthauer, K.; Li, L.; Yuan, W.; Bers, D. M., Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* **2001**, 88, (11), 1159-67.
235. Lehnart, S. E.; Wehrens, X. H.; Laitinen, P. J.; Reiken, S. R.; Deng, S. X.; Cheng, Z.; Landry, D. W.; Kontula, K.; Swan, H.; Marks, A. R., Sudden death in familial polymorphic ventricular tachycardia associated with calcium release channel (ryanodine receptor) leak. *Circulation* **2004**, 109, (25), 3208-14.
236. Schlotthauer, K.; Bers, D. M., Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release causes myocyte depolarization. Underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. *Circ Res* **2000**, 87, (9), 774-80.
237. Burashnikov, A.; Antzelevitch, C., Reinduction of atrial fibrillation immediately after termination of the arrhythmia is mediated by late phase 3 early afterdepolarization-induced triggered activity. *Circulation* **2003**, 107, (18), 2355-60.

238. Meng, X.; Xiao, B.; Cai, S.; Huang, X.; Li, F.; Bolstad, J.; Trujillo, R.; Airey, J.; Chen, S. R.; Wagenknecht, T.; Liu, Z., Three-dimensional localization of serine 2808, a phosphorylation site in cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* **2007**, 282, (35), 25929-39.
239. Marx, S. O.; Reiken, S.; Hisamatsu, Y.; Jayaraman, T.; Burkhoff, D.; Rosemlit, N.; Marks, A. R., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* **2000**, 101, (4), 365-76.
240. Xiao, B.; Sutherland, C.; Walsh, M. P.; Chen, S. R., Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca<sup>2+</sup>-release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res* **2004**, 94, (4), 487-95.
241. Boldt, A.; Scholl, A.; Garbade, J.; Resetar, M. E.; Mohr, F. W.; Gummert, J. F.; Dhein, S., ACE-inhibitor treatment attenuates atrial structural remodeling in patients with lone chronic atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* **2006**, 101, (3), 261-7.
242. Goette, A.; Arndt, M.; Rocken, C.; Spiess, A.; Staack, T.; Geller, J. C.; Huth, C.; Ansoerge, S.; Klein, H. U.; Lendeckel, U., Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans. *Circulation* **2000**, 101, (23), 2678-81.
243. Yamada, J.; Ohkusa, T.; Nao, T.; Ueyama, T.; Yano, M.; Kobayashi, S.; Hamano, K.; Esato, K.; Matsuzaki, M., Up-regulation of inositol 1,4,5 trisphosphate receptor expression in atrial tissue in patients with chronic atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* **2001**, 37, (4), 1111-9.
244. Canals, M.; Burgueno, J.; Marcellino, D.; Cabello, N.; Canela, E. I.; Mallol, J.; Agnati, L.; Ferre, S.; Bouvier, M.; Fuxe, K.; Ciruela, F.; Lluís, C.; Franco, R., Homodimerization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Neurochem* **2004**, 88, (3), 726-34.
245. Lendeckel, U.; Müller, C.; Rocken, C.; Laube, B.; Tager, M.; Huth, C.; Klein, H. U.; Goette, A., Expression of opioid receptor subtypes and their ligands in fibrillating human atria. *Pacing Clin Electrophysiol* **2005**, 28 Suppl 1, S275-9.
246. Lezoualc'h, F.; Stepkowski, K.; Sartiani, L.; Mugelli, A.; Fischmeister, R.; Bril, A., Quantitative mRNA analysis of serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor isoforms, calcium handling proteins and ion channels in human atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, 357, (1), 218-24.
247. Gassanov, N.; Brandt, M. C.; Michels, G.; Lindner, M.; Er, F.; Hoppe, U. C., Angiotensin II-induced changes of calcium sparks and ionic currents in human atrial myocytes: potential role for early remodeling in atrial fibrillation. *Cell Calcium* **2006**, 39, (2), 175-86.
248. Pau, D.; Workman, A. J.; Kane, K. A.; Rankin, A. C., Electrophysiological and arrhythmogenic effects of 5-hydroxytryptamine on human atrial cells are reduced in atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* **2007**, 42, (1), 54-62.
249. Ginsburg, K. S.; Bers, D. M., Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca<sup>2+</sup> load and Ca<sup>2+</sup> current trigger. *J Physiol* **2004**, 556, (Pt 2), 463-80.
250. Hove-Madsen, L.; Mery, P. F.; Jurevicius, J.; Skeberdis, A. V.; Fischmeister, R., Regulation of myocardial calcium channels by cyclic AMP metabolism. *Basic Res Cardiol* **1996**, 91 Suppl 2, 1-8.
251. Li, Y.; Kranias, E. G.; Mignery, G. A.; Bers, D. M., Protein kinase A phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* **2002**, 90, (3), 309-16.
252. Cannell, M. B.; Cheng, H.; Lederer, W. J., The control of calcium release in heart muscle. *Science* **1995**, 268, (5213), 1045-9.

253. Cheng, H.; Lederer, W. J.; Cannell, M. B., Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* **1993**, 262, (5134), 740-4.
254. Healey, J. S.; Baranchuk, A.; Crystal, E.; Morillo, C. A.; Garfinkle, M.; Yusuf, S.; Connolly, S. J., Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* **2005**, 45, (11), 1832-9.
255. Navarro-Lopez, F.; Cinca, J.; Sanz, G.; Periz, A.; Magrina, J.; Betriu, A., Isolated T wave alternans. *Am Heart J* **1978**, 95, (3), 369-74.
256. Pastore, J. M.; Girouard, S. D.; Laurita, K. R.; Akar, F. G.; Rosenbaum, D. S., Mechanism linking T-wave alternans to the genesis of cardiac fibrillation. *Circulation* **1999**, 99, (10), 1385-94.
257. Gong, Y.; Xie, F.; Stein, K. M.; Garfinkel, A.; Culianu, C. A.; Lerman, B. B.; Christini, D. J., Mechanism underlying initiation of paroxysmal atrial flutter/atrial fibrillation by ectopic foci: a simulation study. *Circulation* **2007**, 115, (16), 2094-102.
258. Rosenbaum, D. S.; Jackson, L. E.; Smith, J. M.; Garan, H.; Ruskin, J. N.; Cohen, R. J., Electrical alternans and vulnerability to ventricular arrhythmias. *N Engl J Med* **1994**, 330, (4), 235-41.
259. Shusterman, V.; Goldberg, A.; London, B., Upsurge in T-wave alternans and nonalternating repolarization instability precedes spontaneous initiation of ventricular tachyarrhythmias in humans. *Circulation* **2006**, 113, (25), 2880-7.
260. Navarro-Lopez, F.; Cinca, J.; Sanz, G.; Magrina, J.; Betriu, A., Isolated T wave alternans elicited by hypocalcemia in dogs. *J Electrocardiol* **1978**, 11, (2), 103-8.
261. Mackenzie, L.; Roderick, H. L.; Berridge, M. J.; Conway, S. J.; Bootman, M. D., The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction. *J Cell Sci* **2004**, 117, (Pt 26), 6327-37.
262. Huser, J.; Wang, Y. G.; Sheehan, K. A.; Cifuentes, F.; Lipsius, S. L.; Blatter, L. A., Functional coupling between glycolysis and excitation-contraction coupling underlies alternans in cat heart cells. *J Physiol* **2000**, 524 Pt 3, 795-806.
263. Kockskamper, J.; Zima, A. V.; Blatter, L. A., Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release by glycolysis in cat atrial myocytes. *J Physiol* **2005**, 564, (Pt 3), 697-714.
264. Goldreyer, B. N.; Kastor, J. A.; Kershbaum, K. L., The hemodynamic effects of induced supraventricular tachycardia in man. *Circulation* **1976**, 54, (5), 783-9.
265. Hove-Madsen, L.; Prat-Vidal, C.; Llach, A.; Ciruela, F.; Casado, V.; Lluís, C.; Bayes-Genis, A.; Cinca, J.; Franco, R., R. Reply: Does the adenosine A<sub>2A</sub> receptor stimulate the ryanodine receptor? *Cardiovascular Research* **2007**, 73, (1), 249-250.
266. Van Wagoner, D. R.; Pond, A. L.; McCarthy, P. M.; Trimmer, J. S.; Nerbonne, J. M., Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* **1997**, 80, (6), 772-81.
267. Narayan, S. M.; Bode, F.; Karasik, P. L.; Franz, M. R., Alternans of atrial action potentials during atrial flutter as a precursor to atrial fibrillation. *Circulation* **2002**, 106, (15), 1968-73.
268. Hove-Madsen, L.; Bers, D. M., Indo-1 binding to protein in permeabilized ventricular myocytes alters its spectral and Ca binding properties. *Biophys J* **1992**, 63, (1), 89-97.
269. Allessie, M.; Ausma, J.; Schotten, U., Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* **2002**, 54, (2), 230-46.
270. Vandecasteele, G.; Verde, I.; Rucker-Martin, C.; Donzeau-Gouge, P.; Fischmeister, R., Cyclic GMP regulation of the L-type Ca(2+) channel current in human atrial myocytes. *J Physiol* **2001**, 533, (Pt 2), 329-40.

271. Hartzell, H.; Mery, P.; Fischmeister, R.; Szabo, G., Sympathetic regulation of cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation. *Nature* **1991**, 351, 573-576.
272. Sinno, H.; Derakhchan, K.; Libersan, D.; Merhi, Y.; Leung, T.; Nattel, S., Atrial ischemia promotes atrial fibrillation in dogs. *Circulation* **2003**, 107, 1930-193.
273. Bitigen, A.; Bulut, M.; Tanalp, A.; Kirma, C.; Barutcu, I.; Pala, S.; Erkol, A.; Boztosun, B., Left atrial appendage functions in patients with severe rheumatic mitral regurgitation. *The international journal of cardiovascular imaging* **2007**, 23, 693-700.
274. Bertolet, B. D.; Hill, J. A.; Kerensky, R. A.; Belardinelli, L., Myocardial infarction related atrial fibrillation: role of endogenous adenosine. *Heart* **1997**, 78, (1), 88-90.
275. Hussain, M.; Orchard, C., Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content, L-type Ca<sup>2+</sup> current and the Ca<sup>2+</sup> transient in rat myocytes during beta-adrenergic stimulation. *The Journal of physiology* **1997**, 505 ( Pt 2):, 385-402.
276. Xiao, B.; Tian, X.; xie, W.; Jones, P.; cai, S.; Wang, X.; Jiang, D.; Kong, H.; Zhang, L.; Chen, K.; Walsh, M.; Cheng, H.; Chen, S., Functional consequence of protein kinase A-dependent phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor: sensitization of store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release. *The Journal of biological chemistry* **2007**, 282, 30256-30264.
277. DiMarco, J. P.; Sellers, T. D.; Berne, R. M.; West, G. A.; Belardinelli, L., Adenosine: electrophysiologic effects and therapeutic use for terminating paroxysmal supraventricular tachycardia. *Circulation* **1983**, 68, (6), 1254-63.
278. DiMarco, J. P.; Lerman, B. B., Role of invasive electrophysiologic studies in the evaluation and treatment of supraventricular tachycardia. *Pacing Clin Electrophysiol* **1985**, 8, (1), 132-9.
279. Neely, C. F.; DiPierro, F. V.; Kong, M.; Greelish, J. P.; Gardner, T. J., A1 adenosine receptor antagonists block ischemia-reperfusion injury of the heart. *Circulation* **1996**, 94, (9 Suppl), II376-80.
280. Koos, B. J.; Chau, A., Fetal cardiovascular and breathing responses to an adenosine A<sub>2a</sub> receptor agonist in sheep. *Am J Physiol* **1998**, 274, (1 Pt 2), R152-9.
281. Monopoli, A.; Casati, C.; Lozza, G.; Forlani, A.; Ongini, E., Cardiovascular pharmacology of the A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonist, SCH 58261, in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **1998**, 285, (1), 9-15.