



# ***Cambios Electrofisiológicos en la Isquemia Aguda y la Reperusión en un Modelo Bidimensional Cardíaco***

autor

**Carlos De Diego Rus**

Una tesis

presentada en la [\*Universidad Autónoma de Madrid \(Facultad de Medicina\)\*](#)

en cumplimiento de los requisitos para la obtención del grado de Doctorado

en Medicina

Madrid, España, 2013

© Carlos De Diego Rus





## RESUMEN DE CONTENIDOS

<b>Declaración del Autor .....</b>	<b>5</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>7</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>10</b>
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>11</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>12</b>
<b>Lista de Películas .....</b>	<b>16</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>18</b>
• <b>1. La epidemiología de la muerte súbita de origen cardiovascular. ....</b>	<b>18</b>
1.1 Su relevancia clínica .....	18
1.2 La terapia de prevención de la muerte súbita .....	25
• <b>2. Los efectos miocárdicos de la isquemia Aguda.....</b>	<b>28</b>
2.1 Los cambios metabólicos.....	30
2.2 Las alteraciones en las propiedades electrofisiológicas.....	34
- 2.2.A Las propiedades electrofisiológicas del miocardio normal .....	34
- 2.2.B Las alteraciones en las propiedades electrofisiológicas durante la isquemia.....	43
2.3 Los mecanismos de las arritmias durante la isquemia aguda.....	51
- 2.3.A Los mecanismos de inicio de arritmias.....	51
- 2.3.B Los mecanismos generales de la fibrilacion ventricular .....	61
- 2.3.C La fibrilación ventricular durante la isquemia regional.....	72



<b>II. Hipótesis y Objetivos</b> .....	78
<b>III. Métodos</b> .....	81
• A. La preparación de los cultivos en monocapa de miocitos de ventrículo de rata neonata .....	81
• B. El método de mapeo óptico y el análisis de la señal.....	82
• C. El método de inducción de isquemia regional.....	89
• D. La técnica de tinción Inmunohistoquímica de las uniones gap .....	94
• E. El análisis estadístico .....	95
<b>IV. Resultados</b> .....	96
• A. La validación del método de isquemia regional en nuestro laboratorio. .	96
• B. Los cambios electrofisiológicos durante la isquemia y la reperfusión regional.....	98
• C. Los experimentos adicionales ("preconditioning").....	103
• D. El estudio de la conexina-43 durante la isquemia y la reperfusión regional.....	104
• E. Las arritmias durante la isquemia en el modelo .....	108
• F. Las arritmias durante la reperfusión. ....	114



<b>V. Discusión</b> .....	118
• A. El curso temporal de los cambios electrofisiológicos .....	118
• B. Los latidos prematuros espontáneos.....	119
• C. Las arritmias durante la isquemia regional.....	121
• D. Las arritmias durante la fase de reperfusión y los efectos en la conexina-43.....	123
• E. Las Implicaciones clínico-experimentales .....	125
<b>VI. Limitaciones</b> .....	126
<b>VII. Conclusiones</b> .....	127
<b>Bibliografía</b> .....	129





## DECLARACION DEL AUTOR

Yo, Carlos De Diego, declaro ser el único autor de esta tesis desarrollada bajo la supervisión del Dr. Miguel Valderrábano y del Dr. Rafael Peinado. Esta es la copia final de la tesis, revisada y con la aceptación de los directores de tesis previamente citados

---

CARLOS DE DIEGO RUS

---

*Lugar y Fecha*

## DECLARACION DE DIRECTORES DE TESIS

Con la presente firma, certifico que he leído y recomiendo esta tesis a la Universidad Autónoma de Madrid para sea valorada su aceptación, con el título de “Cambios electrofisiológicos agudos en la isquemia y reperfusión regional en un modelo bidimensional cardiaco”, que es entregada por Carlos De Diego para la obtención del grado de Doctorado en Medicina.

*Miguel Valderrábano*

---

Co-Director de Tesis, MIGUEL VALDERRABANO

*Profesor de Medicina*

*Universidad de California Los Ángeles (durante la realización de la fase experimental)*

*Universidad Baylor College of Medicine (presente).*

Houston, 08- 03-2013

---

*Lugar y Fecha*



Con la presente firma, certifico que he leído y recomiendo esta tesis a la Universidad Autónoma de Madrid para sea valorada su aceptación, con el título de “Cambios electrofisiológicos agudos en la isquemia y reperfusión regional en un modelo bidimensional cardiaco”, que es entregada por Carlos De Diego para la obtención del grado de Doctorado en Medicina.

---

*Co-Director de Tesis, RAFAEL PEINADO*

*Profesor de Medicina*

*Universidad Autónoma de Madrid*

Madrid, 08- 03-2013

---

*Lugar y Fecha*

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



## **RESUMEN**

### **INTRODUCCION:**

El estudio de los cambios regionales a nivel electrofisiológico que suceden durante la isquemia aguda y la reperfusión ha representado un gran reto en los modelos de corazón intacto. Esto es debido principalmente a la complejidad del miocardio cardiaco en tres dimensiones y la distribución geométrica vascular. Nuestro objetivo fue caracterizar los cambios electrofisiológicos regionales y la inducción de arritmias en un modelo bidimensional durante la isquemia aguda y la reperfusión.

### **METODOS:**

Se cultivaron miocitos de rata neonata en una superficie de plástico de 22 mm x 22 mm, para conseguir un modelo bidimensional cardiaco (cultivo en monocapa) que carece de las heterogeneidades macroscópicas presentes en el miocardio intacto (cambios de orientación de fibras, vasos, etc.). Se realizó la técnica de mapeo óptico con la tinción de los miocitos con colorantes sensibles a luz para detectar el voltaje de membrana (Rh-237) y el calcio intracelular citosólico (Rhod-2). Para producir isquemia regional, se cubrió la porción central de la preparación con un cristal circular, que evita la entrada de oxígeno y nutrientes en dicha zona central. Según trabajos previos, esta técnica produce tres zonas: la zona central o isquémica, la zona circundante o no isquémica y una zona de 1-2 mm entre ambas llamada zona peri-isquémica. Para mimetizar la reperfusión, se retiraba el cristal de dicha zona, permitiendo la llegada de



oxígeno y nutrientes. Además, los cultivos en monocapa fueron teñidas en distintas etapas (basal, isquemia y reperfusión) con anticuerpos fluorescentes específicos para la conexina 43 total y su forma no fosforilada (no funcional).

#### RESULTADOS:

Durante la fase isquémica, se observaron los siguientes cambios electrofisiológicos: el potencial de acción se acorta, la duración de la salida de calcio intracelular al citosol se prolonga, y la velocidad de conducción local disminuye progresivamente (VC), hasta alcanzar la pérdida total de excitabilidad a los  $10.6 \pm 3.6$  min. El enlentecimiento en la VC se correlacionó con un aumento en la forma no fosforilada de la conexina 43. En la fase isquémica, se induce reentrada espontáneamente en 5/11 preparaciones, iniciada por extrasístoles que se originaban en la zona peri-isquémica o por bloqueo unidireccional a nivel de la zona isquémica. Durante la fase de reperfusión, la excitabilidad se recupera rápidamente ( $1.0 \pm 0.8$  min), mientras que la VC se mantiene disminuida hasta los  $9.0 \pm 3.0$  min, facilitando el inicio de reentrada en la zona reperfundida. Coincidiendo con la normalización en la VC y la desaparición de las arritmias, se recupera la fosforilación de la conexina 43.

#### CONCLUSIONES:

El modelo de isquemia y reperfusión regional en los cultivos en monocapa reproduce los cambios electrofisiológicos y la inducción de arritmias de forma similar a los hallazgos observados en el corazón intacto. Este modelo permitirá estudiar, en el futuro más en profundidad, nuevos mecanismos de las arritmias en la isquemia y la



reperfusión en un modelo sin heterogeneidades macroscópicas significativas. Además, nuestros resultados apoyan que durante la fase precoz de la reperfusión, una lenta recuperación en la fosforilación de la conexina 43 da lugar a un enlentecimiento en la VC que persiste creando un substrato arritmogénico.



## **Agradecimientos**

Esta tesis es el fruto del trabajo de más de 6 años, miles de conversaciones, horas de análisis, aprendizaje, paciencia, apoyo, soledad en un laboratorio, motivación y persistencia. A todos mis compañeros y amigos les concedo mi más sincero agradecimiento. En especial, gracias a:

Al Dr. Peinado, por su colaboración y apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Valderrábano, que me formó en el mundo científico empezando de cero, y realizó un gran esfuerzo y dedicó su tiempo.

Al Dr. Farré, que me enseñó que el sabio es aquél que no permite que el árbol le oculte el bosque y que son más grandes los tesoros que las miserias.

Al Dr. Cabrera porque me animó a mirar más allá.

Al Dr. Weiss, siempre disponible, para desarrollar el proyecto y cumpliendo sus promesas.

Al Dr. Pai, mi primer compañero en la UCLA, tuvo un momento de inspiración con esta idea que no tuvo tiempo de desarrollar y con persistencia pude hacerlo realidad.

A mi familia y seres queridos.



## **Dedicatoria**

*“Deseo dedicar esta Tesis a todos los que me apoyaron, mi familia y amigos, porque estuvieron junto a mi cuando más lo necesite... Sin embargo, de corazón, deseo dedicar mi Tesis a todos aquellos que no creyeron en mí, porque fueron ellos mi mayor fuente de inspiración y motivación.... A todos eternamente Gracias “*



## Lista de Figuras

Figura 1. Las causas de muerte súbita cardiaca por arritmias.

Figura 2. La muerte súbita de origen cardiovascular.

Figura 3. La epidemiología de la muerte súbita y de la enfermedad coronaria.

Figura 4. La incidencia de infarto de miocardio en la última década.

Figura 5. Ejemplos de fracasos farmacológicos en la prevención de muerte súbita.

Figura 6. La incidencia relativa y absoluta de muerte súbita cardiaca en pacientes, con o sin cardiopatía isquémica conocida.

Figura 7: Esquema básico de los componentes de la isquemia aguda y la secuencia de los principales cambios producidos.

Figura 8: Los principales cambios metabólicos durante la isquemia aguda.

Figura 9: La secuencia temporal de los cambios metabólicos durante la isquemia aguda.

Figure 10: El potencial de acción de la célula miocárdica.

Figure 11: Esquema de las principales corrientes iónicas en la membrana de la célula cardiaca y los principales factores del ciclo del calcio.

Figura 12. Los tipos de potenciales de acción en el miocardio.

Figura 13. Los tipos de corrientes iónicas según el tipo de célula cardiaca.

Figura 14. Los efectos de la isquemia en los principales canales iónicos.

Figura 15: Gráficos de corriente/tiempo para los principales canales del miocito en condiciones normales y los efectos de la isquemia aguda.





Figura 16. Los cambios electrofisiológicos durante la isquemia.

Figura 17. Los cambios producidos por la isquemia aguda en el potencial de acción.

Figura 18. Esquema explicativo del efecto de la isquemia aguda en la refractariedad miocárdica.

Figura 19. Los tres mecanismos básicos de las arritmias cardíacas

Figura 20. Las fases de la isquemia según la frecuencia de arritmias ventriculares y sus mecanismos fundamentales.

Figura 21. El inicio de extrasístoles ventriculares durante la fase precoz o primeros 15 minutos (IA) y la fase (IB) después de 20 minutos de isquemia.

Figura 22. El mapeo epicárdico del inicio de fibrilación ventricular durante la isquemia.

Figura 23. Los estudios de simulación matemática durante la isquemia aguda.

Figura 24. La correlación temporal del electrocardiograma de superficie (ECG), el potencial de acción (PA) y la onda eléctrica de propagación registrada mediante la técnica de mapeo óptico (ONDA).

Figura 25. Los mecanismos de la rotura de la onda eléctrica.

Figura 26. El inicio de fibrilación ventricular.

Figura 27. Un ejemplo de una fibrilación ventricular transitoria.

Figura 28. Los diferentes patrones fibrilatorios y su curso temporal.

Figura 29. Un modelo experimental de isquemia regional por oclusión coronaria.

Figura 30. Imagen de un modelo de simulación en 3 dimensiones.

Figura 31. La localización intramural de rotores.



Figura 32. Esquema del sistema de mapeo óptico simultáneo de voltaje y calcio intracelular en nuestro laboratorio.

Figura 33. Esquema de las señales detectadas y digitalizadas.

Figura 34. El modelo de isquemia de Pitts y col.: los cambios metabólicos.

Figura 35. El modelo de isquemia de Pitts y col.: los cambios funcionales y la validación del modelo.

Figura 36. El método de isquemia regional adaptado en nuestro laboratorio.

Figura 37. El método con microporos. La ausencia de cambios en las propiedades electrofisiológicas (validación de nuestro modelo).

Figura 38. Los efectos de la isquemia regional en el potencial de acción y el calcio citosólico en cultivos de miocitos de rata: Los patrones de propagación típicamente observados.

Figura 39. Resumen de los cambios electrofisiológicos observados durante el proceso de isquemia y reperfusión regional en nuestro modelo.

Figura 40. La tinción con fluorescencia de la conexina-43 durante la isquemia y reperfusión.

Figura 41. Un ejemplo de reentrada iniciada de forma espontánea a los 6 minutos de isquemia en un cultivo en monocapa.

Figura 42. La iniciación de reentrada por un extrasístole durante la isquemia en cultivos en monocapa.



Figura 43. La iniciación de reentrada por bloqueo de la conducción en la zona isquémica.

Figura 44. Las arritmias durante la reperfusión.



## Lista de Películas

Película 1. La propagación normal en un cultivo en monocapa con la técnica de mapeo óptico de nuestro laboratorio.

Película 2. Un ejemplo de rotor único en nuestro modelo experimental.

Película 3. Una simulación del patrón fibrilatorio con múltiples ondas.

Película 4. Una simulación del patrón fibrilatorio con un rotor madre y conducción fibrilatoria en la zona periférica.

Película 5. La complejidad de un modelo tridimensional durante fibrilación ventricular.

Película 6. La propagación por estimulación durante la fase de isquemia con enlentecimiento de la velocidad de conducción (primeros 3 minutos de isquemia).

Película 7: La propagación por estimulación durante la fase de isquemia con enlentecimiento marcado de la velocidad de conducción (3-6 minutos de isquemia).

Película 8: Circuito de macro-reentrada con el centro inactivo (6-10 min).

Película 9: Un rotor único en la zona borde y alternancia de la señal de calcio en la zona isquémica.

Película 10: Un rotor único en la zona borde y fractura de la onda en la zona isquémica.

Película 11. Un rotor en la zona borde, fractura de la onda en la zona isquémica y con áreas inactivas en la zona isquémica.

Película 12. Un rotor en la zona borde, con centro inactivo de forma completa y con múltiples ondas de macro-reentrada alrededor del centro.



Película 13. El inicio de latidos espontáneos originados en la zona borde que inician reentrada.

Película 14. Las arritmias durante la fase precoz de la reperfusión (1-3 min): un rotor en la zona borde y conducción lenta con fractura de onda en la zona reperfundida.

Película 15. Las arritmias durante la fase tardía de la reperfusión (más de 3 min): un rotor único con conducción 1:1 en la zona reperfundida.

Película 16. La recuperación completa de la propagación (por estimulación) durante la reperfusión (6-10 min).



## **I. INTRODUCCION**

### **I.1. La epidemiología de la muerte súbita de origen cardiovascular.**

#### **I.1.1. Su relevancia clínica.**

La muerte súbita por arritmias ventriculares de origen isquémico puede suceder durante la fase aguda del infarto de miocardio o meses y años después en pacientes con disfunción ventricular izquierda severa con infarto previo.

En las últimas décadas, se ha producido un progreso extraordinario en el área cardiovascular. Ha aumentado, en la Sociedad, la conciencia sobre la relevancia de la cardiopatía isquémica. Lo que ha permitido potenciar la prevención primaria de esta enfermedad. Se ha producido un cambio en el perfil del paciente que acude a urgencias con dolor torácico de tipo isquémico, siendo cada vez más frecuente el infarto de miocardio sin ascenso de ST que el infarto de miocardio con ascenso de ST. Esto se explica por la introducción de nuevos marcadores miocárdicos más sensibles y porque el paciente solicita antes asistencia médica debido a un mayor conocimiento de la enfermedad. En la mayoría de los países de Europa, se dispone de trombolisis y angioplastia primaria para el tratamiento agudo del infarto transmural. Para los pacientes con disfunción ventricular de ventrículo izquierdo severa post-infarto, se han ido desarrollado en las últimas décadas desfibriladores automáticos implantables cada

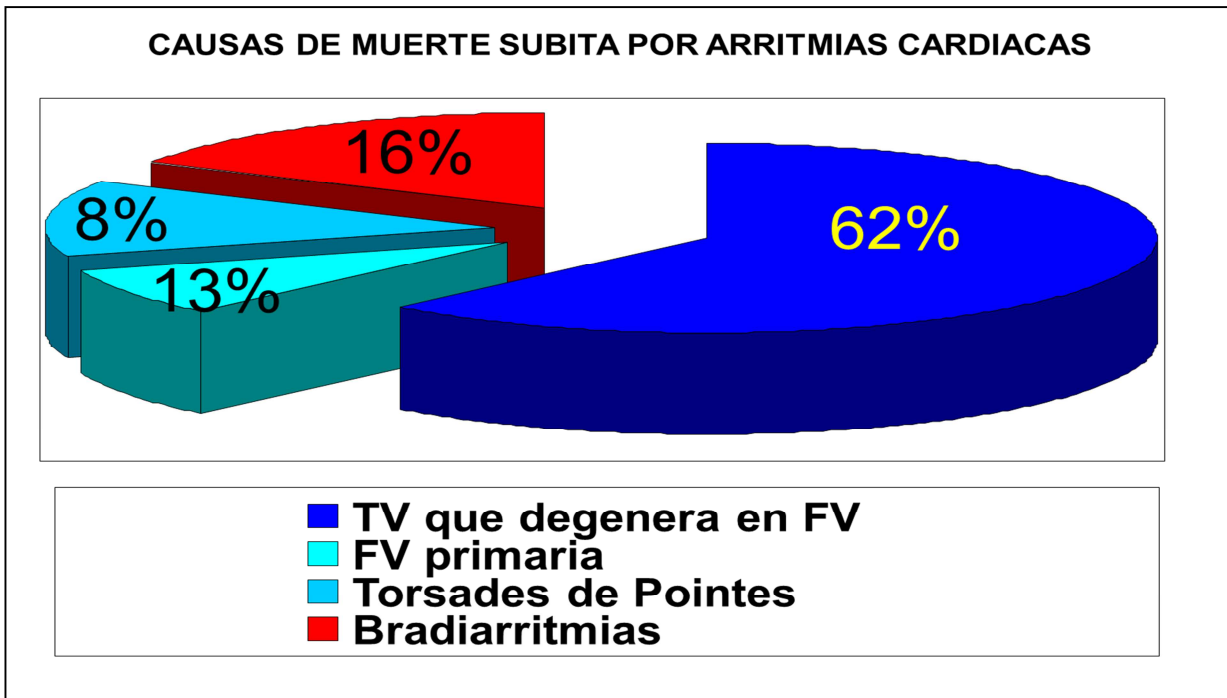


vez más eficaces (por ejemplo, con el uso de onda bifásica). Con todo, y a pesar de los enormes avances, la mortalidad de origen cardiovascular continúa siendo la principal causa de muerte en los países desarrollados. Hasta en un 50% de estas muertes pueden deberse a la forma más dramática de la cardiopatía isquemia: la muerte súbita.<sup>1</sup>

La Organización Mundial de la Salud ha definido como muerte súbita a los fallecimientos no esperados que cumplan uno de estos dos criterios: 1) que son presenciados y que suceden dentro de la primera hora del inicio de los síntomas o 2) que no son presenciados y en ausencia de síntomas y con constancia de que el paciente estaba vivo al menos 24 horas antes.<sup>2</sup> La mayoría de estas muertes se producen por arritmias ventriculares, principalmente fibrilación ventricular (**Figura 1**).<sup>3,4</sup> Se calcula que el 12% de las defunciones que se producen de forma natural son súbitas y, de éstas, el 88% son de origen cardíaco.

La enfermedad coronaria está presente en hasta un 80% de los casos de las autopsias realizadas por muerte súbita (**Figura 2**).<sup>5,6</sup>

En los Estados Unidos y en Europa, la muerte súbita cardíaca es responsable de 300.000-500.000 fallecimientos anuales.<sup>2</sup> Marrugat y col. describieron la epidemiología de muerte súbita cardíaca en España.<sup>1</sup>

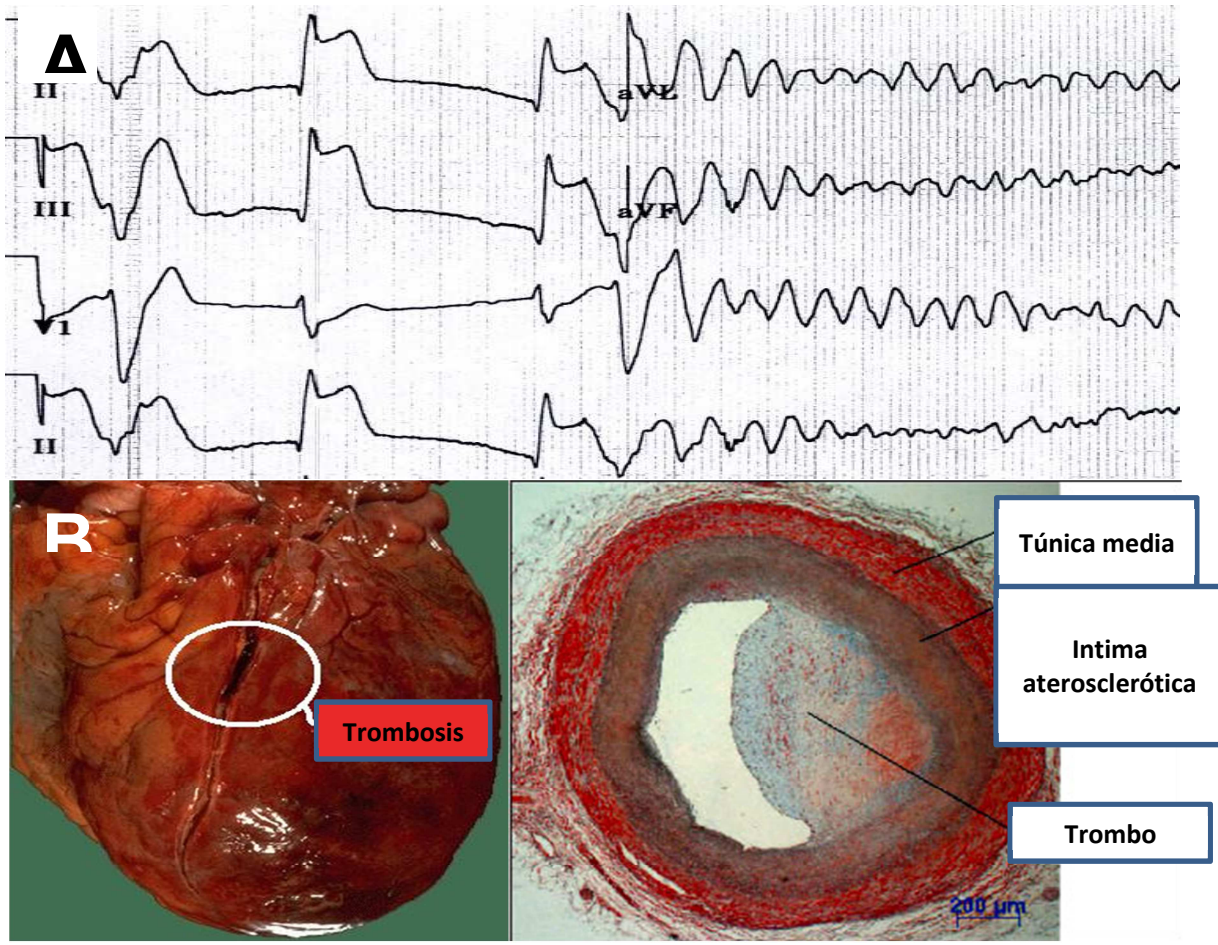


**Figura 1.** Las causas de muerte súbita cardiaca por arritmias. Adaptado de Bayes y col. 1989<sup>3,4</sup>

**TV** Taquicardia ventricular

**FV** Fibrilación ventricular



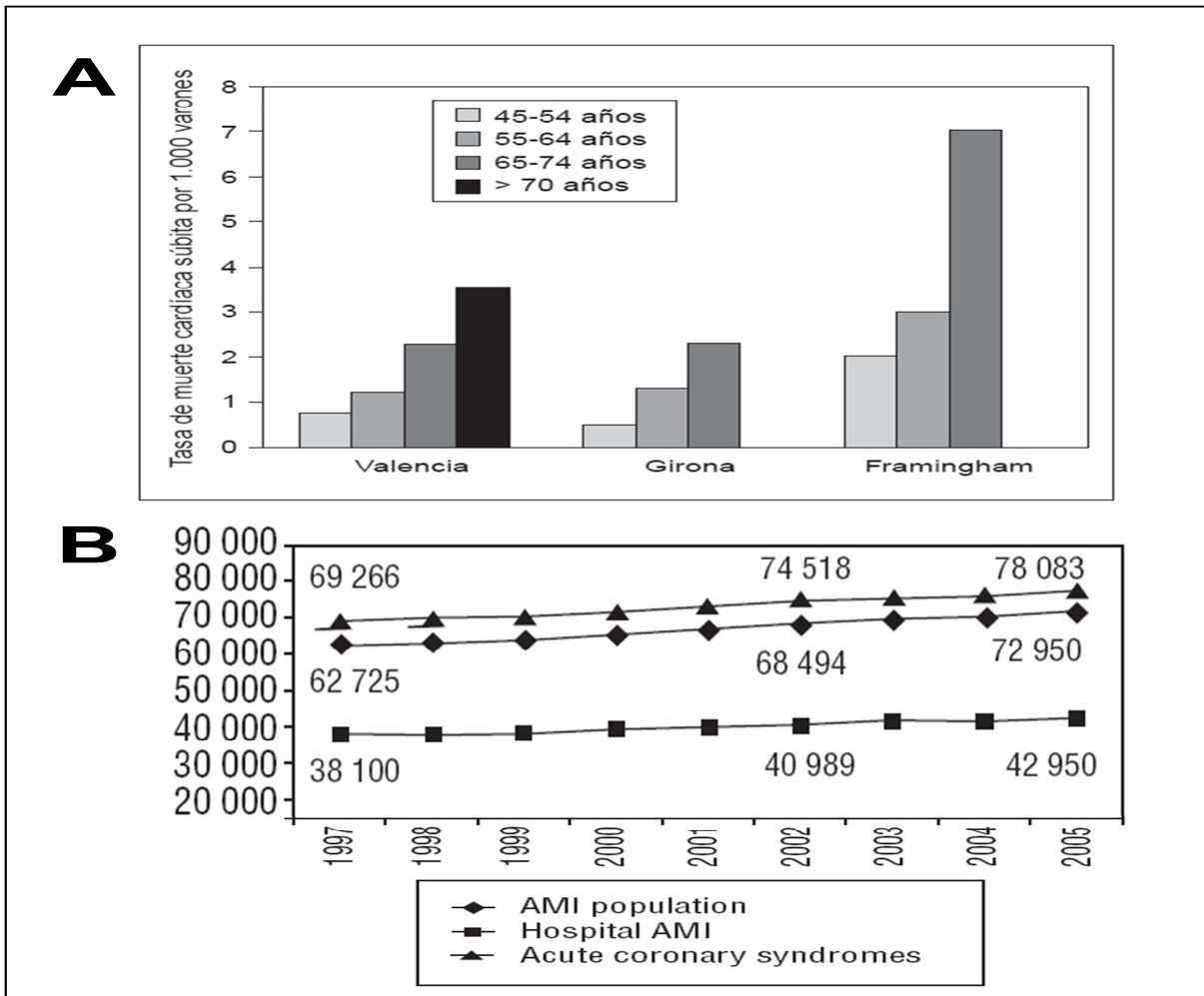


**Figura 2.** La muerte súbita de origen cardiovascular. **A)** Se muestra un electrocardiograma de un paciente con elevación del segmento ST en la cara inferior (que es diagnóstico de oclusión completa e ischemia transmural). Un extrasístole ventricular durante el periodo refractario relativo del ventrículo (en el tercio final de la onda T) inicia fibrilación ventricular. **B)** Corresponde a la imagen de autopsia en un paciente con muerte súbita, se visualiza trombosis intracoronaria. La enfermedad coronaria significativa es un hallazgo frecuente en estos pacientes.



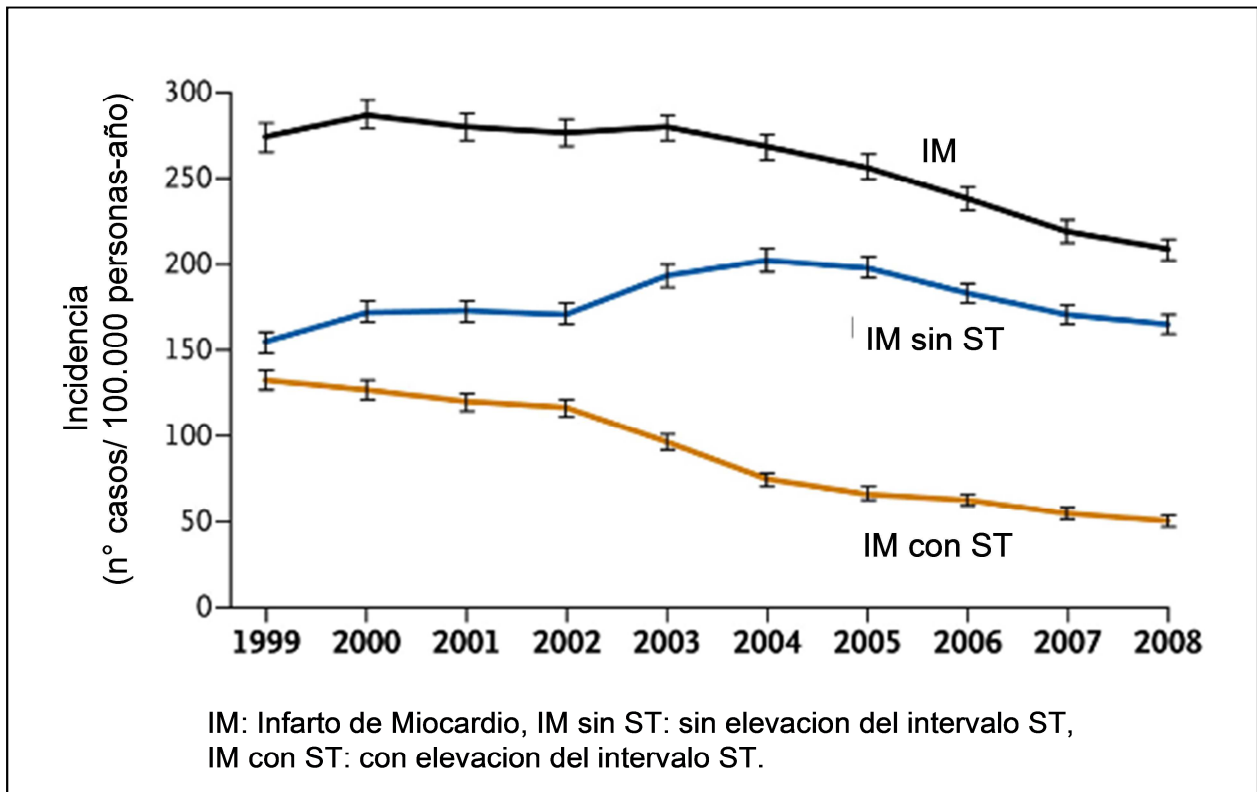
Según estos datos, la incidencia de muerte súbita cardiaca en España es de las más bajas de los países industrializados (aproximadamente unos 9000 casos anuales) (**Figura 3A**). Este dato, junto a una menor incidencia de infarto agudo de miocardio en este entorno<sup>1, 7</sup> pondría de manifiesto una situación favorable respecto a los países del norte de Europa y los EE.UU. Sin embargo en la década de los 90, la incidencia de enfermedad cardiaca isquémica en la población española continuó aumentando (**Figura 3B**).<sup>8</sup> Recientemente, disponemos de datos alentadores que muestran que en el siglo XXI, se ha producido una ligera disminución de la incidencia del infarto de miocardio con elevación del segmento ST (**Figura 4**),<sup>9</sup> pero otras formas de presentación de enfermedad coronaria (como angina inestable) han aumentado.<sup>8</sup>

En resumen, la muerte súbita cardiaca sigue siendo responsable de cientos de miles de fallecimientos al año en los países occidentales. Todo ello, a pesar de que España presenta una incidencia de cardiopatía isquémica de las más bajas de los países industrializados (**Figura 3A**).



**Figura 3. La Epidemiología de la muerte súbita y de la enfermedad coronaria.**<sup>7,8</sup>

El **panel A** muestra la tasa de muerte súbita cardíaca en los distintos rangos de edad por cada 100.000 habitantes de dos ciudades españolas (Girona y Valencia), que es menor de la observada en el estudio Framingham (Estados Unidos). El **panel B** muestra el número de casos anuales de infarto agudo de miocardio y de síndromes coronarios agudos desde el año 1997 a 2005.

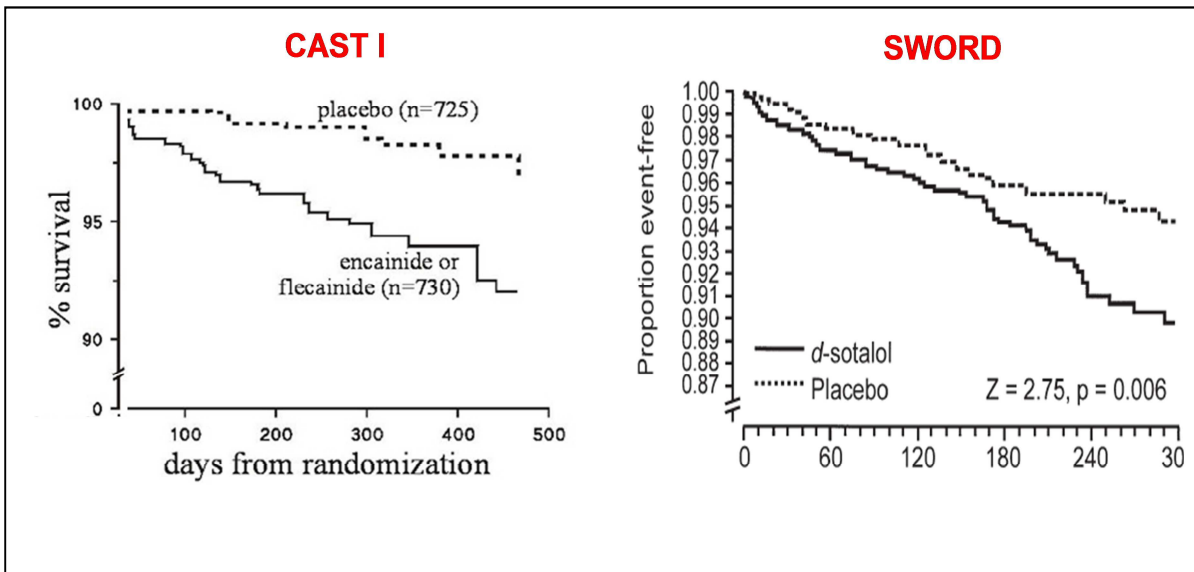


**Figura 4. La incidencia de Infarto de Miocardio en la última década** (Modificado de Yen et al, 2010).<sup>9</sup> Se muestra una tendencia a la disminución de la incidencia general de Infarto de miocardio en el siglo XXI, a expensas del descenso de Infarto de miocardio con elevación del intervalo ST. Por contra, la incidencia de infarto sin elevación del segmento ST se ha mantenido o incluso ligeramente ha aumentado.

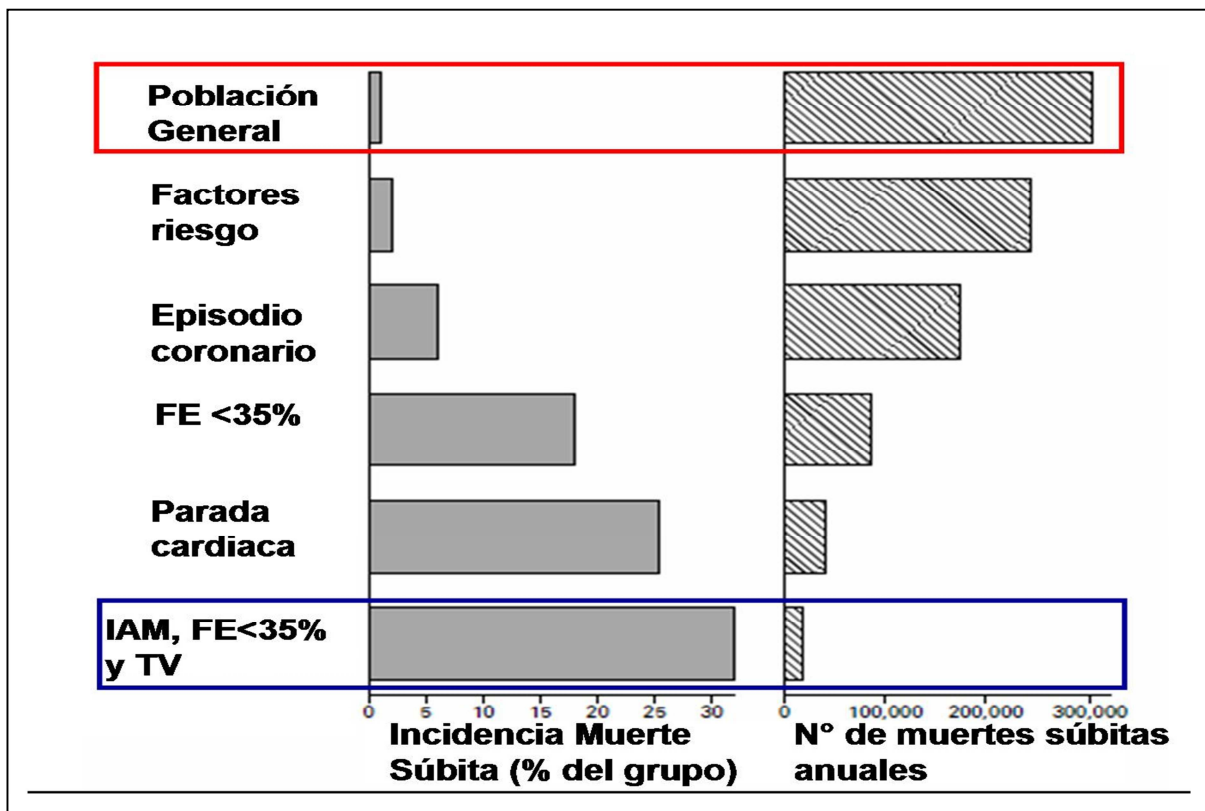


### **I.1.2 La terapia de prevención de la muerte súbita cardiaca.**

Los resultados de los estudios CAST<sup>10</sup> y SWORD<sup>11</sup> fueron desalentadores. Esto ha puesto de evidencia el fracaso de la terapia farmacológica para prevenir la muerte súbita. La hipótesis de ambos estudios era prometedora, tanto flecainida como sotalol disminuyen la extrasistolia ventricular, por tanto, podrían disminuir la incidencia de arritmias al disminuir su iniciación. Sin embargo, los resultados fueron paradójicos y la mortalidad aumentaba con ambos fármacos con respecto al grupo control (**Figura 5**). Fue evidente que estos antiarrítmicos presentaban “pro-arritmia”, suprimiendo los extrasístoles ventriculares pero facilitando el mantenimiento o degeneración de arritmias ventriculares una vez que se habían iniciado. Aunque el desfibrilador automático implantable salva muchas vidas, representa una carga considerable en el costo sanitario, no está exento de la posibilidad de complicaciones posquirúrgicas y supone un reto psicológico para muchos pacientes. En los últimos años, las indicaciones de implante de desfibriladores han continuado expandiéndose en pacientes con cardiopatía estructural conocida (función sistólica de ventrículo izquierdo <30%),<sup>12</sup> lo que supone un incremento en el gasto sanitario considerable. Además, la mayoría de las muertes súbitas cardiacas se producen en pacientes de la población general o en que la presencia de cardiopatía significativa no era aún conocida (**Figura 6**).<sup>13</sup>



**Figura 5. Ejemplos de fracasos farmacológicos en la prevención de la muerte súbita.** Se muestran dos estudios clásicos que demostraron la necesidad de ampliar nuestro conocimiento en los mecanismos básicos de las arritmias ventriculares. La hipótesis de ambos estudios era prometedora, tanto flecainida como sotalol disminuían la extrasistolia ventricular, por tanto, podrían disminuir la incidencia de arritmias al disminuir su iniciación. Sin embargo, los resultados fueron desalentadores y la mortalidad aumentaba con ambos fármacos con respecto al grupo control. Fue evidente que estos antiarrítmicos presentaban “pro-arritmia”, disminuyendo los extrasístoles ventriculares, pero facilitando el mantenimiento o la degeneración de arritmias ventriculares una vez que se habían iniciado.



**Figura 6.** La incidencia relativa y absoluta de muerte súbita cardiaca en pacientes, con o sin cardiopatía isquémica conocida. En términos relativos, un pequeño porcentaje de la población general (rectángulo rojo) presenta muerte súbita por arritmias ventriculares, comparado con la incidencia del grupo con cardiopatía isquémica conocida con antecedentes de IAM previo, función sistólica deprimida de ventrículo izquierdo y taquicardias ventriculares (rectángulo azul). Sin embargo, en términos absolutos, la mayoría de las muertes súbitas suceden en el grupo de la población general. Esto es, en personas sin cardiopatía significativa conocida previamente. Adaptado de Huikuri y col, NEJM 2001.<sup>13</sup>



En conclusión, es patente la necesidad de potenciar un mayor entendimiento de los mecanismos esenciales que intervienen en el desarrollo de las arritmias ventriculares malignas, en especial durante la isquemia y la reperfusión. Los científicos y los médicos debemos aunar nuestros esfuerzos para descubrir nuevos tratamientos farmacológicos, para prevenir la muerte súbita y/o reducir el número de episodios de descarga del desfibrilador implantable.

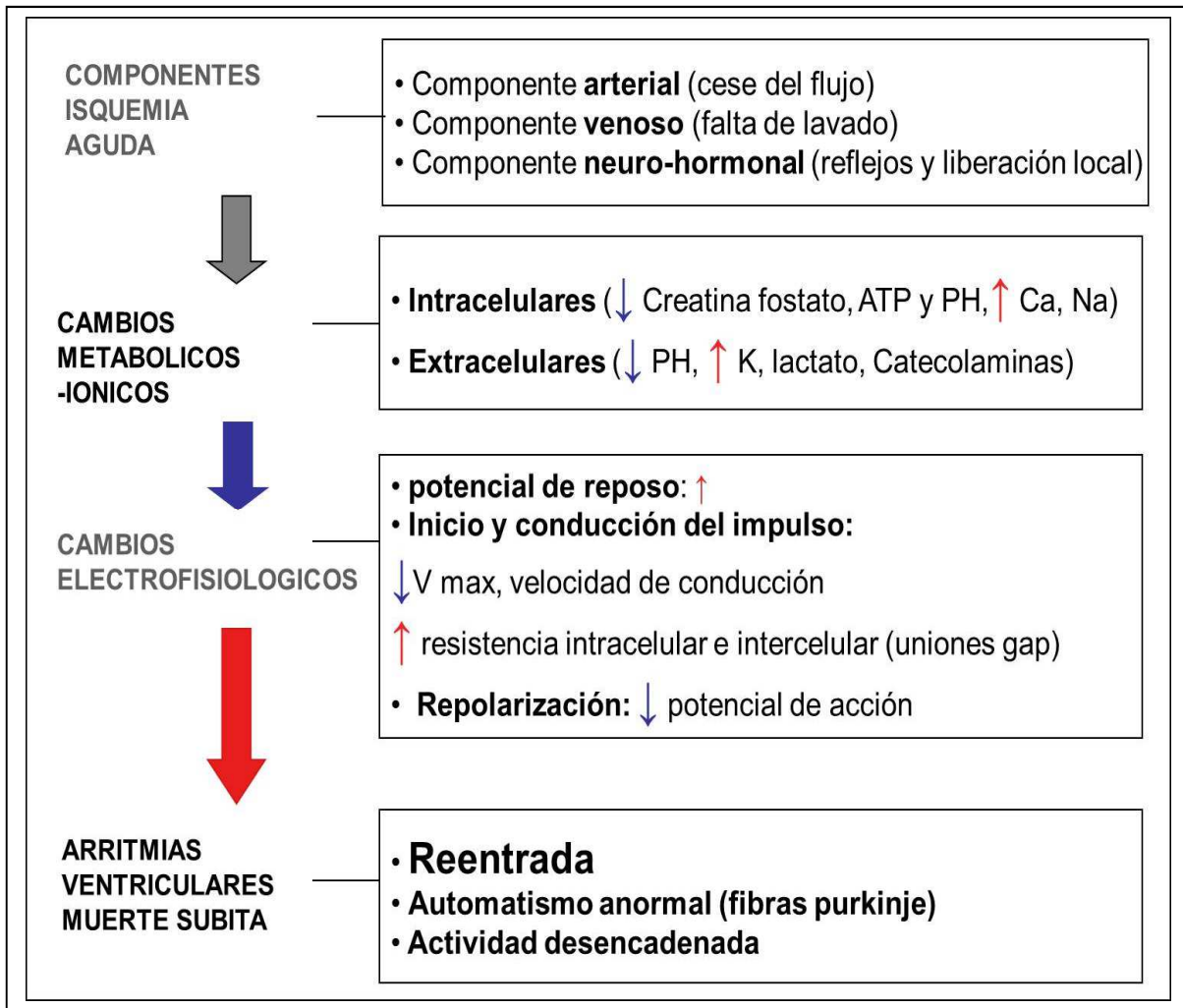
## **I. 2. Los efectos de la isquemia aguda:**

Desde el punto de vista de la fisiología, la isquemia aguda implica, en síntesis, un conjunto de componentes básicos (**Figura 7**):<sup>14,15</sup>

- a) El cese o la disminución del flujo arterial coronario.
- b) La ausencia de lavado venoso.
- c) Un componente neurohormonal, que incluye la activación de reflejos y la liberación de catecolaminas de forma local.

Estos mecanismos condicionan unos cambios metabólicos e iónicos, que se traducen en alteraciones en las propiedades electrofisiológicas del tejido miocárdico, dando lugar, en último término, al desarrollo de arritmias y en ocasiones con un fatal resultado, la muerte súbita.





**Figura 7:** Esquema básico de los componentes de la isquemia aguda y la secuencia de los principales cambios producidos.



### **I.2.1. Los cambios metabólicos**

La interrupción del flujo arterial produce:<sup>15</sup>

- I. Una disminución del aporte de oxígeno y nutrientes como la glucosa. Se produce la disminución en la presión parcial de oxígeno en la zona isquémica y un aumento de la presión de CO<sub>2</sub>. Esto conlleva que puntos clave del miocito dejan de funcionar correctamente como las mitocondrias, principales suministradoras de energía, que disminuyen su funcionamiento dando lugar a una caída de los fosfatos de alta energía (creatina fosfato, ATP). La bomba de sodio-potasio, que mantiene el potencial de membrana, es dependiente del ATP, por su disminución éste afecta su funcionalidad.
- II. El inicio del metabolismo anaerobio con aumento de la cantidad de protones, de los niveles de lactato y acidificación de los medios extracelulares e intracelulares.

La falta de lavado venoso causa una acumulación de metabolitos como el lactato, potasio, CO<sub>2</sub>, fosfato y adenosina (**Figura 8**).

Se han caracterizado 3 fases en los cambios del potasio extracelular (**Figura 9**):<sup>15</sup>

- a) Un aumento rápido (primeros 10-15 minutos de isquemia), producido por distintos mecanismos (salida pasiva desde la célula junto con aniones como el lactato, a través de canales de potasio sensibles a la disminución en ATP o por cambios en la actividad de la bomba sodio-potasio).



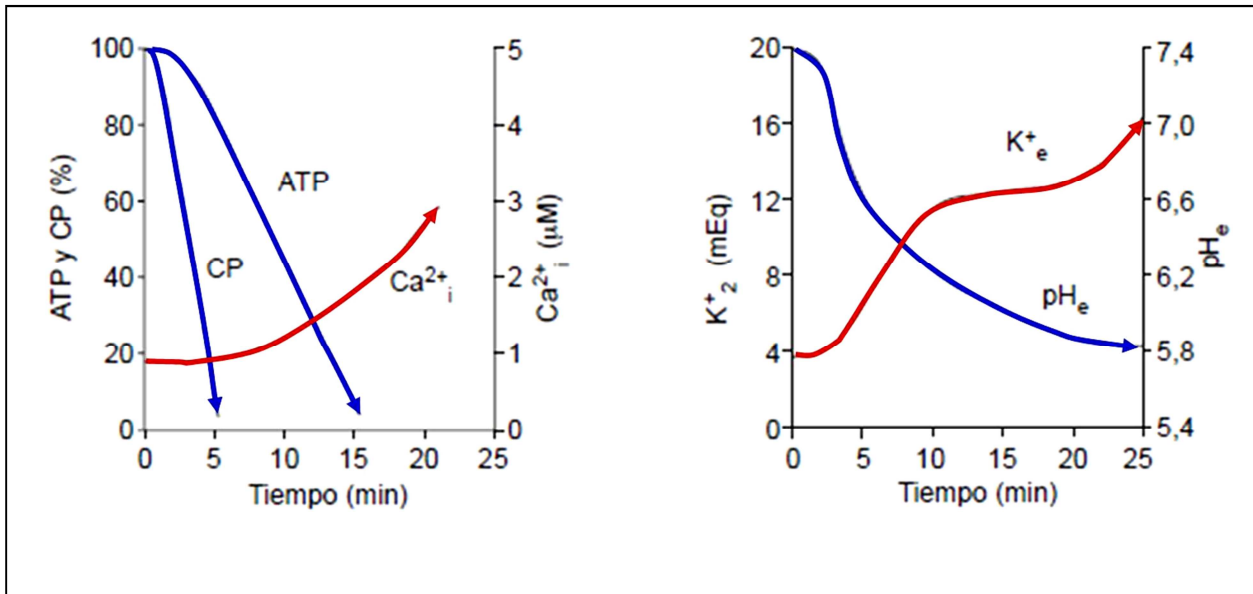
- b) Una fase de meseta (10-20 minutos de isquemia), en relación con aumento de la actividad de la bomba sodio-potasio por liberación de catecolaminas.
- c) Un aumento lento (>20-30 minutos), por agotamiento del ATP y asociado a daño irreversible celular.

En cuanto al calcio, éste aumenta en el interior de la célula (a partir de 10-15 minutos), lo que favorece el cierre de las uniones gap, y por tanto, un estado de desacoplamiento intercelular. Todas estas alteraciones metabólicas producen cambios en las propiedades electrofisiológicas en el miocardio isquémico como veremos en el siguiente apartado. Además, el grado de estas alteraciones metabólicas no sucede de forma homogénea en la zona isquémica, lo que tiene importantes implicaciones, provocando diferencias en las propiedades electrofisiológicas, facilitando el inicio de arritmias. Los mayores grados de heterogeneidad se han encontrado en el área peri-isquémica o en los bordes del área isquémica.



CAMBIOS METABOLICOS ISQUEMIA	
Intracelulares	Extracelulares
↓ Creatina fosfato	↑ Potasio
↓ ATP	↑ Lactato, CO <sub>2</sub>
↓ PH	↑ Catecolaminas
↑ Calcio	↑ Adenosina
	↓ PH

**Figura 8:** Los principales cambios metabólicos durante la isquemia aguda que acontecen al nivel intracelular y extracelular.



**Figura 9:** La secuencia temporal de los cambios metabólicos durante la isquemia aguda: ATP, CP (creatina fosfato), Ca (calcio), K (potasio) extracelular y PH. Nótese que los cambios en estos parámetros (ATP, CP, K y PH) se producen en los primeros 5 minutos de la isquemia. El aumento del calcio se inicia a los 5-10 minutos de la instauración de la isquemia. Adaptado de Sinovas y col , 1999.



## **I.2.2. Las alteraciones en las propiedades electrofisiológicas.**

### **I.2.2. A. Las propiedades electrofisiológicas del miocardio normal:**

Para entender los cambios electrofisiológicos que acontecen en la isquemia, revisaremos de forma breve el potencial de acción y los distintos canales iónicos de membrana así como el ciclo del calcio. Sucintamente, la célula miocárdica presenta un potencial de membrana de reposo en torno a -80 mV. La mayoría de las células cardiacas carecen de la capacidad de generar un impulso eléctrico o potencial de acción. Las células con función de marcapasos como son las del nodo sinusal, del nodo aurículo-ventricular y del sistema de Purkinje, tienen la capacidad de generar un impulso eléctrico que se trasmite por todo el miocardio a través de las uniones gap intercelulares. En la **figura 10**, se muestra el potencial de acción normal con sus 4 fases principales y los canales iónicos más importantes en cada fase. En la **figuras 11-13**, se muestran varios esquemas con los tipos de canales iónicos más significativos y el ciclo del calcio intracelular del miocito cardiaco.

En resumen, se podrían clasificar los tipos de potenciales de acción en 4 tipos:

a) **Ventricular**, con 4 fases (0 ,1 ,2 y 3). Estos miocitos no tienen la fase 4 o capacidad de generar el impulso eléctrico. El endocardio se activa antes que el epicardio debido al sistema de His-Purkinje. Para una contracción sincronizada de las distintas capas del ventrículo, el potencial de acción en el endocardio es más largo que

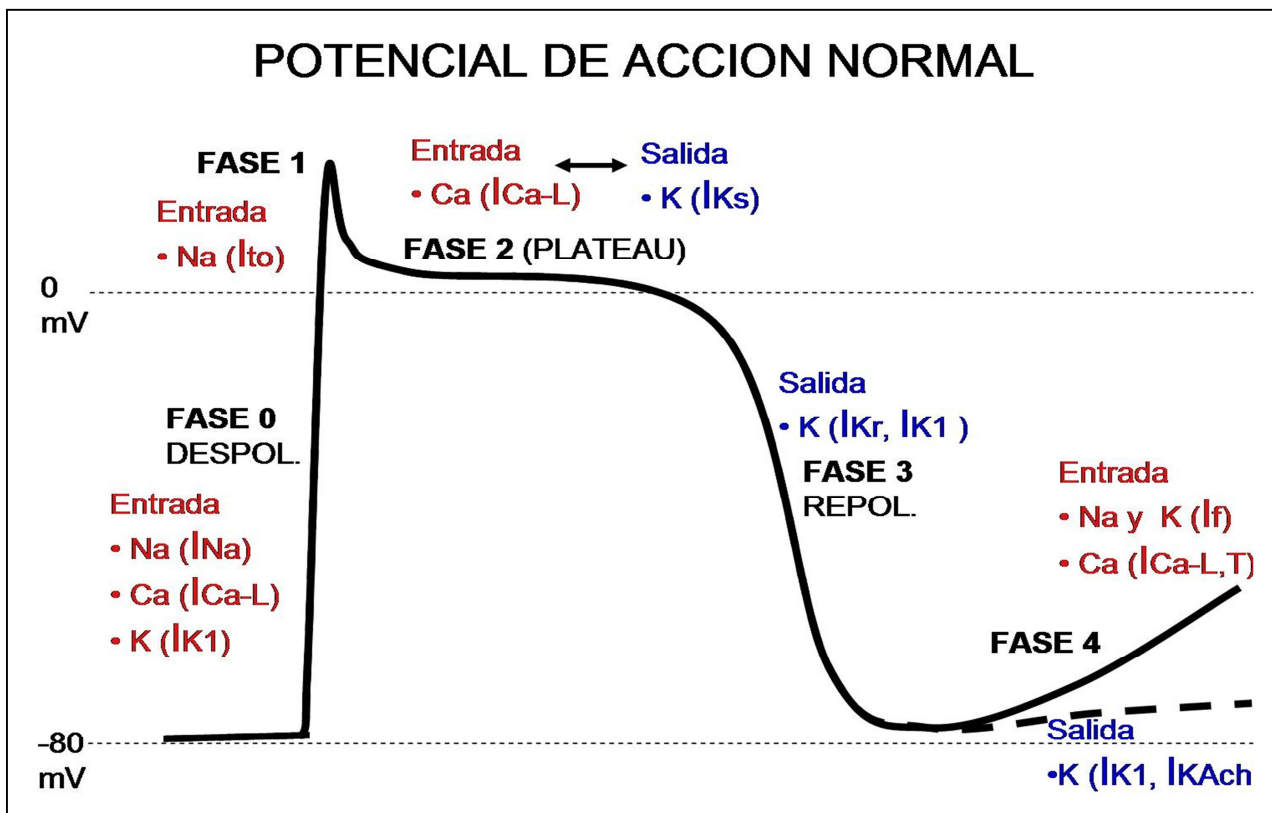


en el epicardio. Esto se atribuye a una mayor densidad de corriente  $I_{to}$  en el epicardio y otras causas.

b) **Nodo sinusal y Nodo Aurículo-ventricular.** Su potencial de acción presenta una forma más roma que el tipo ventricular, porque carecen de  $I_{Na}$  (entrada rápida de sodio) por lo que su fase 0 es más lenta (producida por  $I_{Ca-L}$ ). No presentan fase 1 (carecen de  $I_{to}$ ). La duración de este potencial de acción es más corta porque la duración de la corriente  $I_{Ca-L}$  es más corta que en el ventrículo. Estas células exhiben la capacidad de generar el impulso eléctrico o fase 4 (a través de las corrientes  $I_f$ ,  $I_{Ca-L}$ ,  $I_{Ca-T}$ ,  $I_{K1}$ ). Responden al sistema colinérgico ( $I_{K ACh}$ ).

c) **His-Purkinje**, similar en su forma al potencial ventricular, porque presentan una fase 0 rápida (debido a  $I_{Na}$ ). Estas células presentan la capacidad de generar el impulso eléctrico o fase 4 (a través de las corrientes  $I_f$ ,  $I_{Ca-L}$ ,  $I_{Ca-T}$ ,  $I_{K1}$ ). No responden al sistema colinérgico ( $I_{K ACh}$ ).

d) **Auricular**, su fase 0 es rápida también (debido a  $I_{Na}$ ), es más corto que el ventricular por la menor duración de  $I_{Ca-L}$ . Estos miocitos no presentan fase 4.

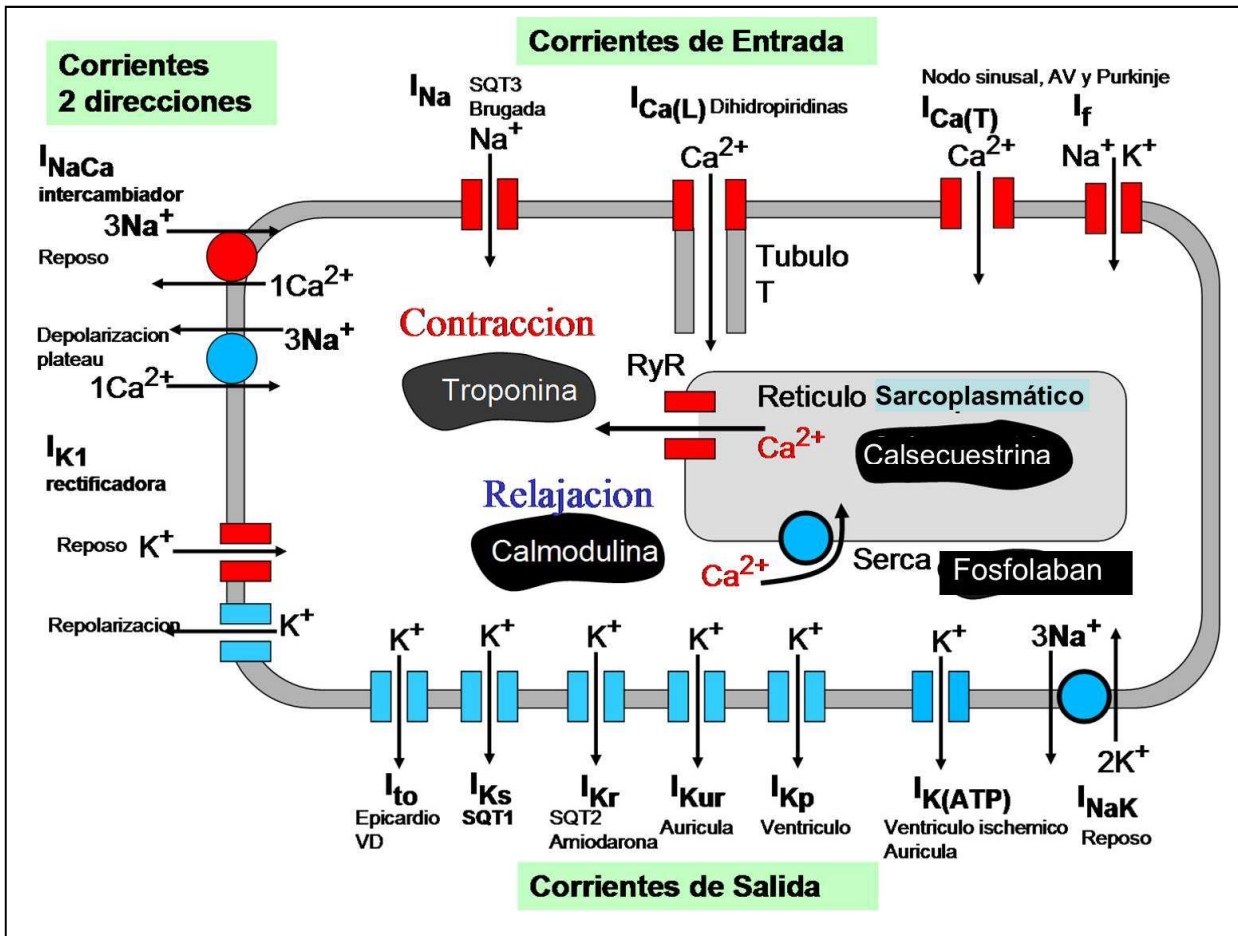


**Figure 10:** El potencial de acción de la célula miocárdica. Existen 4 fases: la fase 0 o de despolarización, la fase 1, la fase 2 o de meseta y la fase 3 o de repolarización. Las corrientes implicadas se muestran junto a cada fase, en rojo las corrientes que hacen menos negativo el potencial de membrana (corrientes de entrada) y en azul las corrientes que hace más negativo el potencial de membrana (corrientes de salida). Las corrientes de entrada tienden a despolarizar progresivamente el potencial de reposo y las corrientes de salida tienden a aplanar la pendiente de este incremento en el potencial de membrana. La fase 0 depende fundamentalmente de las corrientes de entrada I<sub>Na</sub> y de I<sub>Ca</sub> tipo L. La corriente I<sub>to</sub> es responsable de la fase 1. La fase de





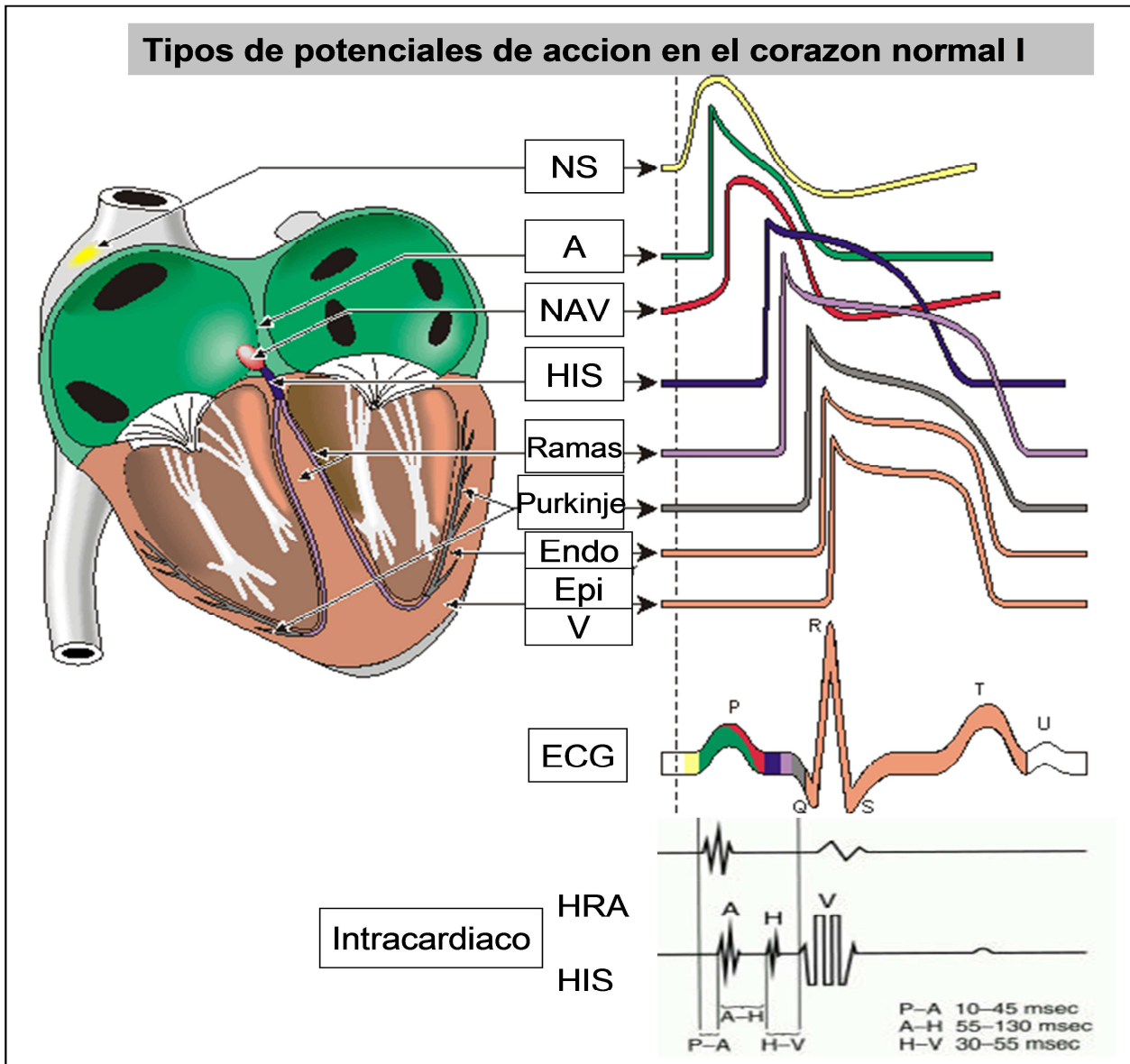
meseta (fase 2) se debe al balance entre las corrientes de entrada (principalmente,  $I_{Ca}$  tipo L ) y las corrientes de salida ( $I_{Ks}$ ). La fase de repolarización (fase 3), sucede por la intervención de las corrientes de salida de potasio ( $I_{Kr}$ ,  $I_{K1}$ ). Algunas células de “tipo marcapasos” tienen la capacidad de generar impulsos (nodo sinusal, nodo aurículo-ventricular, etc.) y presentan una fase adicional: la fase 4 o diastólica. La pendiente de la fase 4 depende de la participación de múltiples corrientes de entrada ( $I_f$ ,  $I_{Ca}$  tipo Ly T) y de salida ( $I_{KAch}$ ,  $I_{K1}$ ). De todas ellas, destaca la corriente  $I_f$ , a la que se le atribuye un papel muy destacado en la generación de la fase 4.



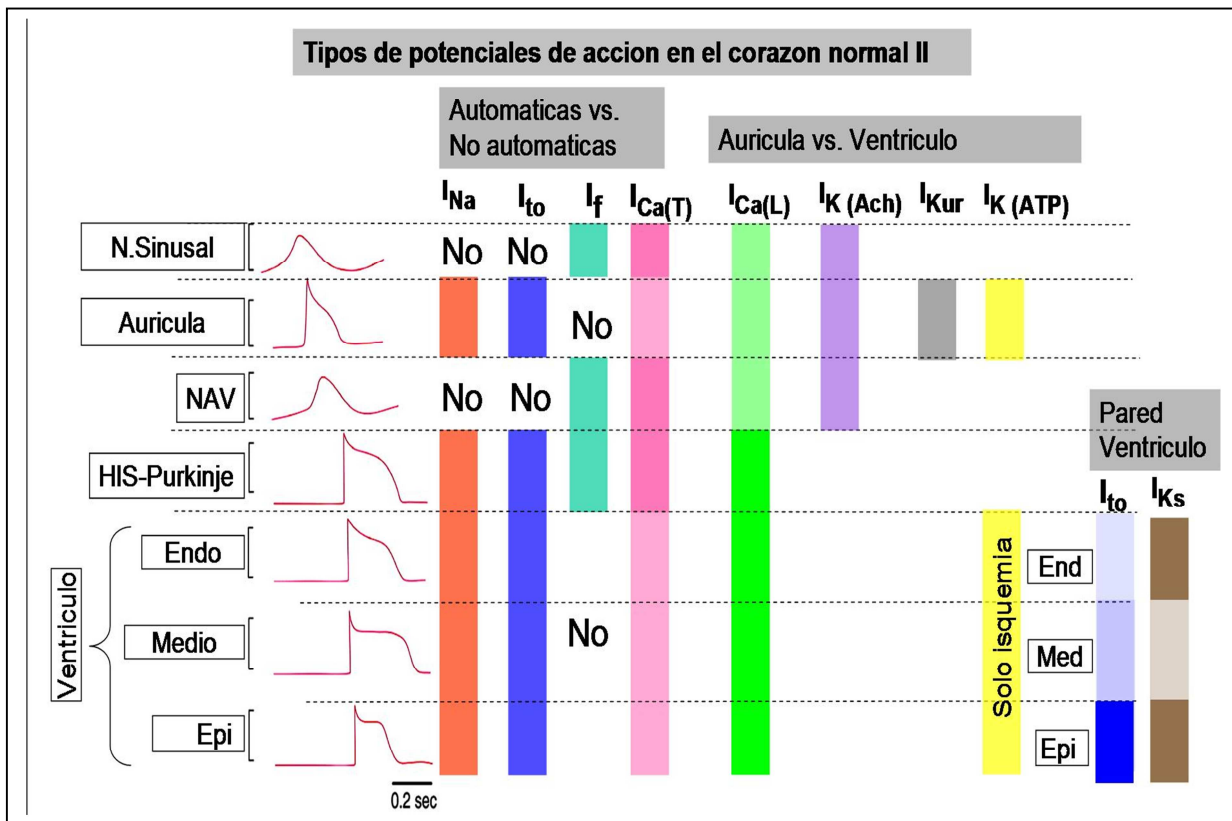
**Figure 11:** Esquema de las principales corrientes iónicas en la membrana de la célula cardiaca y los principales factores del ciclo del calcio. Las corrientes iónicas de la membrana del miocito cardiaco pueden clasificarse en tres tipos: **a)** las corrientes de entrada de iones positivos, que tienen a despolarizar la célula (en rojo). **b)** las corrientes de salida, que liberan iones positivos y tienden hacer más negativo el potencial de membrana o a repolarizar la célula (en azul). **c)** las corrientes capaces de funcionar en las dos direcciones dependiendo de las circunstancias. Al lado de cada canal, se sitúa la característica distintiva del mismo con implicaciones fisiológicas y/o



clínicas. En primer lugar se produce el potencial de acción (ver figura previa). En cuanto al ciclo del calcio, el cambio en el potencial de la membrana durante el inicio del potencial de acción produce la apertura de los canales de calcio tipo L de la membrana, que son sensibles al voltaje. A través de los túbulos T, se liberan pequeñas cantidades de calcio que alcanzan los canales de rianodina del retículo sarcoplasmático intracelular, lo que activa la liberación mayoritaria de calcio del retículo sarcoplasmático al citosol (90% del calcio liberado). La contracción y la relajación se llevan a cabo por la interacción de la troponina y la calmodulina con el calcio citosólico, respectivamente. El calcio regresa al retículo sarcoplasmático a través del canal activo SERCA que es dependiente de ATP.



**Figura 12.** Los tipos de potenciales de acción en el miocardio. El potencial ventricular exhibe diferentes duraciones a nivel transmural, siendo más prolongado a nivel medio y más estrecho a nivel epicárdico (donde las corrientes  $I_{to}$  e  $I_{Ks}$  son más predominantes). Ver texto de figura 13



**Figura 13.** Los tipos de corrientes iónicas según el tipo de célula cardiaca. En relación a las diferencias regionales de los canales iónicos, la morfología del potencial de acción varía sustancialmente en las distintas regiones del corazón. Las células con función de marcapasos: el nodo sinusal, el nodo aurículo-ventricular y el sistema His-Purkinje, presentan o pueden tener una fase de despolarización diastólica (fase 4). Hay diversas corrientes que han sido implicadas en la generación de la fase 4 como  $I_f$  (un canal que es permeable tanto a sodio como a potasio),  $I_{Ca(T)}$ ,  $I_{Ca(L)}$ ,  $I_K(Ach)$  en el nodo sinusal y el nodo aurículo-ventricular y  $I_{K1}$  en el sistema de Purkinje. Desde este punto de vista morfológico, se podrían clasificar en 3 tipos de una forma muy



sintetizada: a) Las células del nodo sinusal y del nodo aurículo-ventricular presentan un potencial de *tipo romo*. b) Las células ventriculares y del sistema his-purkinje que presentan la *morfología típica* (con una fase rápida, una fase 1, una meseta y una fase de repolarización). c) Las células auriculares que presentan una forma parecida al potencial típico pero más *estrecho o triangular*. El objetivo del nodo sinusal y del nodo aurículo-ventricular (“potencial romo”) es iniciar el impulso eléctrico y asegurar su propagación a las áreas circundantes, por ello, presentan un potencial de acción con una fase 0 más lenta, puesto que carecen del canal rápido de sodio, aumentando así el factor de seguridad de la conducción del impulso. Además, el nodo sinusal y el nodo aurículo-ventricular no presentan la fase 1 por ausencia del canal Ito. La corriente de  $I_{K(Ach)}$  se distribuye predominantemente en el nodo sinusal, en el nodo aurículo-ventricular y en la aurícula. Sin embargo el canal  $I_{K(Ach)}$  no está presente en el sistema de His-Purkinje. Este hecho tiene implicaciones fisiológicas, de carácter clínico y terapéutico. La atropina, que indirectamente estimula el receptor  $I_{K(Ach)}$ , puede mejorar la conducción durante un bloqueo completo localizado a nivel del nodo AV. Sin embargo, la atropina no es eficaz o puede empeorar en el caso de un bloqueo intrahisiano o infrahisiano. Las células auriculares (“potencial triangular”) presentan varias particularidades: una menor cantidad del canal de  $I_{Ca-L}$ , la presencia del canal  $I_{Kur}$ , que es prácticamente exclusivo del tejido auricular, y la presencia del canal  $I_{K(Ach)}$ . Todo ello contribuye a un potencial auricular más estrecho.



### **I.2.2.B. Las alteraciones en las propiedades electrofisiológicas durante la isquemia:**

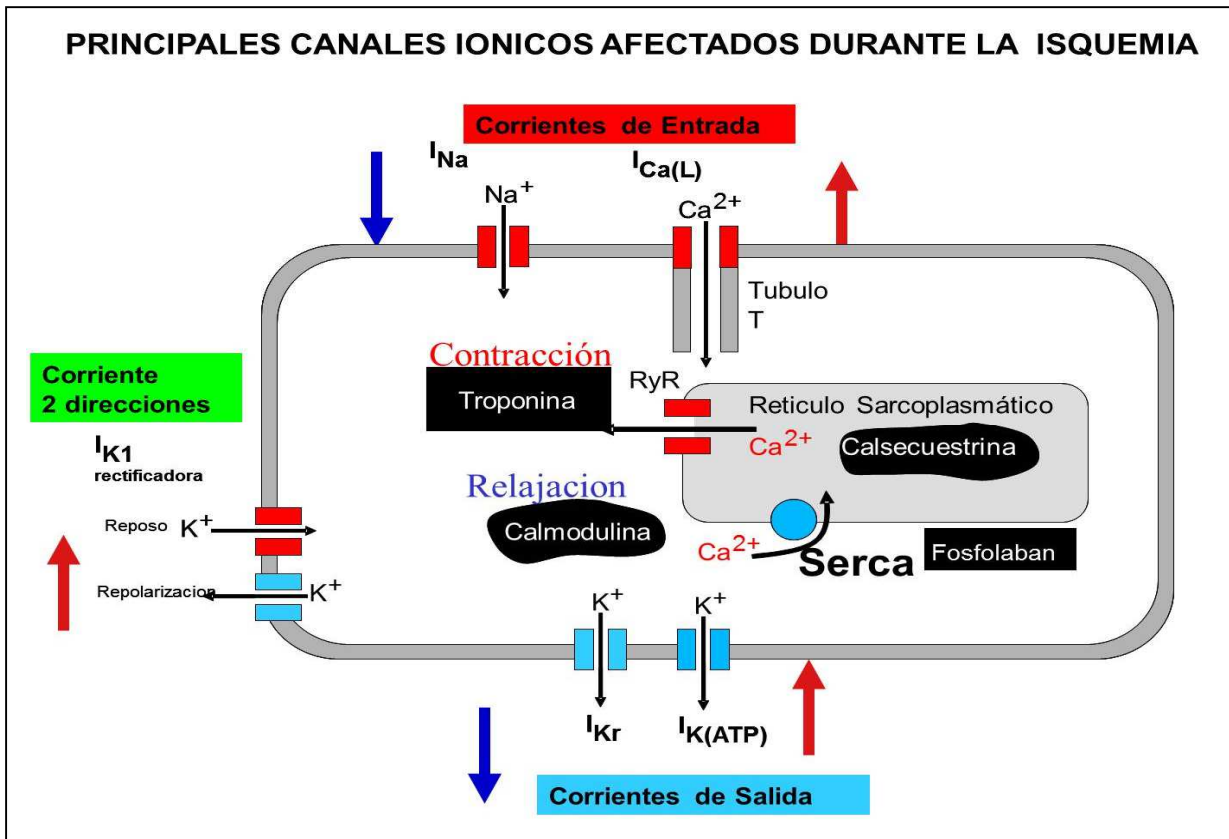
El aumento del potasio extracelular esencialmente conduce a un aumento del potencial de membrana o de reposo, lo que inactiva parcialmente la corriente de sodio. Esta corriente de sodio es el principal elemento de la despolarización del potencial de acción (**Figuras 14-17**). La isquemia aguda produce en el potencial de acción los siguientes cambios:<sup>14</sup>

a) *Una disminución en la V max* o la pendiente máxima de la fase 0, por una disminución en la corriente de sodio y otros factores. Esto tiene un efecto importante en la velocidad de conducción que disminuye.

b) *Una disminución de la amplitud del potencial de acción*, relacionada con la disminución del canal de sodio. Como nota de interés, existe un aumento transitorio de la Vmax y de la amplitud del potencial de acción que sucede a los 15 minutos de la isquemia y se ha puesto en relación con liberación de catecolaminas.

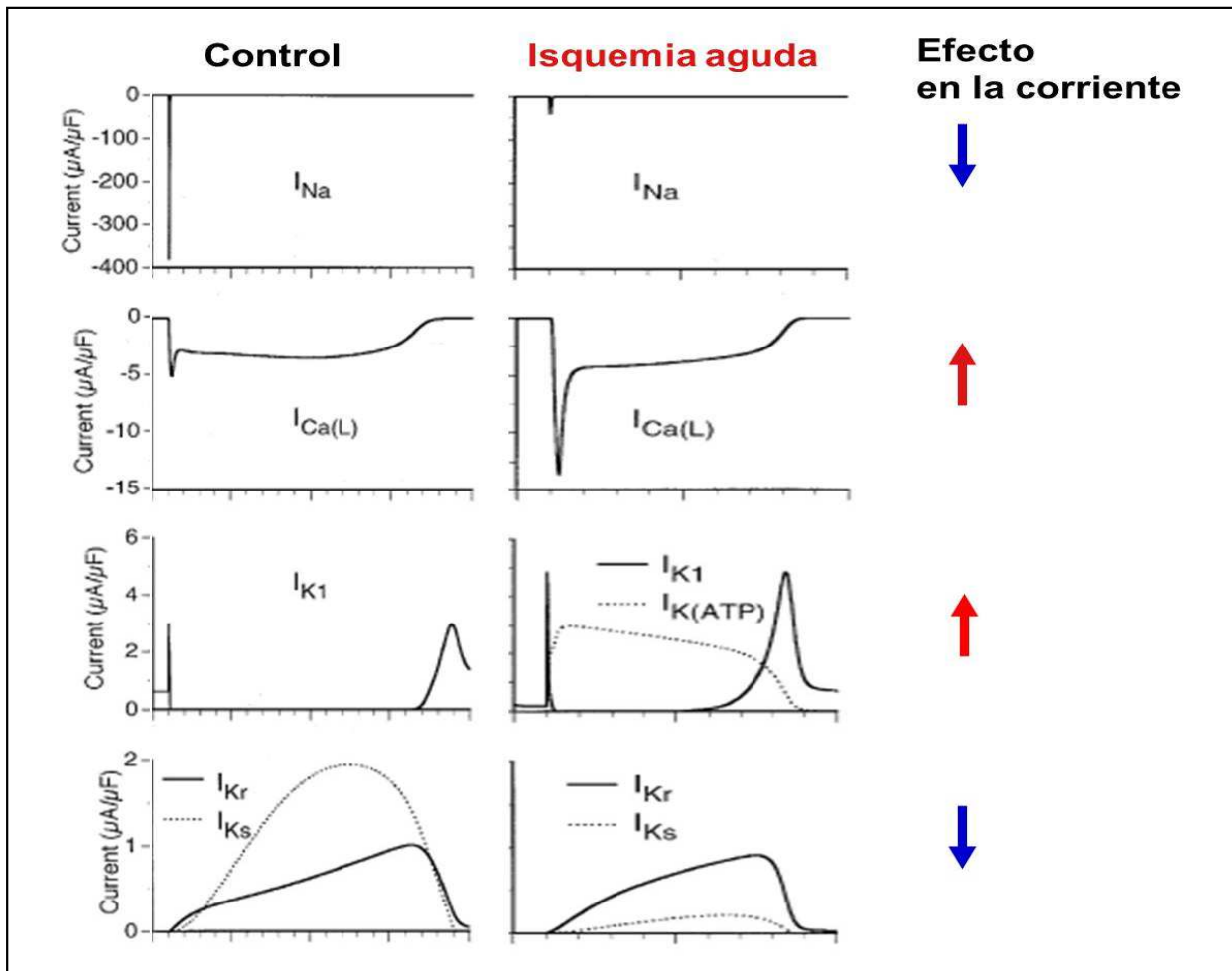
c) Un acortamiento en la duración del potencial de acción debido a la disminución del ATP que activa canales de potasio específicos, y también debido al aumento del potasio extracelular, del calcio intracelular y a la liberación de catecolaminas.

d) Un aumento del potencial de membrana, que se hace más positivo debido al aumento del potasio extracelular y otras causas.

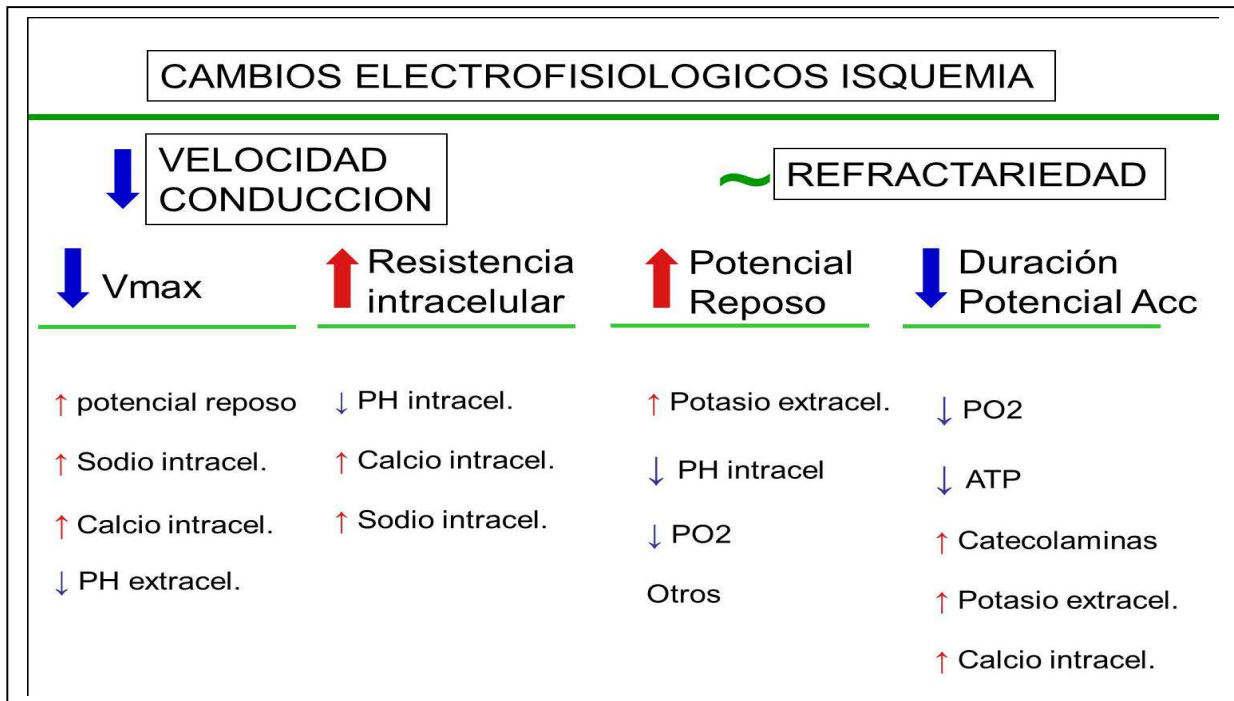


**Figura 14.** Los efectos de la isquemia en los principales canales iónicos. Durante la isquemia, los canales de entrada rápida de sodio y los principales canales de potasio ( $I_{Kr}$  y  $I_{Ks}$ ) experimentan una disminución en su funcionalidad. Por contrario, los canales de membrana de calcio (tipo L) aumentan su actividad. Los canales de potasio sensibles de la disminución de ATP se activan (a nivel ventricular). Durante la isquemia aguda, la disminución de la corriente de sodio presenta un efecto marcado sobre la fase de despolarización o fase 0. La activación del canal de potasio dependiente de ATP tiende a acortar el potencial de acción.

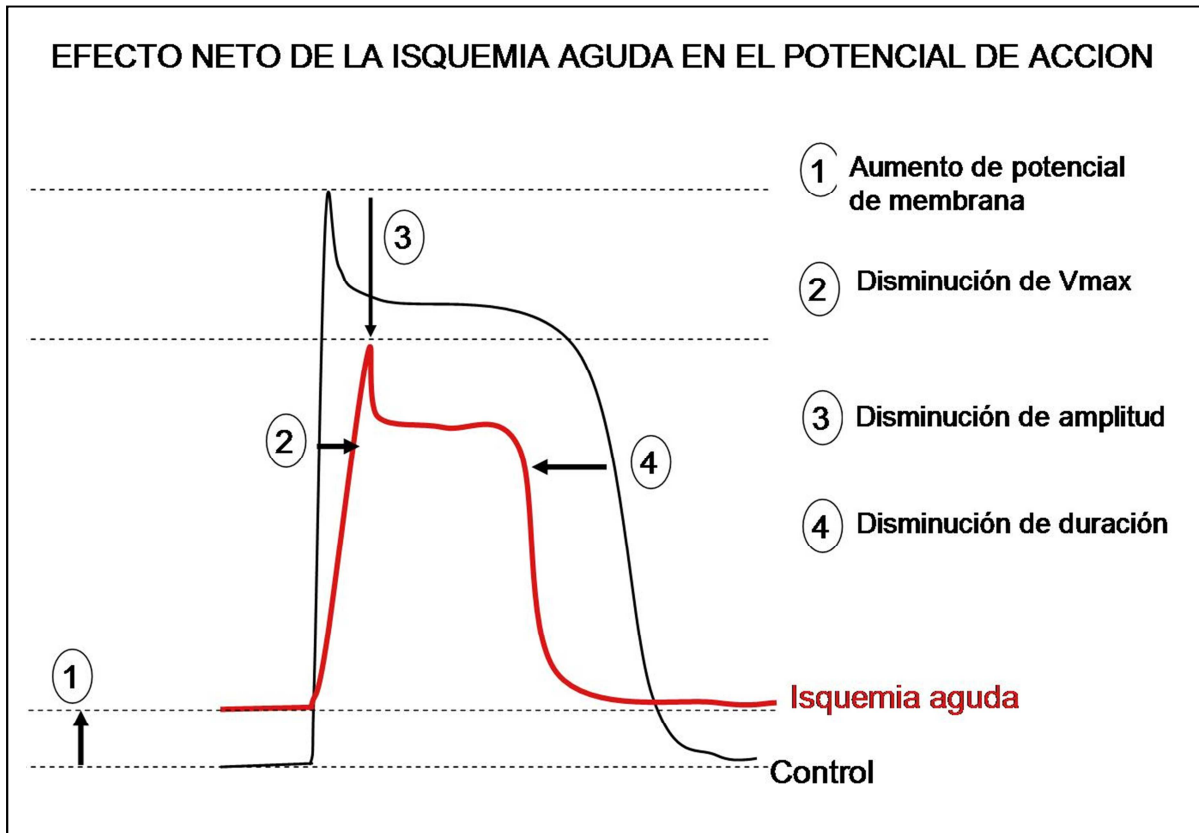




**Figura 15:** Gráficos de corriente/tiempo para los principales canales del miocito en condiciones normales y los efectos de la isquemia aguda. Gráficos basados en los estudios experimentales y adaptados de simulaciones matemáticas realizadas por Shaw y Rudy, 1997.



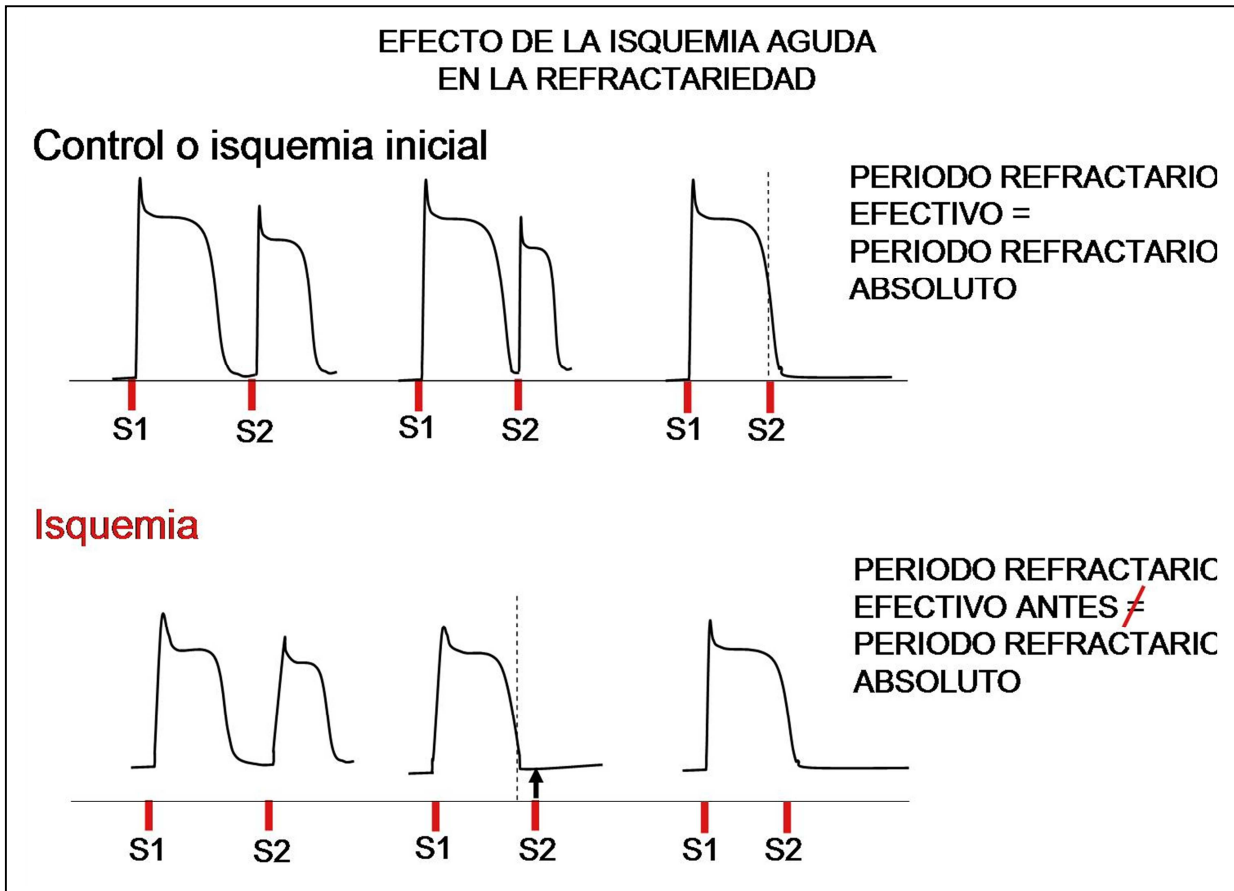
**Figura 16. Los cambios electrofisiológicos durante la isquemia.** En síntesis, las principales propiedades electrofisiológicas del miocito son: la velocidad de conducción del impulso eléctrico y la refractariedad o capacidad de recuperación para ser excitado eléctricamente. Los factores implicados son enumerados en esta figura. La isquemia produce una disminución en la velocidad de conducción por una disminución de la Vmax (pendiente máxima de la fase 0) y un aumento de la resistencia intracelular-intercelular. La duración del potencial de acción se reduce, por lo tanto esto disminuiría la refractariedad. Sin embargo, el potencial de reposo aumenta, lo que produce una **refractariedad post-repolarización** típica de la isquemia. El miocardio isquémico puede ser refractario incluso después de haberse repolarizado en la fase 3.



**Figura 17** Los cambios producidos por la isquemia aguda en el potencial de acción. Ver texto. Los números 1, 2, 3 y 4 ilustran los 4 principales cambios que el potencial de acción experimenta. En negro, se muestra un esquema del potencial de acción normal a nivel ventricular. En rojo, se superpone una representación del potencial de acción durante la isquemia aguda.



Los efectos en la refractariedad varían a lo largo del tiempo de isquemia. Inicialmente, el periodo refractario se acorta por la disminución de la duración del potencial de acción, y posteriormente se alarga excediendo la duración del potencial de acción. Este fenómeno se denomina refractariedad post-repolarización y sucede típicamente en la isquemia.<sup>16,17</sup> Esto se debe a que la recuperación de los canales de sodio es dependiente de voltaje, siendo más larga su recuperación cuanto mayor sea el potencial de membrana. Ver **Figura 18**. En condiciones basales, se estimula el ventrículo con un tren de estímulos (S1) y la introducción de extraestímulos ventriculares progresivamente más cortos (S2). Se alcanza un momento que al acortar el acoplamiento S1S2, el estímulo no captura el ventrículo (periodo refractario efectivo), lo que se correlaciona con el periodo refractario absoluto. Durante la isquemia aguda en sus fases iniciales, el potencial de acción se acorta por lo que se acorta el periodo de refractario. Cuando la isquemia progresa, se produce un marcado aumento en el potencial de membrana que inactiva el número de canales de sodio disponibles. Esto produce que se alcance la refractariedad del ventrículo incluso después de que el ventrículo se ha repolarizado. Durante la isquemia, aplicamos el mismo protocolo de estimulación con introducción de extraestímulos progresivamente más cortos, hasta que llega un momento que el estímulo no captura el ventrículo. En este caso el periodo refractario efectivo no coincide con el periodo refractario absoluto relacionado a la duración del potencial de acción, sino que ocurre con acoplamientos más largos del propio potencial de acción.



**Figura 18.** Esquema explicativo del efecto de la isquemia aguda en la refractariedad miocárdica.



En cuanto a los efectos sobre la velocidad de conducción se han descrito 3 fases fundamentales:

1) Una fase inicial (primeros 2 minutos) con un aumento transitorio de la velocidad de conducción. Se ha observado en algunos modelos animales.<sup>18</sup>

2) Una fase de enlentecimiento de instauración precoz (5-20 min), por la inactivación parcial de los canales de sodio y la reducción de la  $V_{max}$ ,<sup>19</sup> así como por aumento de la resistencia extracelular.<sup>20</sup>

3) Una fase de enlentecimiento rápido de aparición tardía (>15-20 minutos). Se produce por el desacoplamiento eléctrico intercelular por un aumento de la resistencia, que conduce al bloqueo de la conducción.

El desacoplamiento intercelular se relaciona con la caída del pH, el aumento del calcio y sodio intracelulares, que promueven cambios estructurales en las uniones gap. El momento en que estos cambios estructurales se tornan irreversibles ha sido el objeto de una investigación intensa.<sup>20-22</sup> Posteriormente, nuevos hallazgos han matizado esta clasificación de distintas fases. Por ejemplo, otros estudios han demostrado una caída rápida de la velocidad de conducción en los primeros minutos de la isquemia aguda.<sup>14, 15</sup> Por otro lado, se han observado cambios conformacionales en las uniones gap que mostraron ser reversibles como la aparición de una forma no fosforilada, que no es funcional.

Además, la isquemia aguda disminuye la funcionalidad de la bomba SERCA (encargada de la captación del calcio del citosol hacia el retículo sarcoplasmático). Esta



alteración es la principal responsable de otro de los cambios típicos de la isquemia aguda: una prolongación en la duración en la liberación del calcio del retículo sarcoplasmático hacia el citosol.<sup>23</sup>

Durante la isquemia aguda, la combinación de un potencial de acción corto con una prolongación en la liberación del calcio promueven la generación extrasistolia y arritmias.<sup>24</sup>

### **I.2.3. Los mecanismos de las arritmias durante la isquemia aguda.**

#### **I.2.3.A. Los mecanismos de inicio de arritmias.**

Se han descrito clásicamente tres tipos de mecanismos para el inicio de arritmias: el mecanismo por reentrada, por automatismo o por actividad desencadenada (**Figura 19**). Estos mecanismos también ocurren durante la isquemia aguda, siendo el más frecuente el mecanismo por reentrada en general. Harris y Rojas<sup>15, 25</sup> demostraron que durante la isquemia aguda existen dos periodos de vulnerabilidad para el inicio de arritmias ventriculares. El primero (Fase I o aguda) sucede en los primeros 30 minutos, mientras que el segundo periodo (Fase II o subaguda) ocurre horas después (con un pico máximo de arritmias entre las 12-24 horas). La fase I se ha dividido en IA (primeros 15 min) y IB (15-30min).

A continuación se describen las siguientes fases en detalle (**Figura 20**):



**a) Fase IA: Arritmias durante la isquemia aguda <15 min.**

En los primeros 15 minutos de isquemia (*fase IA*), la reentrada juega un papel decisivo en el inicio de arritmias ventriculares. Esto se ha fundamentado, en primer lugar, en los estudios con registros locales, donde se observó una actividad eléctrica continua que sugiere la conducción local continua, típica del mecanismo de reentrada (**Figura 21**). Posteriormente, algunos estudios más recientes con sistemas de mapeo epicárdico han confirmado que la reentrada era un mecanismo de inicio fundamental en esta fase precoz (**Figura 22**).<sup>26,27,28,27,29</sup>

En consonancia con los datos experimentales, los estudios de isquemia con simulación matemática han demostrado la inducción de arritmias mediante un mecanismo de reentrada, bien por dispersión de la repolarización a través de las distintas capas del miocardio (o llamada *reentrada en fase 2*)<sup>30</sup> o incluso en modelos bidimensionales(**Figura 23**).<sup>31</sup>

Durante la isquemia, el tejido miocárdico se puede dividir en tres áreas: la zona isquémica, la zona no isquémica o sana y la zona peri-isquémica (o zona borde).<sup>32</sup> Se produce entonces, el bloqueo de la conducción en la zona isquémica o zona borde. Una vez instaurada la reentrada, los patrones de activación son diferentes según el tipo de arritmia ventricular. Durante la taquicardia ventricular, suele existir un único circuito. En cambio, durante una fibrilación ventricular, se han observado múltiples circuitos que pueden ser cambiantes y de menor tamaño.<sup>26</sup>





Sin embargo, otros mecanismos focales también han sido implicados<sup>26, 28</sup> en el inicio de arritmias durante esta fase precoz (IA). Las taquicardias ventriculares pueden originarse focalmente en las células de Purkinje, que se excitan de forma anormal por la aparición de corriente de lesión. Se ha postulado que la corriente de lesión fluye intracelularmente desde el tejido isquémico hacia el sano, generando gradientes regionales en el potencial de membrana.<sup>26, 33, 34</sup> Además, se han descrito la aparición de pospotenciales en las fibras de Purkinje, que se han puesto en relación con oscilaciones del potencial de membrana debido a la corriente de lesión.<sup>35</sup>

**b) Fase IB: Arritmias durante la isquemia aguda durante 15 min-30 min**

En esta fase se han propuesto varios mecanismos de iniciación de arritmias. Sin embargo, un mecanismo focal (**Figura 21**) parece ser el elemento predominante bien por automatismo bien por pospotenciales generados en las células de Purkinje. Un hecho importante de esta fase es la acumulación de catecolaminas,<sup>36</sup> que favorecerían los mecanismos focales de arritmias. Los siguientes hallazgos sugieren el papel preponderante de estos mecanismos focales mediados por el sistema neurohormonal durante esta fase de isquemia:

- 1) Una disminución en la heterogeneidad en los periodos refractarios<sup>37</sup>
- 2) La ausencia de actividad diastólica continua en registros locales epicárdicos (**Figura 21**).<sup>28</sup>

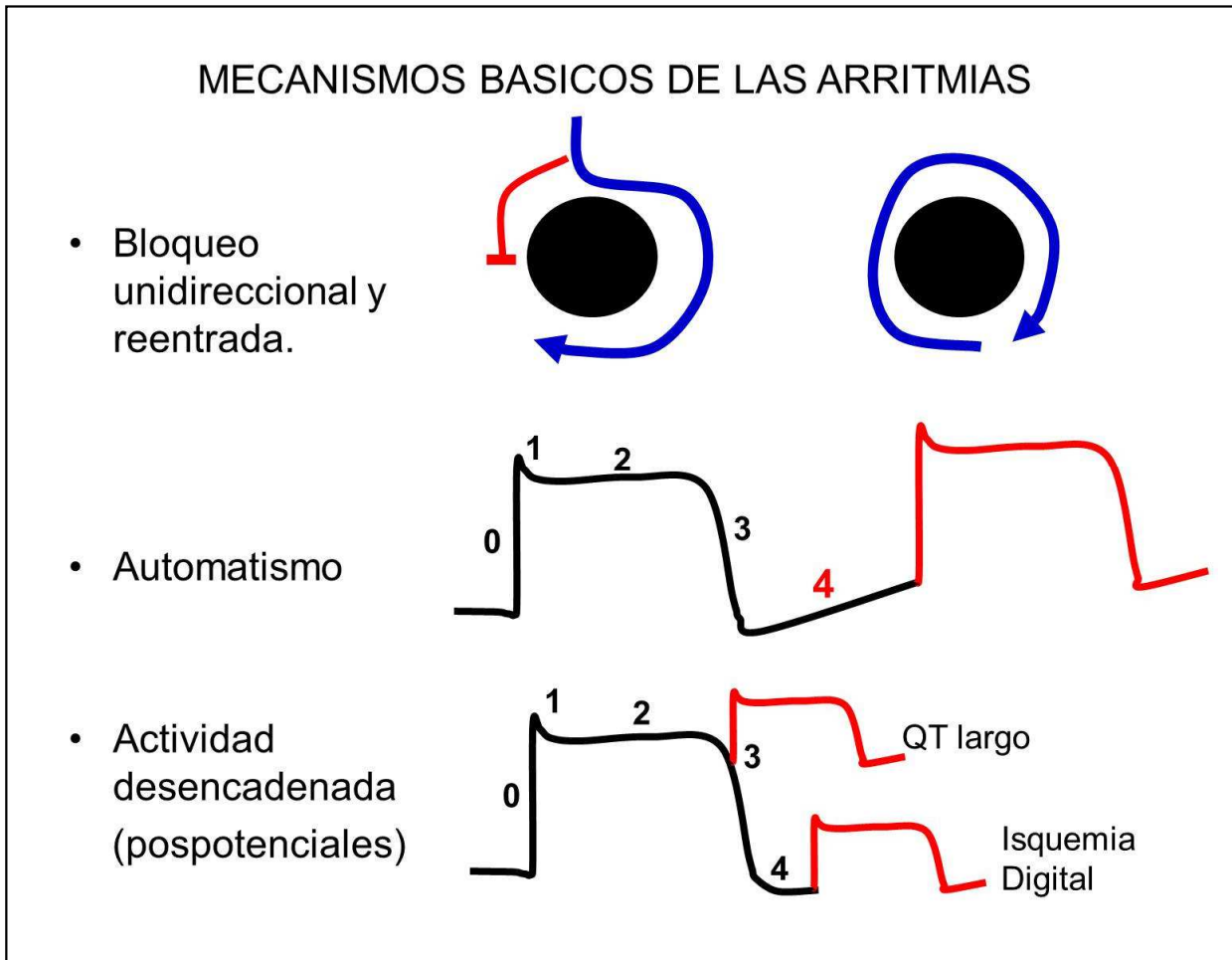


3) La simpatectomía<sup>38</sup> o el bloqueo farmacológico adrenérgico<sup>39</sup> disminuye la incidencia de arritmias.

4) La estimulación adrenérgica favorece la inducción de pospotenciales en las células de Purkinje isquémicas.<sup>40</sup>

**c) Fase II: Arritmias durante la isquemia subaguda (> 6 horas)**

La fase subaguda de la isquemia es menos relevante en relación con el objetivo de la presente tesis que explora los efectos de la isquemia aguda. Concisamente, las arritmias de esta fase parecen originarse por automatismo anormal o actividad desencadenada por pospotenciales en las fibras de Purkinje subendocárdicas que sobreviven en la zona del infarto. Esta fase dura de 6 a 72 h, con una actividad pico entre las 12 y las 24 h después de la oclusión arterial. Clínicamente, estas arritmias consisten en latidos ventriculares prematuros, ritmo idioventricular acelerado o episodios de taquicardia ventricular más rápida. Las arritmias de la fase II son muy sensibles a las catecolaminas. Respecto a la reentrada, está poco clara su participación en estas arritmias, aunque en el modelo canino es posible inducir arritmias por reentrada mediante estimulación eléctrica.<sup>15</sup> Finalmente, se producen arritmias ventriculares meses o años después de un infarto de miocardio (Fase crónica). En este caso, se forma una zona de escara con áreas de miocardio superviviente que forman el substrato para un mecanismo de reentrada. Esta fase tardía no se describe puesto que la presente tesis se centra en la isquemia aguda.

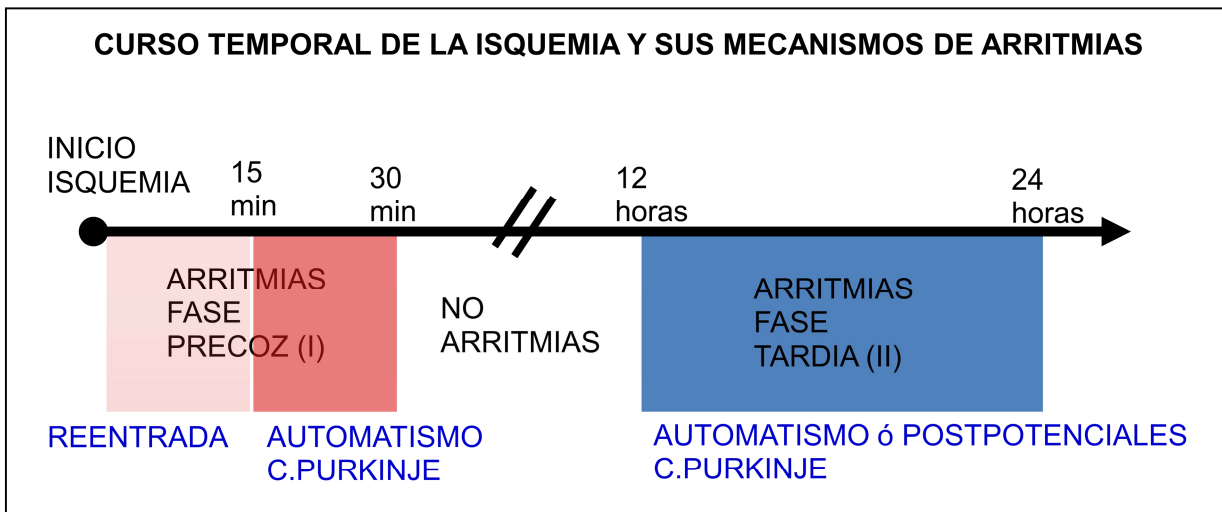


**Figura 19.** Los tres mecanismos básicos de las arritmias cardiacas son: la reentrada, el automatismo y la actividad desencadenada (pospotenciales). **A)** En el mecanismo de reentrada, un impulso eléctrico encuentra un obstáculo anatómico o funcional, que separa el frente de onda en dos frentes, uno de ellos se bloquea mientras el otro frente ejecuta el giro alrededor del obstáculo (circuito de reentrada). **B)** En el caso del mecanismo de automatismo, se generan nuevos impulsos eléctricos a través de despolarización en la fase 4 o diastólica. El origen puede ser una célula con

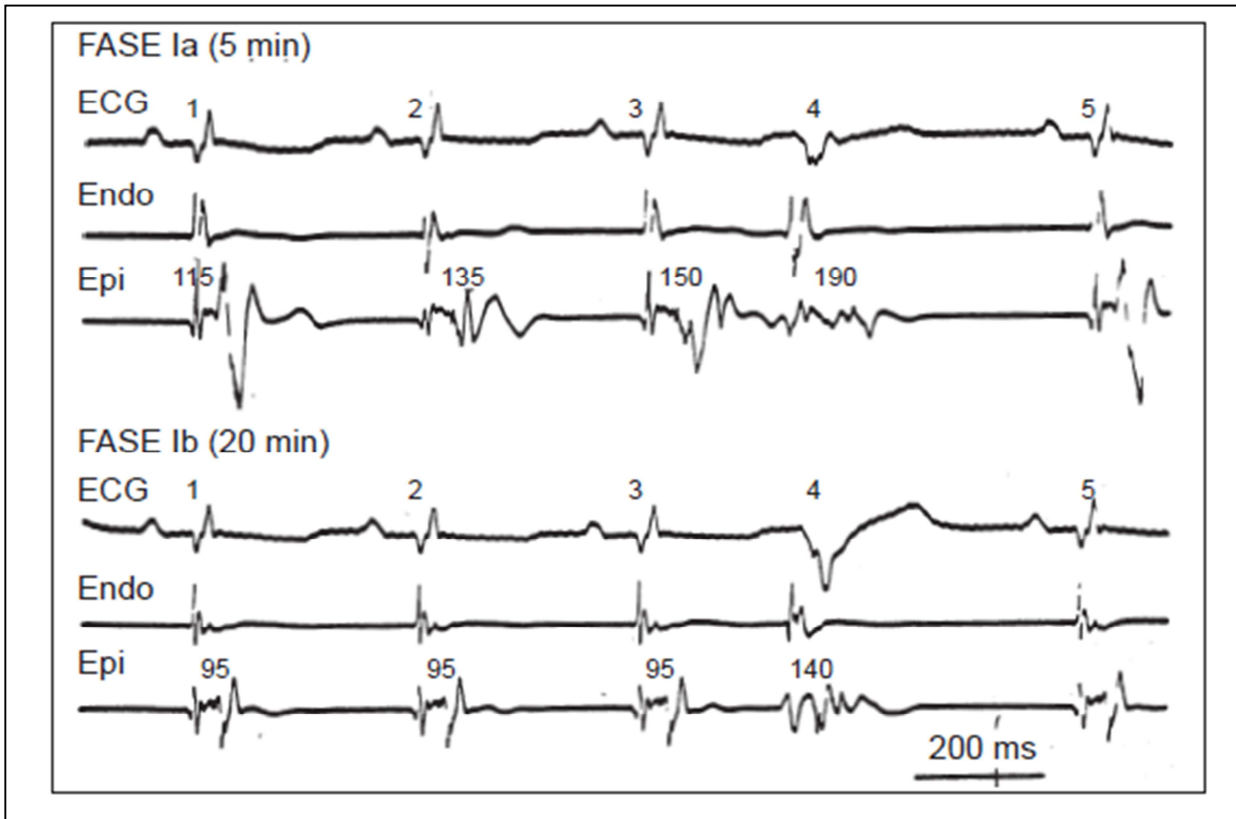


propiedades de marcapasos (automatismo normal) o una célula que no presenta habitualmente propiedades de marcapasos como el miocardio (automatismo anormal).

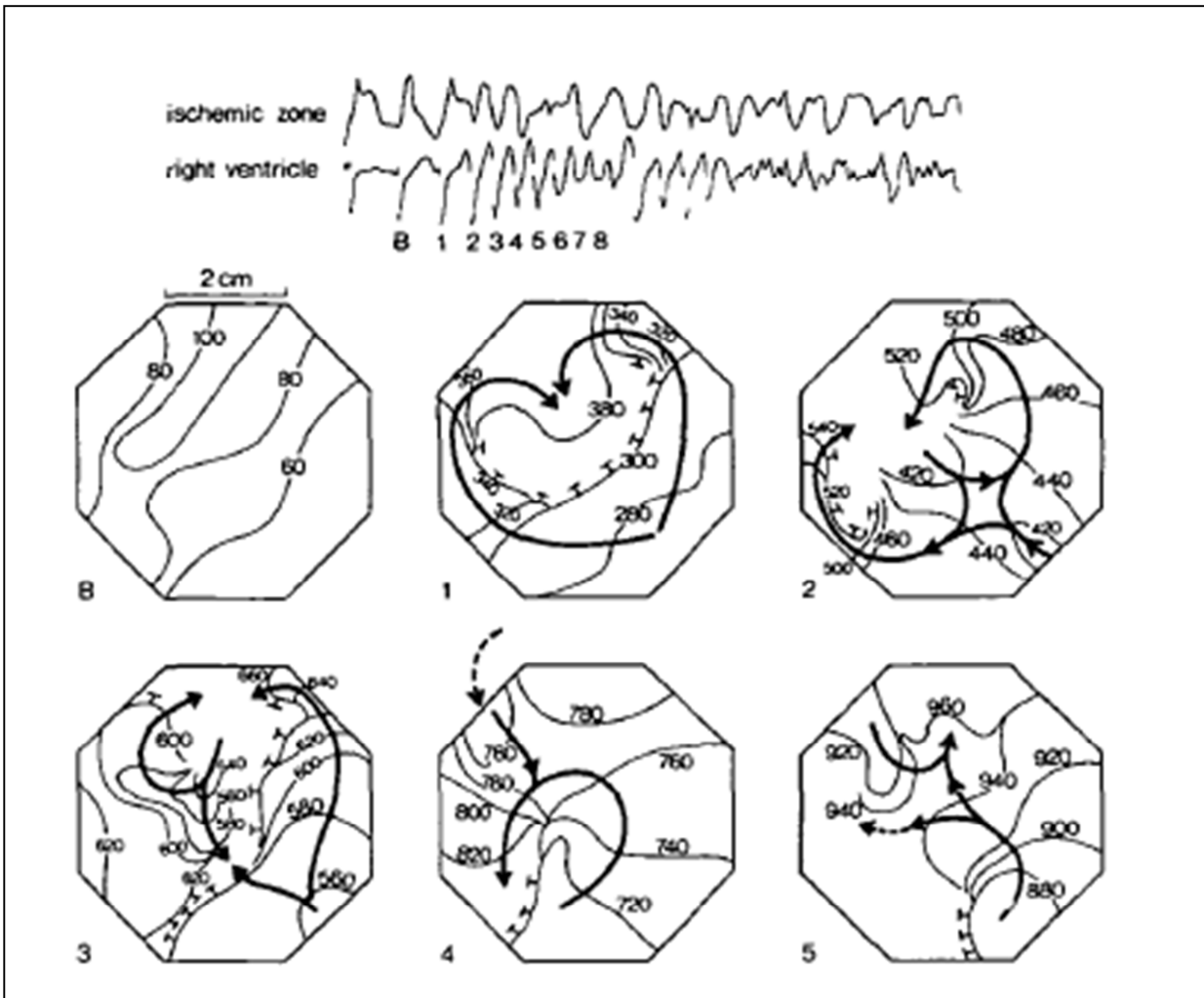
**C)** Finalmente, el mecanismo de actividad desencadenada se produce por pospotenciales. Estos pospotenciales son precedidos como condición ineludible por un potencial de acción generado de forma normal. La actividad desencadenada se genera por la liberación calcio al citosol (a través del canal  $I_{Ca-L}$  o desde el retículo sarcoplasmático), que es intercambiado por sodio a través del intercambiador de  $Na-Ca$ , dando lugar a pequeños potenciales. Estos pospotenciales pueden ocurrir en la fase 3 (característico del síndrome del QT largo) o en la fase 4 (típicamente en la isquemia o en la intoxicación digitálica). De todos estos tres mecanismos de arritmias, la reentrada constituye el más importante.



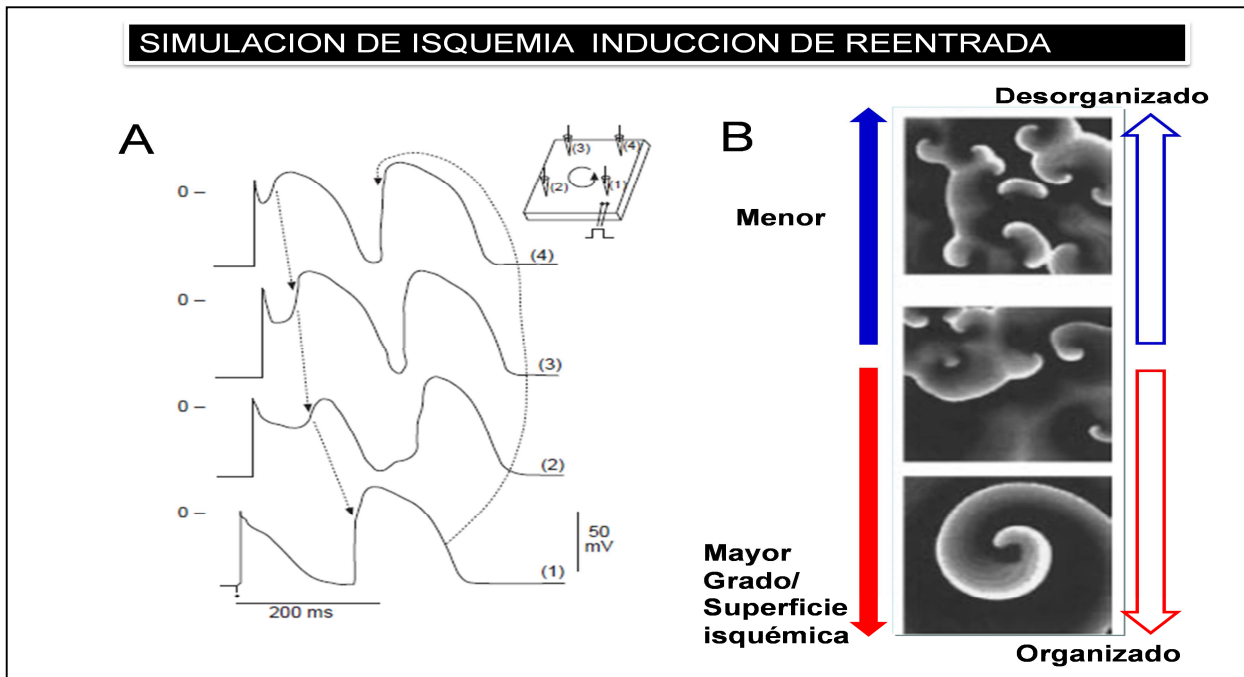
**Figura 20.** Las fases de la isquemia según la frecuencia de las arritmias ventriculares y sus mecanismos fundamentales (letras en azul). En la fase I, el mecanismo de reentrada es el más importante en los primeros 15 minutos de la isquemia. Entre los 15-30 minutos, otro mecanismo parece ser clave, el automatismo de las fibras de Purkinje. En la fase II tardía que sucede entre las 6 y las 72 horas del inicio, los mecanismos fundamentales son el automatismo o los pospotenciales de las células de Purkinje, aunque el mecanismo de reentrada ha sido documentado. Finalmente, de forma crónica (meses o años) se produce el remodelado de la escara con fenómenos de fibrosis y con tractos miocárdicos que sobreviven, que son el substrato de un mecanismo de reentrada. En la presente tesis, el periodo de interés sería únicamente la fase precoz. Se ha de recalcar que el modelo estudiado en esta tesis (los cultivos de miocitos en monocapa) carece de un sistema de conducción.



**Figura 21.** Inicio de extrasístoles ventriculares durante la fase precoz o primeros 15 minutos (IA) y la fase (IB) después de 20 minutos de isquemia. En el primero (IA) se observa actividad local continua sugerente de un mecanismo de reentrada como responsable. En cambio en la fase IB, se observa un extrasístole ventricular sin dicha actividad local continua.



**Figura 22.** El mapeo epicárdico del inicio de fibrilación ventricular durante la **isquemia**. Adaptado de Janse y col. 1980 en un modelo porcino y canino. El primer mapa (**B**) muestra una propagación normal. El mapa **1** muestra un extrasístole ventricular que se bloquea en la zona central conduciéndose alrededor de la línea de bloqueo. El mapa **2** muestra el inicio de la reentrada cuando la propagación completa un giro completo. Los mapas posteriores demuestran distintos patrones de activación que son cambiantes característicos de la fibrilación ventricular



**Figura 23. Los estudios de simulación matemática durante la isquemia aguda.**

**Panel A**, Lukas y Antzelevitch observaron que la isquemia simulada produce un acortamiento heterogéneo de los potenciales de acción en el subepicardio, así como una gran dispersión en la duración de la repolarización y en la presencia de la fase de meseta del potencial de acción. Las diferencias de potencial creadas pueden inducir una reexcitación local de aquellas en las que la fase de meseta ha sido abolida, originándose así un extrasístole por reentrada, que se puede perpetuar por el mismo mecanismo, dando lugar a una taquicardia. Este mecanismo implica reentrada intramural. **Panel B**, Xie y col. (2001) mostraron la inducción de reentrada y fibrilación en un modelo simulado de dos dimensiones, por tanto en ausencia de transmuralidad.





### **I.2.3.B. Los mecanismos generales de la fibrilación ventricular.**

Como veremos posteriormente, la factura de onda y el mecanismo de reentrada son piezas esenciales para explicar el inicio y el mantenimiento de las arritmias ventriculares.

La presente tesis estudiará un modelo experimental de cultivo de miocitos en monocapa. A diferencia del corazón intacto, este modelo presenta varias características:

1. Carece de las heterogeneidades propias del tejido cardiaco como los vasos coronarios o los cambios bruscos de orientación de fibras como sucede a nivel de los músculos papilares etc.
2. La ausencia de inervación del sistema nervioso autonómico (los receptores adrenérgicos y muscarínicos están presente, por lo responden a moduladores del sistema autonómico)
3. La ausencia de un sistema de conducción específico.
4. Es bidimensional (cultivo en monocapa).

Por tanto, este modelo permite analizar los fenómenos electrofisiológicos que inician y mantienen la fibrilación ventricular en un contexto libre de otros factores que puedan confundir los resultados.

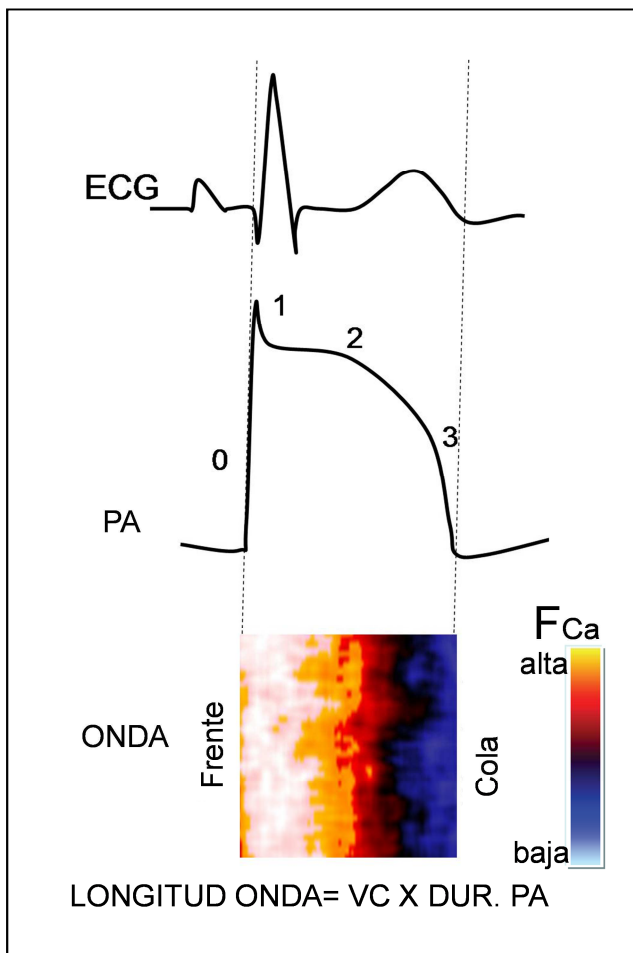


En conclusión, es un modelo ideal para estudiar el mecanismo de reentrada sin la interferencia del sistema de conducción (células de Purkinje) o de eventos que sucedan a nivel intramural (por debajo de la superficie epicárdica).

La activación eléctrica del corazón equivale a una onda eléctrica de propagación. En la **Película 1** se muestra una onda de propagación normal en un cultivo en monocapa. Esta onda eléctrica presenta un frente de propagación o activación que corresponde a la fase 0 del potencial de acción y una cola de repolarización que corresponde a la fase 3 del potencial de acción (**Figura 24**).

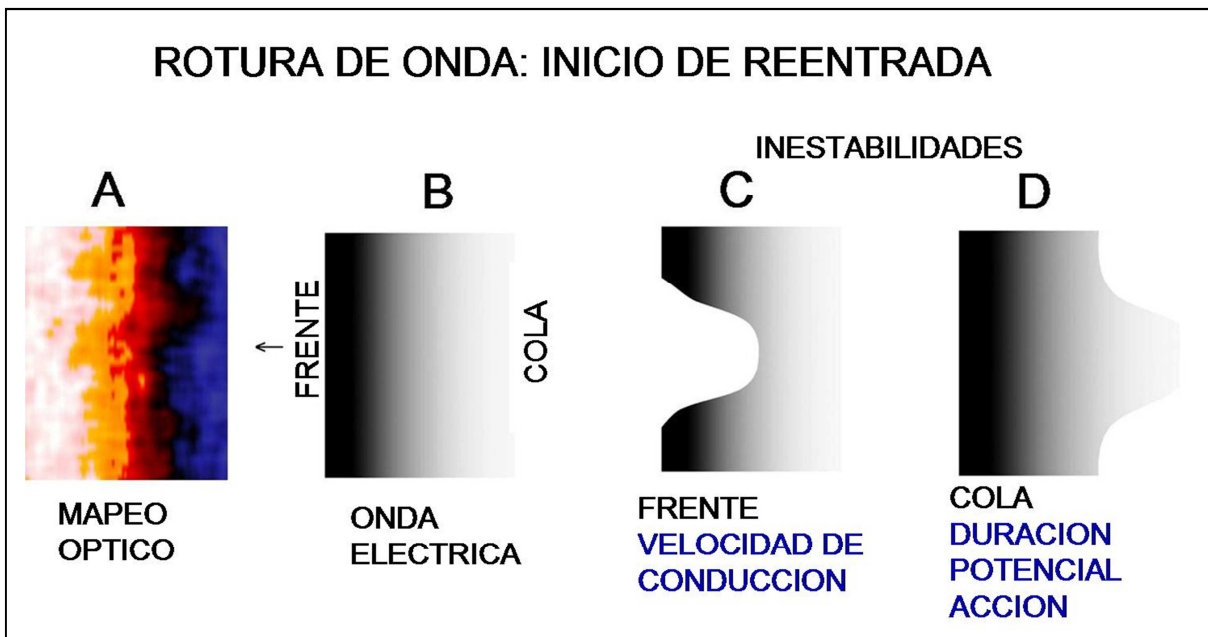
Como se ha citado, la rotura de la onda de propagación es crucial tanto para el inicio de reentrada como para el mantenimiento de la fibrilación ventricular. En la **figura 25** se muestran las dos zonas de potencial rotura de la onda de propagación eléctrica: 1) en el frente de onda, que depende de la velocidad de conducción eléctrica y 2) en la cola de refractariedad, que depende de la duración del potencial de acción.

Tanto los factores anatómicos como los funcionales pueden causar la rotura de onda eléctrica, al alterar las propiedades de velocidad de conducción del impulso y la capacidad de recuperación del tejido.<sup>41</sup>



**Figura 24.** La correlación temporal del electrocardiograma de superficie (ECG), el potencial de acción (PA) y la onda eléctrica de propagación registrada mediante la técnica de mapeo óptico (ONDA). El inicio del QRS en el ECG coincide con la despolarización del potencial de acción (fase 0) y con el frente de activación de la onda en el mapeo óptico (naranja brillante). El final de la onda T en el ECG coincide con la fase de repolarización (fase 3) en el potencial de acción y con la cola de recuperación del tejido en el mapeo óptico (color azul). La longitud de la onda eléctrica ( $\lambda$ ) se determina por la fórmula  $\lambda =$

velocidad de conducción (VC) x Duración del potencial de acción. El producto de estos dos factores, por tanto, establece la longitud de la onda eléctrica y en consecuencia su potencial rotura, que es crucial para el inicio del mecanismo de reentrada y la perpetración de la fibrilación ventricular.



**Figura 25. Los Mecanismos de la rotura de la onda eléctrica.** En el panel **A**, se muestra una imagen de la onda eléctrica mediante la técnica de mapeo óptico. En los paneles **B-D** se muestra un esquema de la onda eléctrica con un frente y una cola (**panel B**). La onda eléctrica se puede fragmentar en su frente de activación por inestabilidades acontecidas en las propiedades de conducción del impulso (disminución de la velocidad de conducción hasta que el impulso no se propaga). Por el contrario, la onda eléctrica se puede romper por prolongación de la cola de refractariedad, la cual chocaría con el frente de activación la siguiente onda de propagación (fenómeno de cabeza-cola). Este esquema se ha adaptado un previo realizado por Weiss y col, 2005.



Gracias a los estudios de simulación matemática y de mapeo óptico en la experimentación animal, hoy se conocen con mayor profundidad los mecanismos de inicio y mantenimiento de la fibrilación ventricular.<sup>41, 42</sup> La reentrada se produce cuando la propagación de la onda eléctrica se bloquea localmente y conduce alrededor de la línea de bloqueo<sup>43</sup> formando un circuito de reentrada o un rotor (**Película 2**). La zona de bloqueo puede corresponder a un obstáculo anatómico (reentrada anatómica) o una zona de bloqueo funcional (reentrada funcional). La fibrilación ocurre cuando las ondas que emanan del rotor inicial experimentan en su propagación nuevos bloqueos locales de la conducción, lo que puede generar nuevos rotores.

Existen tanto factores anatómicos como factores dinámicos que están implicados en el inicio y mantenimiento de la fibrilación ventricular. Los factores anatómicos incluyen áreas de fibrosis, cambios bruscos de orientación en las fibras musculares, presencia de vasos coronarios, etc. Los factores dinámicos o funcionales incluyen las propiedades dinámicas del voltaje de membrana y del ciclo del calcio intracelular. La principal ventaja del modelo de cultivo en monocapa es que carece de heterogeneidades anatómicas macroscópicas significativas.



En el contexto clínico, se han identificado dos momentos claves en el entendimiento de las arritmias ventriculares: el inicio y su posterior mantenimiento. En primer lugar, existe un elemento iniciador, usualmente un extrasístole ventricular. En un principio se produce una taquicardia ventricular, que posteriormente degenera en una fibrilación ventricular (**Figura 26**). En un segundo lugar, esta arritmia se perpetúa. En la **figura 27** se muestra un caso raro de fibrilación ventricular transitoria.<sup>42</sup>

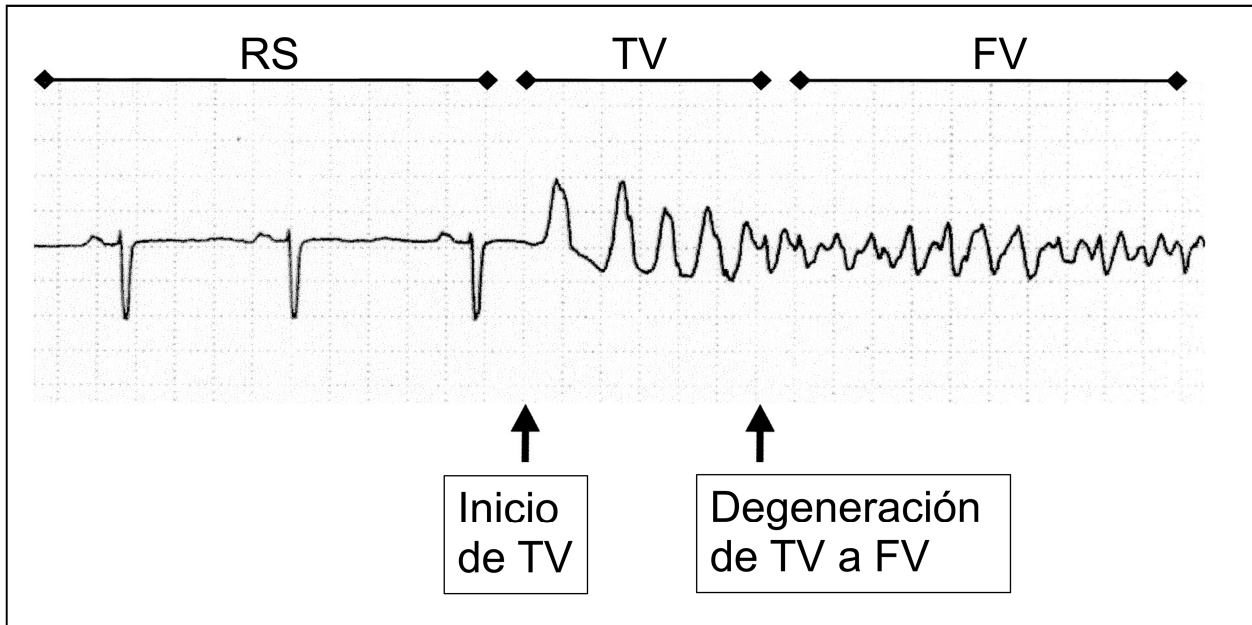
A partir de estos hallazgos clínicos, se planteó la cuestión de qué elementos producían la degeneración en fibrilación ventricular y su mantenimiento. Se han elaborado diferentes teorías, que como veremos confluyen en varios puntos de acuerdo.

La hipótesis de las múltiples ondas fue el primer intento para explicar el mecanismo de la fibrilación ventricular (**Figura 28A, Película 3**). En esencia, esta hipótesis definía la fibrilación ventricular como una sucesión de ondas de activación. Moe y col.<sup>44</sup> usaron un modelo cardiaco de simulación de dos dimensiones. Los autores introdujeron en el modelo distintos periodos refractarios (es decir, heterogeneidad en las propiedades electrofisiológicas) y consiguieron reproducir un patrón de tipo fibrilatorio que era sostenido. Allesie y col<sup>45</sup> aportaron una evidencia experimental directa de un patrón con múltiples ondas migratorias al mapear una aurícula durante fibrilación. Posteriormente, se han observado hallazgos similares al estudiar ventrículos en experimentación animal.<sup>42</sup> En resumen, se observó que la rotura de la onda de propagación no solo era crítica para el inicio de la fibrilación sino que este fenómeno de fragmentación de las ondas continuaba ocurriendo durante la



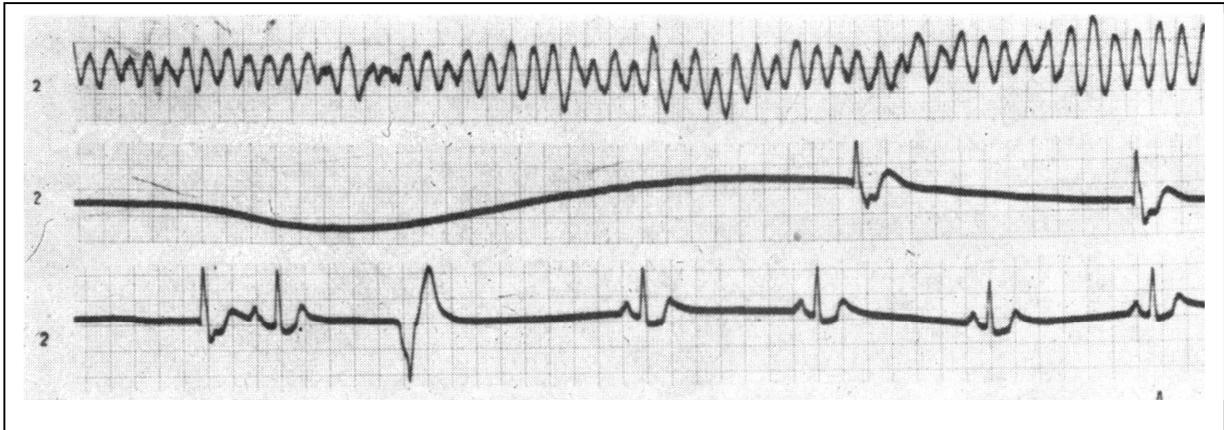
fibrilación. Las ondas se fragmentaban o desaparecían y otras nuevas emergían. La llamada *hipótesis de las múltiples ondas* afirmaba que la rotura de onda era lo que mantenía la fibrilación ventricular. Cuando la rotura de la onda se producía en un obstáculo anatómico se denomina reentrada anatómica. Allessie y col,<sup>46</sup> documentaron la rotura de onda y un mecanismo de reentrada en ausencia de un obstáculo anatómico, denominada reentrada funcional (“leading circle”). Estos puntos de rotura de la onda, en donde la actividad eléctrica giraba alrededor, posteriormente fueron identificados como unas ondas de espiral o rotores.<sup>47</sup> Surgió entonces *la hipótesis del rotor madre*, que argumentaba que uno o varios rotores relativamente estables sostendrían la fibrilación (**Figura 28B, Película 4**).

Hoy es conocido que la misma fibrilación y el mismo paciente puede presentar distintos grados de organización, con fases más desordenadas donde predomina un patrón de múltiples ondas con fragmentación, y otras fases más organizadas (especialmente cuando la isquemia se instaura o en presencia de heterogeneidad anatómica importante). En estas fases “organizadas” predominan los rotores con rotura de la onda a nivel periférico. Obsérvese la **figura 28C**, de un paciente que durante un registro de Holter experimenta una fibrilación ventricular, cuyo patrón tiende a organizarse conforme la isquemia se instaura (se torna menos complejo, con menos variación en la línea de base). Los datos experimentales demuestran que al inicio de la fibrilación ventricular existe un patrón con múltiples ondas migratorias y con múltiples rotores cambiantes.

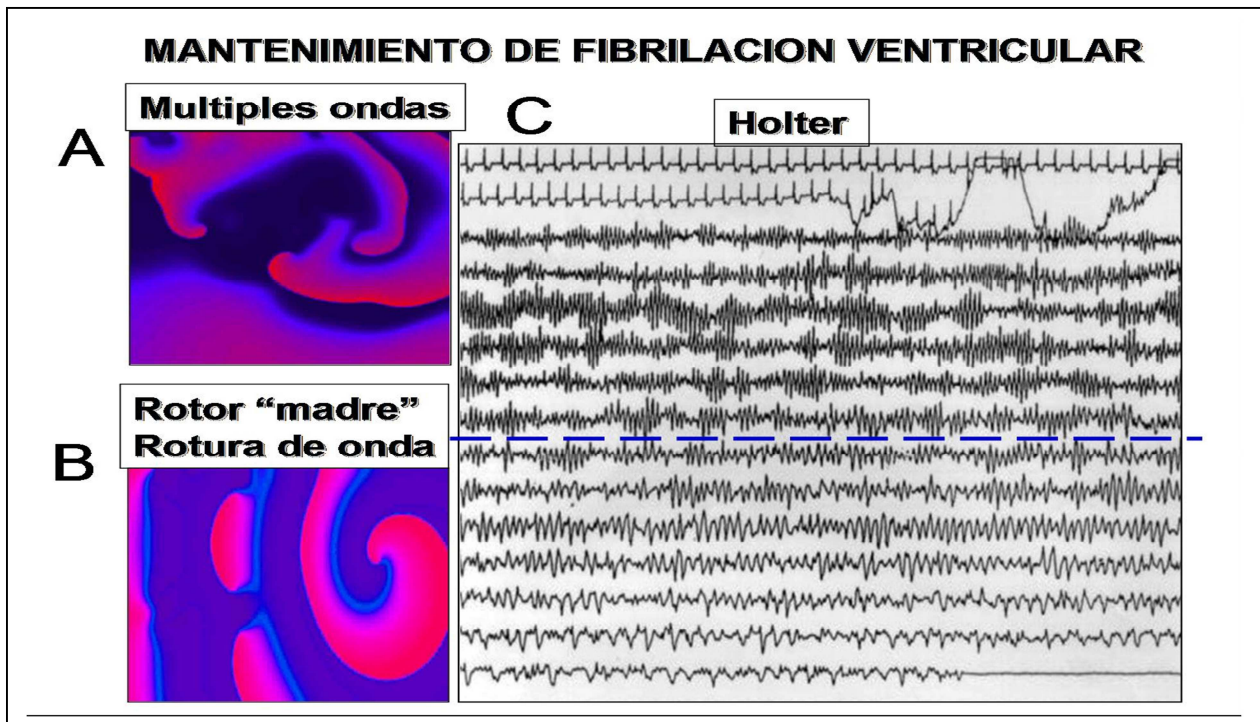


**Figura 26. El inicio de fibrilación ventricular.** Un extrasístole ventricular que da lugar a una taquicardia ventricular (Fase de Inicio). Posteriormente, la taquicardia ventricular degenera en un ritmo de aspecto desorganizado e irregular característico de fibrilación ventricular (Fase de degeneración).





**Figura 27. Un ejemplo de una fibrilación ventricular transitoria.** La imagen muestra un raro caso que ha sido descrito en la literatura. En el registro se observa una fibrilación ventricular que de forma espontánea se autolimita y tras una asistolia y un escape nodal, el paciente pasa a ritmo sinusal.



**Figura 28.** Los diferentes patrones fibrilatorios y su curso temporal. En los paneles **A-B** se muestran imágenes de una simulación matemática durante la fibrilación ventricular. En el panel A, se observa el patrón de múltiples ondas que se fragmentan que es consistente con la teoría de las múltiples ondas (**Películas 4-5**). Este modelo puede dar lugar a patrones electrocardiográficos mas desorganizados. En el panel B, se visualiza un rotor “madre” que presenta una mayor frecuencia de excitación y conduce hacia la zona periférica donde se produce un fallo de la conducción o fractura de la onda, compatible con la teoría del rotor madre. En el Holter (**panel C**) de un paciente durante un episodio de muerte súbita puede observarse un patrón más desorganizado inicialmente y posteriormente se va organizando conforme el tiempo de isquemia avanza.



En cambio cuando la isquemia se consolida se observa un menor número de rotores por lo que el patrón electrocardiográfico es menos desorganizado.<sup>48 41</sup> En resumen, ambas teorías (hipótesis de múltiples ondas e hipótesis de rotor madre) son complementarias y han permitido entender el mecanismo de mantenimiento de la fibrilación ventricular. A pesar de las diferentes polémicas en los mecanismos, existe acuerdo en que tanto los circuitos de reentrada (rotores) como las zonas de fractura de onda son esenciales para el inicio y el mantenimiento de la fibrilación ventricular.<sup>41</sup>

Otra polémica que se ha mantenido por varias décadas fue si la presencia de heterogeneidad anatómica era un requisito para la fibrilación ventricular. La heterogeneidad anatómica está presente tanto el corazón con cardiopatía estructural (fibrosis, etc.) como en el corazón “sano” (anisotropía, cambios bruscos de orientación en la fibras). Los modelos de simulación han demostrado la inducción de fibrilación ventricular incluso en ausencia total de heterogeneidad anatómica, debido a las propiedades funcionales de la velocidad de conducción y de la duración del potencial de acción, llamadas propiedades de restitución.<sup>49,42</sup> Posteriormente, se descubrió la importancia de las propiedades funcionales del ciclo del calcio intracelular.<sup>50</sup> Estos factores funcionales parecen actuar de forma sinérgica, con los factores anatómicos, para inducir y mantener la fibrilación ventricular. El estudio de los factores funcionales es atractivo para el desarrollo de nuevas terapias y son objeto de investigación en la actualidad.<sup>41</sup>



En consonancia con los hallazgos experimentales, la práctica clínica constata que los corazones enfermos presentan mayor susceptibilidad para fibrilar. Con todo, es posible inducir una fibrilación ventricular en un corazón aparentemente sano especialmente si se emplea un protocolo de estimulación “agresivo”, que incluya 3 o más extraestímulos.

### **I.2.3.C. La fibrilación ventricular durante la isquemia regional.**

En cuanto al contexto de la isquemia, existen algunas particularidades en lo referente a los mecanismos de rotura de onda y formación de rotores. En primer lugar, los efectos de la isquemia han sido estudiados en los modelos de isquemia global (todo el tejido miocárdico es sometido a isquemia) o regional (una zona del tejido es sometida a isquemia). En el modelo de isquemia regional, se identifican tres zonas: la zona isquémica, otra zona que queda preservada (zona no isquémica o sana) y una zona de transición entre ambas (zona borde). Centraremos nuestra atención en los modelos de tipo regional como es el modelo que presentamos en la presenta tesis. Como se ha descrito previamente, los dos fenómenos fundamentales durante la fibrilación ventricular son: la formación de rotores y la ocurrencia de rotura de la onda de propagación.

En síntesis se pueden formular dos preguntas esenciales sobre la fibrilación ventricular durante la isquemia regional:



1. ¿En qué zona se localizan los rotores (o áreas de alta frecuencia)?.

2. ¿Dónde se producen las roturas de la onda?

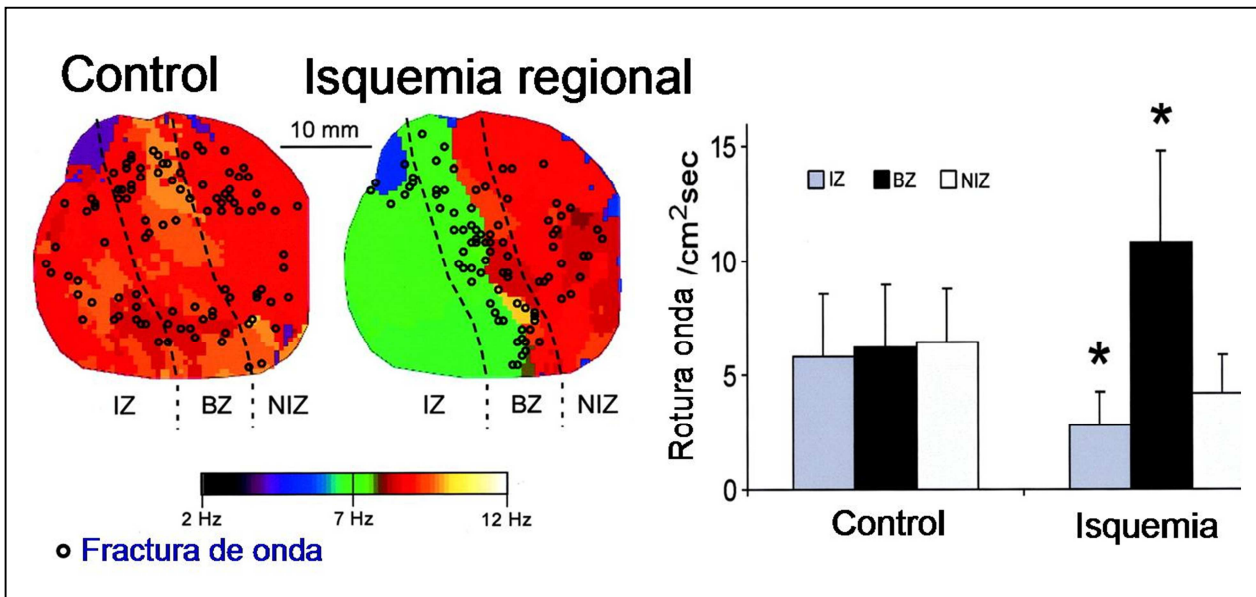
En los estudios previos los hallazgos han sido contradictorios. Los estudios de simulación<sup>31</sup> han demostrado zonas de alta frecuencia (“rotors”) en la zona isquémica, mientras que los estudios experimentales han encontrado una disminución en la frecuencia de activación en la zona isquémica.<sup>48,51,52</sup> Además, los distintos estudios han divergido en la localización principal de la fractura de onda: en la zona isquémica,<sup>26, 48</sup> en la zona de transición<sup>48,51,52</sup> o en la zona sana.<sup>31,48</sup> En la **figura 29** se muestran los hallazgos de uno de los estudios más representativos de la fibrilación ventricular en un modelo experimental de isquemia regional. Existen múltiples causas que podrían explicar estas diferencias tan significativas sobre los mecanismos de mantenimiento de la fibrilación ventricular en los diferentes estudios. Por ejemplo, el empleo de diferentes especies animales o distinta metodología de inducción de isquemia. La complejidad tridimensional de dichos modelos dificulta la interpretación y el análisis de las imágenes obtenidas, como ilustra la **Figura 30 (Película 5)**. Además, en los modelos experimentales de 3D se realiza el mapeo de la superficie epicárdica, sin obtener información de los eventos que suceden en la profundidad de la pared miocárdica, es decir intramurales (**Figura 31**).

Los estudios de mapeo óptico en su mayoría se han limitado a la superficie epicárdica, careciendo de información sobre los eventos que suceden a nivel transmural. Otros trabajos como el de Valderrábano y col.<sup>53,54</sup> han realizado el mapeo



de la pared ventricular, permitiendo demostrar que existen fenómenos intramurales importantes como el establecimiento de rotores en la inserción del músculo papilar o en otras áreas con cambios bruscos de la orientación fibrilar.

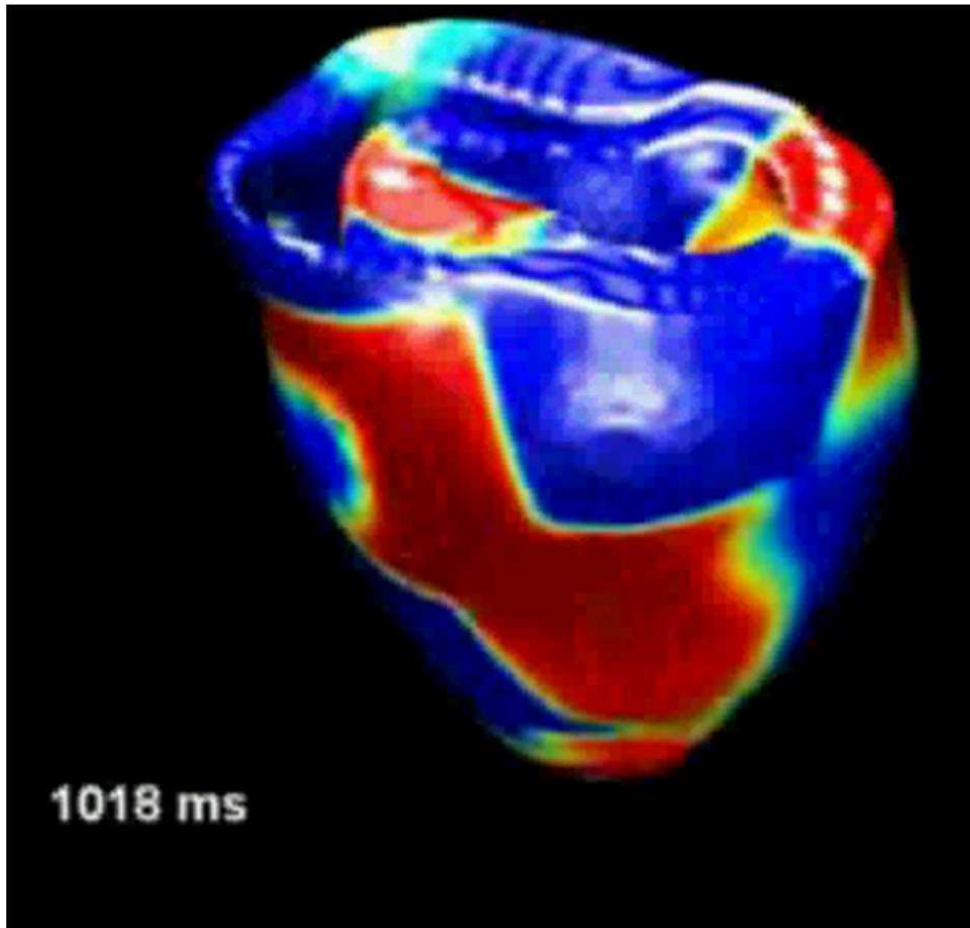
Dichos eventos, que ocurren bajo la superficie epicárdica, no son registrados en los modelos experimentales de mapeo óptico epicárdicos. Por estos motivos, nos proponemos estudiar los efectos de la isquemia y la reperfusión a nivel de la onda de propagación eléctrica en un modelo bidimensional de miocitos cardíacos.



**Figura 29.** Un modelo experimental de isquemia regional por oclusión coronaria.

Adaptado de Zaitsev y colaboradores, de un modelo experimental de isquemia regional, que implica la sutura de una arteria epicárdica. En este caso, se estudia el efecto de la isquemia regional en la fibrilación ventricular. En el control, se induce fibrilación ventricular en ausencia de isquemia y los puntos circulares representan áreas de fractura de onda. En este modelo de isquemia regional, se induce primero fibrilación ventricular y después se provoca la isquemia regional, para evaluar los efectos de la misma. Observaron que la frecuencia de activación, una medida indirecta de rotores, disminuía en la zona isquémica (IZ). Como muestra el gráfico, las fracturas de la onda se localizaron fundamentalmente en la zona de transición (BZ) entre la zona isquémica y la no isquémica (NIZ).

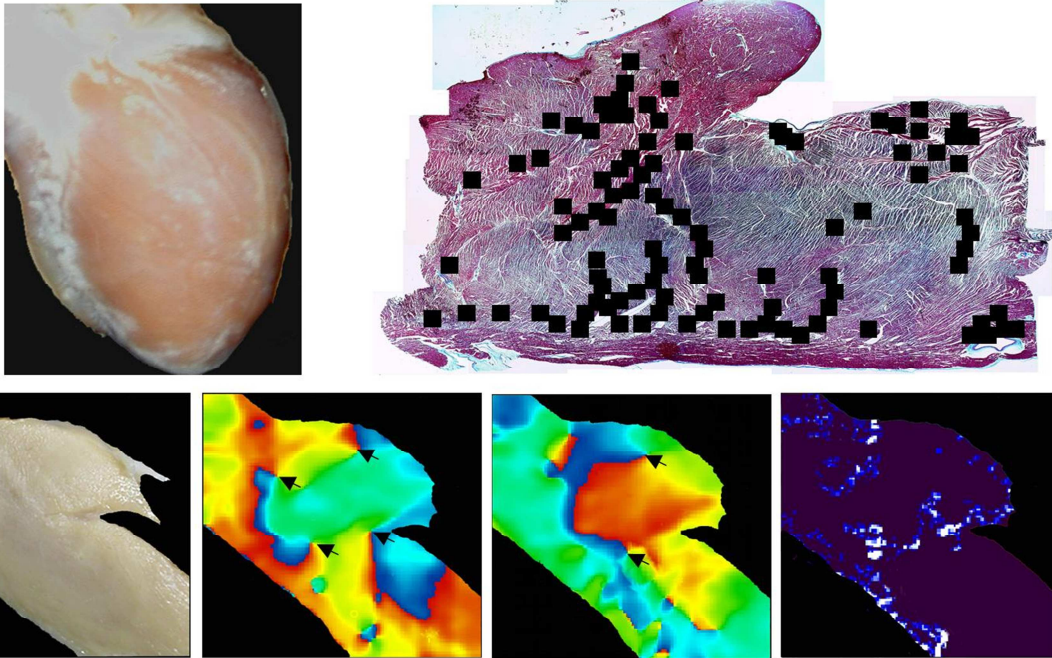
## COMPLEJIDAD DE UNA ESTRUCTURA 3D



**Figura 30.** Imagen de un modelo de simulación en 3 dimensiones. El frente de onda se representa en color rojo. La ilustración demuestra la complejidad que conlleva la interpretación de los eventos que suceden durante la fibrilación ventricular en un modelo de 3D. Ver **película 6**.



### LOCALIZACION INTRAMURAL DE ROTURA DE ONDA Y REENTRADA



**Figura 31.** La localización intramural de rotores. En el panel superior izquierdo se muestra el corazón intacto de un conejo y su superficie epicárdica. En el panel superior derecho, se muestra un corte histológico con tinción inmunohistoquímica para resaltar la orientación fibrilar y los cuadros negros representan las áreas de fractura de onda, que suceden mayoritariamente en zonas intramurales. En los paneles inferiores, se muestra de izquierda a derecha, un corte histológico de la pieza anatómica estudiada, imágenes que muestran las singularidades de fase (es decir, localizan las zonas de rotores o fractura de onda, las flechas negras indican donde el color rojo y el azul se encuentran) y una imagen con la localización de rotores en azul. Cortesía del Dr. Valderrábano.



## II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es validar un nuevo método experimental de isquemia y reperfusión aguda, utilizando el cultivo en monocapa de miocitos de rata neonata, para generar un modelo bidimensional de isquemia regional. La ventaja del cultivo de miocitos en monocapa, con respecto a los modelos de corazón intacto o en 3D, es que carece de la complejidad de éstos, que poseen heterogeneidades macroscópicas importantes como vasos coronarios, cambios de orientación en las fibras musculares o presencia de fibrosis. Además, el modelo en monocapa elimina la participación de eventos por debajo de la superficie epicárdica o intramurales.

La hipótesis central del estudio es demostrar que el método de isquemia en los cultivos en monocapa reproduce las consecuencias electrofisiológicas típicas de la isquemia aguda, responsables del inicio de arritmias por reentrada durante la isquemia y reperfusión.

De forma concreta, se establecen los siguientes objetivos específicos:

**Hipótesis #1:** *El método de inducción de isquemia regional en cultivos en monocapa propuesto por Pitts et col.<sup>55</sup> podría recapitular los principales fenómenos electrofisiológicos que acontecen durante la isquemia y la reperfusión.*



**Objetivo #1:** Estudiar los efectos de este método en las propiedades electrofisiológicas de los cultivos de miocitos en la zona isquémica y en la zona sana: la duración del potencial de acción, el calcio citosólico, la velocidad de conducción y la longitud de la onda eléctrica. Además, se estudiarán los efectos electrofisiológicos durante la reperfusión.

**Hipótesis #2:** La zona de transición entre la zona isquémica y la zona sana, es decir el área peri-isquémica o zona borde, sería crucial en el inicio y mantenimiento de arritmias durante las fases de isquemia y reperfusión agudas.

**Objetivo #2:** Estudiar la localización de la fractura de onda que inicia y mantiene las arritmias por reentrada mediante la técnica de mapeo óptico del voltaje de membrana y de los cambios en el calcio citosólico. Se realizará un estudio de los patrones de activación con una secuencia temporal al inicio de la isquemia, al 1 minuto y posteriormente cada 5 minutos.

**Hipótesis #3:** Los cambios funcionales en las uniones gap que han sido descritos durante la isquemia, como son el aumento de la forma no fosforilada de la conexina 43 (forma no funcional) deberían revertir durante la reperfusión. Es esperable que los cambios en la velocidad de conducción se produzcan paralelamente a los cambios en la forma no fosforilada de la conexina 43.



**Objetivo #3:** Correlacionar los cambios en la fosforilación de la conexina 43 (por técnicas de inmunohistoquímica) con los cambios en las propiedades en la velocidad de conducción (por la técnica de mapeo óptico).



### III. METODOS

#### III.A. La preparación de los cultivos en monocapa de miocitos de ventrículo de rata neonata (MVRN)

Los cultivos en monocapa de miocitos de ventrículo de rata neonata (MVRN) se prepararon como se ha descrito en los estudios previos (ver **Figuras 32-33**).<sup>56,57</sup> Los MVRN se situaron en una superficie de 22x22 mm de plástico de tipo PVC (PGC Scientifics, Frederick, MD EEUU), llamada preparación "coverslip". Los corazones fueron extraídos de ratas neonatas del tipo Sprague-Dawley de 2-3 días de edad, y fueron entonces sometidos a enzimas de digestión con colagenasa (0.02%, Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ USA) y pancreatina (0.06%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO EEUU). Los miocitos se aislaron y separaron de otros tipos celulares mediante el uso de un gradiente de Percoll (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) y se cultivaron en una densidad de  $10^6$  cells/mm<sup>3</sup> por preparación. Las preparaciones fueron cultivadas durante 4-5 días, realizándose cambios del medio de cultivo cada 24-48 horas. Las preparaciones (n=27) se visualizaron con microscopio de contraste de fase para asegurar la confluencia de los cultivos y se incluyeron los cultivos que exhibieron una propagación eléctrica homogénea. Entonces, los cultivos en monocapa fueron perfundidos con una solución de Tyrode (contiene electrolitos y nutrientes) oxigenada a temperatura de 37°C. Las preparaciones fueron estimuladas



eléctricamente con una frecuencia de 2Hz (estímulo unipolar con una salida de 10 V en el borde del cultivo) usando un estimulador tipo Grass (Astro-Med Inc, West Warwick, RI).

### **III. B. El método de mapeo óptico y el análisis de la señal.**

En la **figura 32** se ilustra el proceso. Los cultivos en monocapa fueron teñidos mediante la inmersión de los mismos en una solución oxigenada de tipo “Tyrode” (en mmol/L: 136 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 0.33 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, and 10 glucosa; pH 7.3) que contiene el colorante fluorescente para el calcio intracelular llamado Rhod-2AM. Esta tinción tardaba unos 40 minutos aproximadamente (concentración de 5 µmol/L) y precisaba de añadir un agente que facilitara la entrada del colorante en el miocito, Pluronic al 0.016% (Molecular Probes, Eugene, Ore).

Para detectar la señal de voltaje de membrana, las preparaciones se tiñieron con el colorante fluorescente RH-237 durante 5 minutos (concentración de 5 µmol/L). A continuación, los colorantes de las preparaciones se iluminaron con 2 fuentes de luz (cada una de ellas, disponía de 4 luces de tipo diodo (Luxeon, Ontario, Canada). Esta luz fue filtrada previamente con un filtro específico para una longitud de onda de 540±20 nm, que correspondía al rango visual del color verde. En reacción a esta luz, las preparaciones, entonces emitían una luz fluorescente que era separada en dos haces de luz por un filtro de tipo espejo, con un punto de corte de 630 nm de longitud



de onda. Estos dos haces de luz fueron orientados hacia dos cámaras ultrasensibles separadas de tipo CCD (Photometrics Cascade 128+; 128x128 píxeles), una cámara para detectar voltaje y otra cámara para detectar calcio intracelular.

Se realizó el mapeo simultáneo del voltaje y del calcio intracelular en 11 preparaciones. Estas cámaras poseían sus respectivos filtros (punto de corte de 715 nm (para RH-237) y un punto de corte de 585 nm para (Rhod-2). Se adquirió un fotograma cada 0.6-5 ms. Las señales obtenidas fueron digitalizadas con una precisión de 16 bits y procesados “off-line” como previamente se describe.<sup>56</sup>

Sucintamente, la señal recogida por las cámaras fue sometida a:

- 1) un filtro espacial con agrupación de 2x2 píxeles.
- 2) un filtro temporal que realiza la mediana de los últimos 5 fotogramas.
- 3) un ajuste a una curva polinómica para eliminar el cambio de la línea de base debido al lavado del colorante.
- 4) la normalización en un rango de señal.

Después de procesar y filtrar la señal, se consiguió una resolución espacial de 64x64, que corresponde a un tamaño de pixel de 340x340  $\mu\text{m}$ , con una resolución temporal de 15 a 25 ms (3 a 5 ms por fotograma x5).

En algunos experimentos (n=6), la resolución temporal se optimizó aplicando solo un filtro espacial de 4x4. Esto permitió una resolución espacial de 32x32, que corresponde a un tamaño de píxel de 680x680  $\mu\text{m}$ , con una resolución temporal máxima de 0.6 ms por fotograma. Ambos métodos mostraron resultados similares. Los

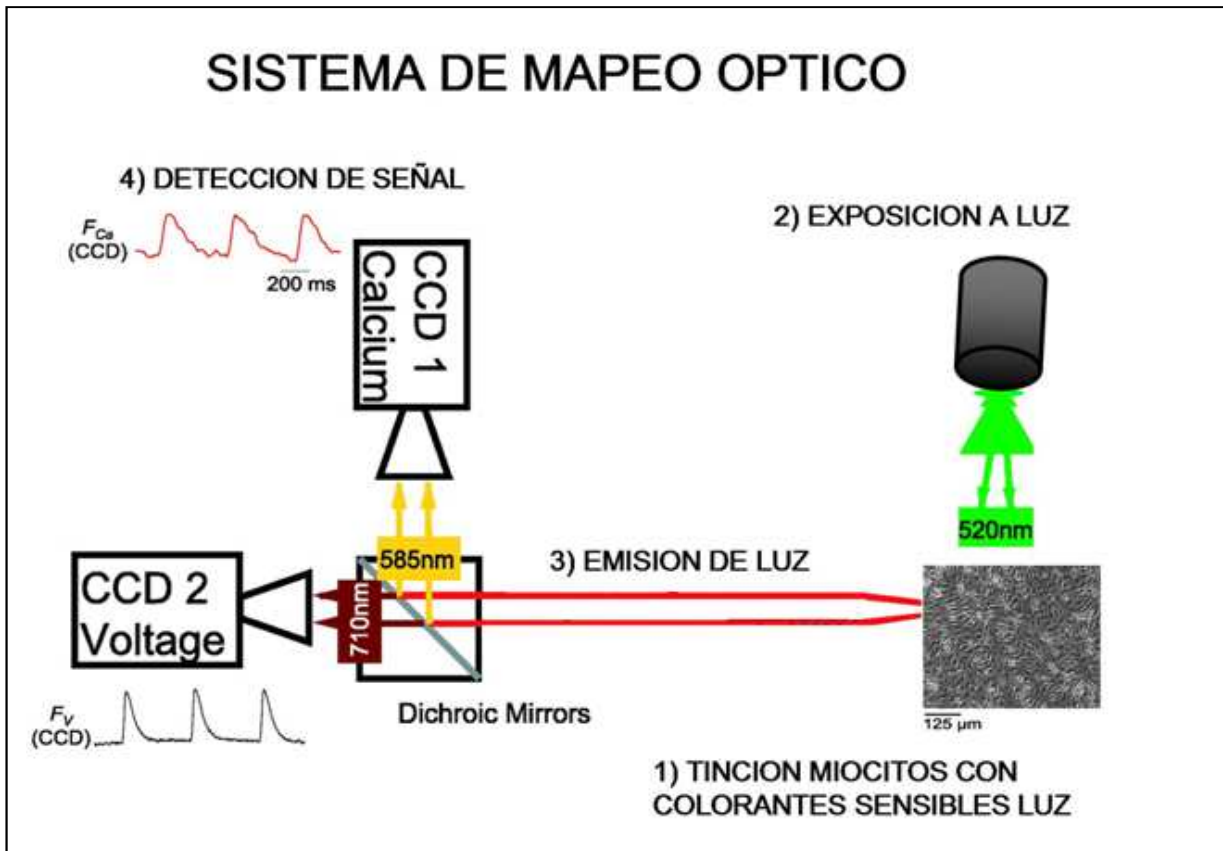


mapas de propagación con escala de color y la velocidad de conducción fueron obtenidos como se ha descrito en los estudios previos.<sup>56</sup>

Brevemente, la velocidad de conducción se midió utilizando un software especialmente diseñado para ello, que detecta la diferencia en el tiempo de activación entre dos puntos y la distancia entre los mismos. La duración del potencial de acción fue medida como el tiempo desde el inicio de la activación al punto de corte que corresponde al 80% de la repolarización. La longitud de la onda de propagación fue medida como la distancia desde el frente de activación al punto de corte que corresponde al 80 % de la repolarización.

Mediante un software diseñado para este propósito, se midieron tanto la duración de los cambios del calcio intracelular como la amplitud del potencial de acción. **La figura 33** muestra un mapa de propagación típico y las señales de voltaje y de calcio.





**Figura 32.** Esquema del sistema de mapeo óptico simultáneo de voltaje y de calcio intracelular en nuestro laboratorio. Se muestran los pasos necesarios de forma sencilla:

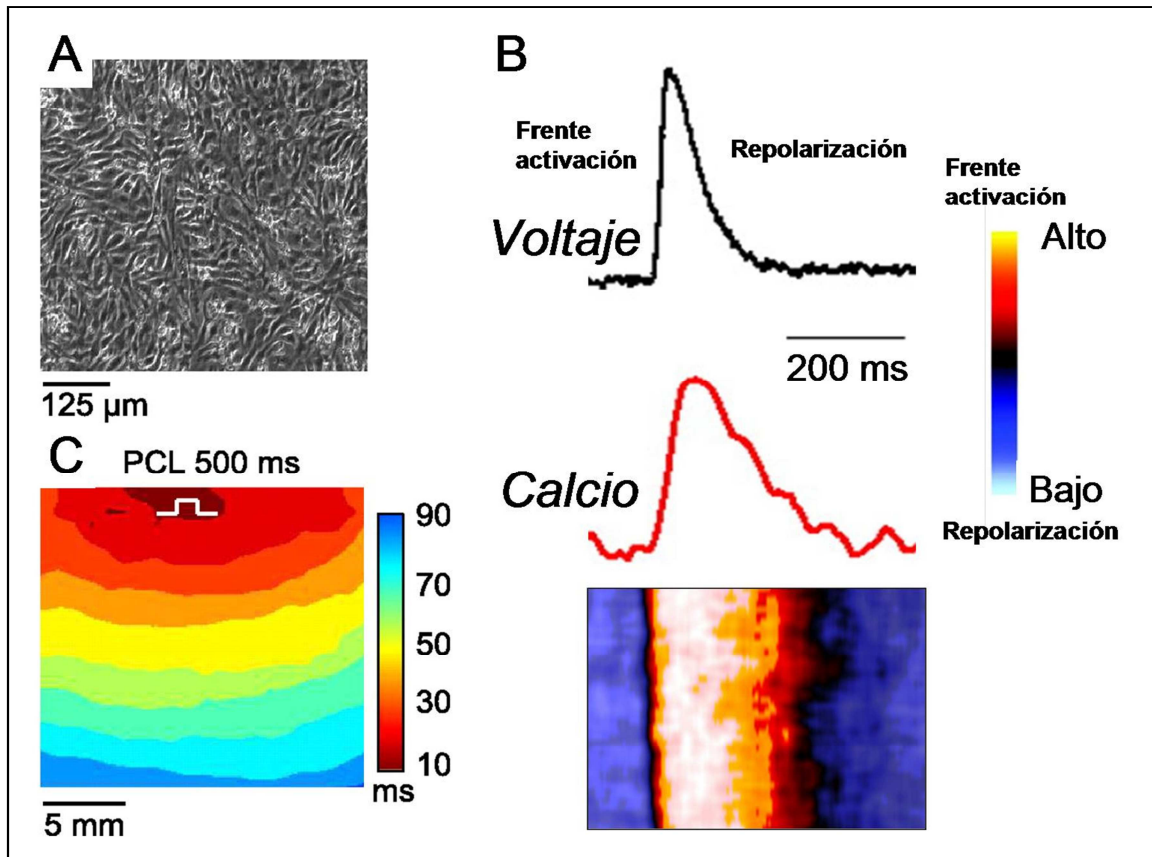
1) Se realiza la tinción de las preparaciones con los colorantes fotosensible. En el caso de la señal de calcio, se usa el colorante Rhod-2. Para detectar los cambios de voltaje de la membrana, se emplea el colorante Rh-237.



2) La preparación es sometida a la exposición de la luz verde emitida por una fuente de luz.

3) Las preparaciones, entonces, emiten una luz que corresponde a la señal conteniendo tanto los cambios del voltaje de membrana como los cambios del calcio intracelular. Esta luz es separada en dos por un filtro especial de tipo espejo, separando la señal de voltaje y la señal de calcio, y dirigiéndolas a sus cámaras correspondientes que están provistas de filtros específicos para cada señal.

4) La señal es detectada por las cámaras: la CCD 1 (para el calcio) y la CCD 2 (para el voltaje) y enviada a una computadora, transformando la señal luminosa en información que es representada por un software especialmente diseñado para ello.



**Figura 33.** Esquema de las señales detectadas y digitalizadas. **A**, se muestra una imagen con microscopio de fase de una preparación con cultivo en monocapa de miocitos ventriculares de rata neonata. Nótese la confluencia que muestra la preparación. Las preparaciones que no presentan esta imagen son descartadas. **B**, se observan la señal de voltaje de membrana (en negro) y la señal del calcio intracelular (en rojo) recogidas de forma simultánea. Bajo estas señales, se observa la onda de propagación eléctrica según es representada por nuestro software. Nótese que la escala utilizada comienza con amarillo brillante hasta convertirse progresivamente en azul claro. El frente de activación corresponde al



primero, mientras que la repolarización corresponde al segundo color. **C**, se muestra un mapa de propagación de color. Los especímenes que muestran una mapa de propagación de aspecto homogéneo son incluidos en el estudio. La escala de color, es una escala temporal y comienza en el color rojo (inicio de la activación) hasta llegar al azul (última área en activarse). La preparación es estimulada con un electrodo por uno de sus lados con una longitud de ciclo de 500 mseg (una frecuencia de estimulación de 2Hz). Ver película 1 para visualizar una propagación normal en un cultivo en monocapa.



### III. C. El método de inducción de isquemia regional

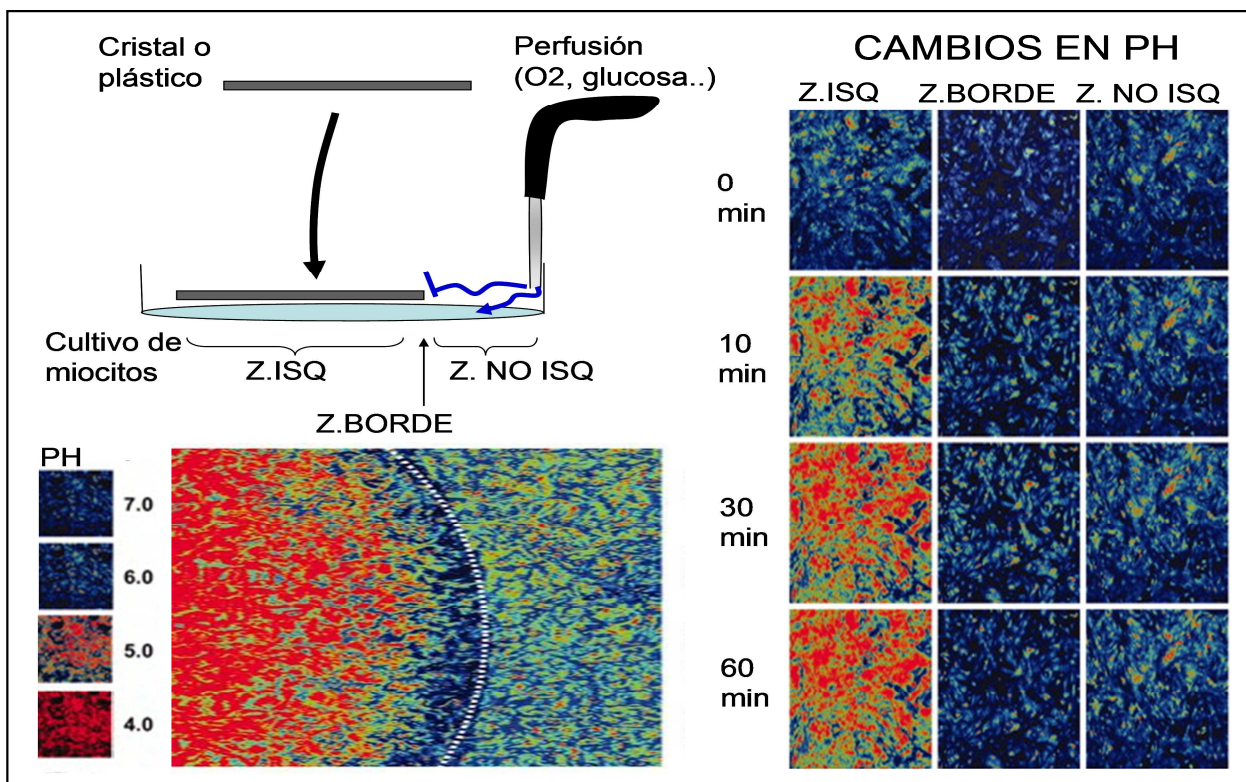
El método de inducción de isquemia regional que utilizamos fue descrito inicialmente por Pitts y col,<sup>55</sup> los cuales provocaron isquemia regional en los cultivos de monocapa de MVRN. Sucintamente, el método consiste en cubrir con un cristal la zona central de la preparación, impidiendo el acceso de nutrientes y del oxígeno a la zona central, mientras que las áreas de alrededor no son afectadas. Pitts y col estudiaron una gran variedad de efectos que son observados durante la isquemia a nivel metabólico (**Figura 34**) y a nivel ultraestructural, validando de esta forma su modelo (**Figura 35**). Además, estos autores demostraron que los cambios observados se debían al efecto de la isquemia y no a la presión mecánica.

En nuestro laboratorio, hemos adaptado, por primera vez, este método de isquemia regional para realizar la técnica de mapeo óptico (**Figura 36**). Se procedía a situar la preparación en un baño de perfusión, que contiene electrolitos, nutrientes y oxígeno en condiciones fisiológicas a una temperatura de 37° C. Se obtuvieron los registros basales del voltaje de membrana y del calcio intracelular. Se situó un cristal de un diámetro de 18 mm mediante un manipulador en el centro de la preparación, cuyas dimensiones son 22 x 22 mm. De esta forma, se crearon dos áreas: una central (zona isquémica) y la zona de alrededor (zona no isquémica). El área inmediatamente circundante al cristal (de 1 mm de grosor) se denominó la zona peri-isquémica (borde), en base a los estudios previos de Pitts y col.<sup>55</sup> Se realizaron entonces los registros de

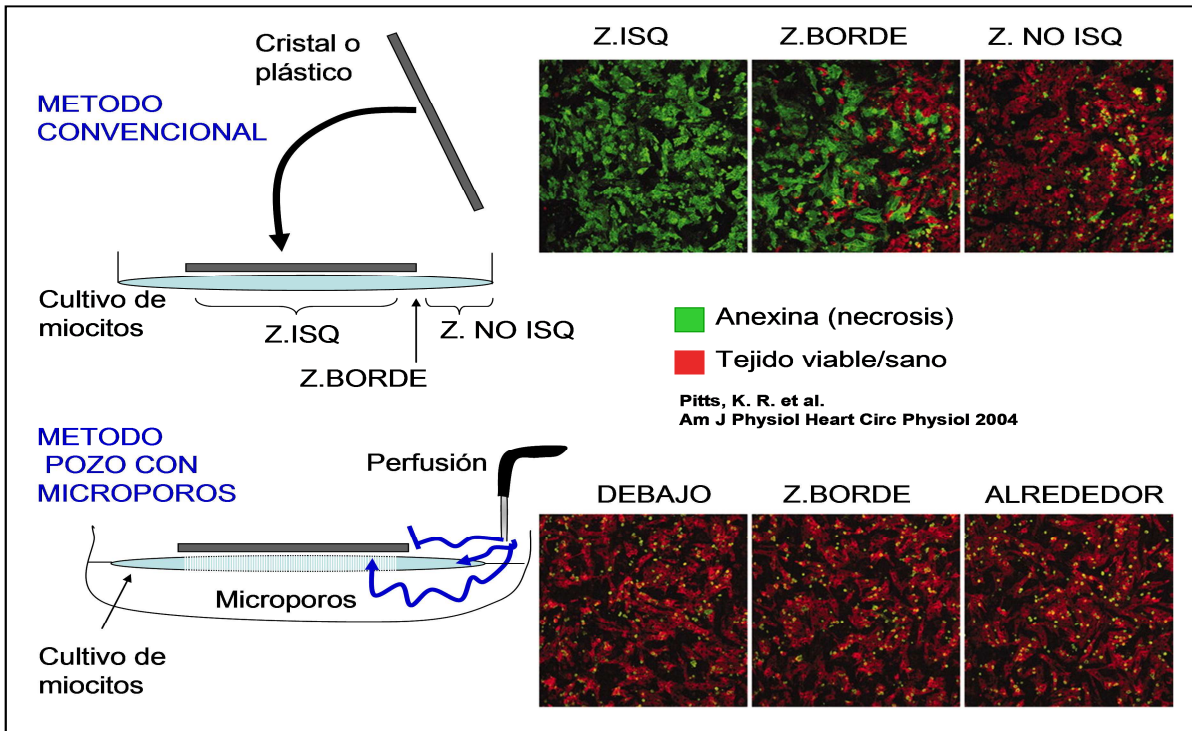


la señal de calcio y voltaje cada 1-2 minutos tras el inicio de la isquemia regional hasta que la zona central no era excitable. A continuación, se procedía a la retirada del cristal. En los experimentos preliminares, la retirada del cristal se realizó mediante el uso de unas pinzas, lo que producía el deterioro ocasional de la preparación. En los estudios posteriores, se perfeccionó la manipulación del cristal y se utilizó un método más efectivo para evitar el daño de la preparación. Antes del inicio de los experimentos, se adhería un hilo de silicona resistente mediante el uso de una gota de adhesivo ultrarrápido. De esta forma, la interferencia con el sistema de mapeo óptico no era significativa debido al escaso calibre del hilo, permitiendo una retirada del cristal sin daño. Por tanto, al retirar el cristal, se iniciaba el periodo de reperfusión, permitiendo la llegada de la solución con nutrientes y oxígeno. Se obtuvieron los registros cada 1-2 minutos.

Los miocitos fueron cultivados en dos tipos de superficie: 1) en una superficie de plástico convencional de PVC (PGC Scientifics, Frederick, MD), que solo pueden ser perfundidos por encima de su superficie y 2) en una superficie con una matriz con microporos permeables a los nutrientes y al oxígeno (Matrigel, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ), que pueden ser perfundidos desde abajo.

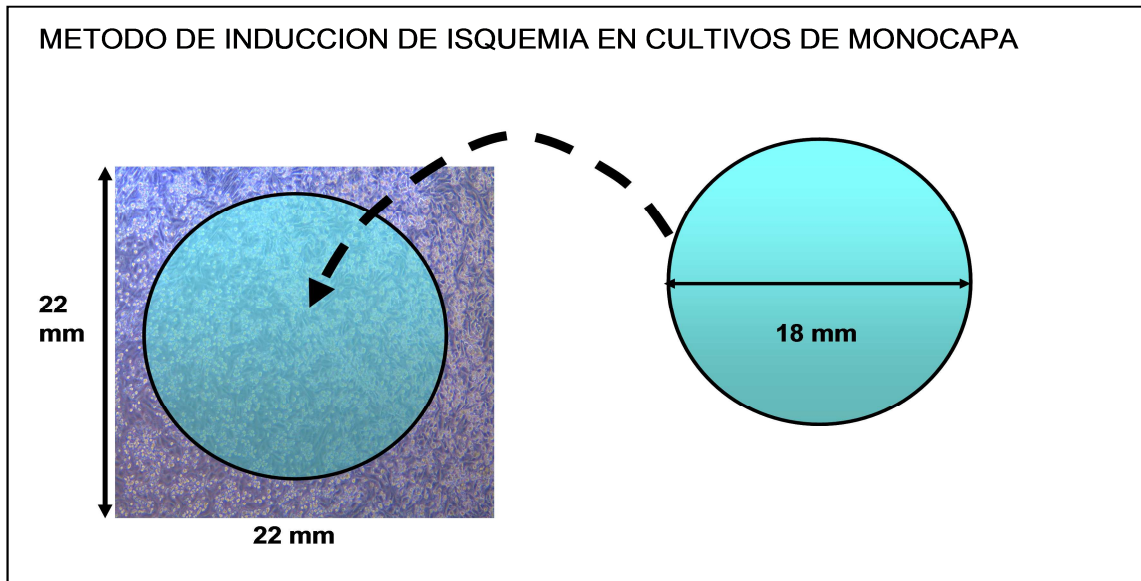


**Figura 34.** El modelo de isquemia de Pitts y col.: los cambios metabólicos. Pitts y col colocaron un cristal en un cultivo de miocitos, consiguiendo que el cristal formara una barrera de difusión a la entrada del oxígeno y nutrientes en la zona central (zona isquémica). La zona periférica (zona no isquémica) al cristal continuaba recibiendo la perfusión del baño como se observa en el esquema de la izquierda arriba. Los autores estudiaron los cambios metabólicos, en la figura el cambio en el pH. En la figura se observa el cambio de color de azul a un color rojo (pH menor de 4) que se produce exclusivamente en la zona isquémica, mientras que la zona no isquémica mantiene un pH normal.



**Figura 35. El modelo de isquemia de Pitts y col.: los cambios funcionales y la validación del modelo.** En la parte superior, se muestra el método convencional de inducción de isquemia regional utilizado por Pitts y col. Con técnicas de inmunohistoquímica, se detecta la aparición de necrosis mediante la detección de anexina, un marcador de muerte celular. Este fenómeno ocurre únicamente en la zona isquémica y la zona peri-isquémica, quedando preservada la zona no isquémica. En la parte inferior, los autores validan su modelo. Repiten los experimentos con cultivos que presentan microporos, permitiendo la microdifusión de nutrientes desde abajo. En este caso, no se observaron cambios de necrosis, confirmando que los cambios eran debidos a isquemia regional y no a un efecto mecánico.





**Figura 36.** El método de isquemia regional adaptado en nuestro laboratorio.

Obsérvese el cristal de 18 mm de diámetro, que se sitúa sobre la preparación del cultivo de miocitos que presenta unas dimensiones de 22x22 mm. Esto genera dos áreas: la zona isquémica bajo el cristal y la zona sana alrededor del cristal. La preparación está sumergida en una cámara donde recibe la perfusión de nutrientes y oxígeno con control de temperatura.



### III. D. La técnica de tinción inmunohistoquímica de las uniones gap.

Se utilizaron anticuerpos contra la conexina-43, principal componente de las uniones gap en el miocito cardiaco. La conexina-43 o conexina total presenta dos formas: una fosforilada (o funcional) y otra no fosforilada (no funcional). Se emplearon anticuerpos para detectar la conexina total y su forma no fosforilada. Para detectar la forma total, se usa un anticuerpo policlonal de conejo (Zymed Laboratories Inc, South San Francisco, California) que se dirige contra la secuencia de aminoácidos de 252 a 270. Para identificar la forma no fosforilada, se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón (clón CX-1B1) dirigida contra la secuencia de aminoácidos de 360 a 376 (Zymed Laboratories Inc, South San Francisco, California)<sup>58-60</sup> Los estudios de inmunohistoquímica se realizaron (n=30) usando uno de los anticuerpos descritos tanto basalmente como en distintas etapas de la fase isquémica y de reperfusión. El principal objetivo era correlacionar el grado de fosforilación de la conexina-43 con los patrones de propagación observados durante la técnica de mapeo óptico. Tras realizar el mapeo óptico, se realizaba el proceso de fijación celular. Para ello, los cultivos se retiraban del baño de perfusión y eran sometidos a formaldehído al 2% durante 10 minutos en una solución de tipo Tyrode (con 0.1 mmol/L Ca<sup>2+</sup>). Después, las muestras eran incubadas con una solución bloqueante de proteínas y entonces se exponían al anticuerpo monoclonal (contra la forma no fosforilada de la conexina-43) o al anticuerpo policlonal (contra la forma total de conexina-43), durante una hora (para el primer anticuerpo) y



durante 45 minutos (para el segundo anticuerpo). Por último, los cultivos eran tratados con DAPI (Sigma, St Louis, Mo) para teñir los núcleos celulares y finalmente se montaban las preparaciones en unas placas de cristal. De esta forma, las preparaciones eran estudiadas en el microscopio de epifluorescencia y se efectuaban fotografías digitales para un análisis posterior. Para cuantificar el grado de fluorescencia de la conexina-43 en las distintas fases (tanto de la forma no fosforilada como la forma total), se midió de forma digital la intensidad de fluorescencia y se calculó el cociente entre la zona isquémica y la zona sana.

### **III. E. El análisis estadístico.**

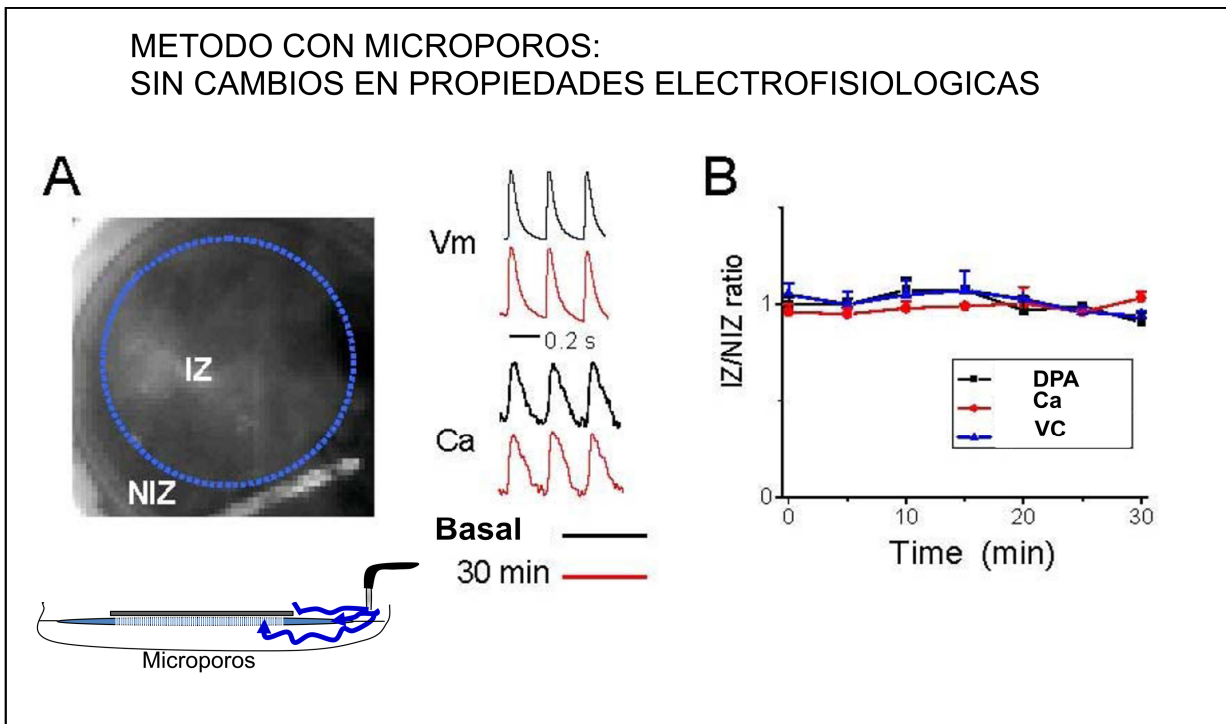
Los datos son expresados con la media  $\pm$  2 desviaciones estándar. Para comparar variables cuantitativas, se llevó a cabo el test de Student ( $p < 0.05$ ). El análisis más complejo fue realizado por el departamento de estadística de UCLA. Para ello, se utilizó el test de medidas repetidas para comparar los valores promedio de los diferentes parámetros y su curso temporal. Sucintamente, se empleó un modelo simple de medidas repetidas que asume una correlación intraclase de tipo constante entre dos diferentes puntos temporales, o, de forma equivalente, se asumió un coeficiente aleatorizado de un modelo de regresión, en los cuales, la zona isquémica y la zona sana tenían curvas que progresaban de forma aleatoria. Se estableció un nivel estadístico de diferencia entre las medias de 0.01 (para el test de medidas repetidas).



## IV. RESULTADOS

### IV.A. La validación del método de isquemia regional en nuestro laboratorio.

Como hemos descrito, Pitts y col. validaron su propio modelo de inducción de isquemia regional a nivel de los cambios metabólicos y ultraestructurales (**Figura 35**). Para validar este método a nivel de los cambios electrofisiológicos, registramos la señal de voltaje y de calcio intracelular para medir tres parámetros: la duración del potencial de acción, la velocidad de conducción y el calcio intracelular. Se aplicó un cristal que limita la entrada de nutrientes y de oxígeno en la superficie. Para descartar que el efecto observado se deba al efecto mecánico directo del cristal sobre los miocitos, los miocitos fueron cultivados sobre una superficie con microporos que permitía la difusión de nutrientes y oxígeno por debajo del cristal. Se compararon los parámetros electrofisiológicos en condiciones basales y tras 30 minutos de la colocación del cristal. Como se esperaba, no se observaron cambios en ninguna de las propiedades electrofisiológicas estudiadas (n=6). Esto confirma que la presencia del cristal por sí mismo en los cultivos con microporos no producía ningún efecto puesto que los miocitos recibían los nutrientes y el oxígeno por debajo del cristal a través de los microporos (**Figura 37**).



**Figura 37.** El método con microporos. La ausencia de cambios en las propiedades electrofisiológicas (validación de nuestro modelo). Obsérvese que tras 30 minutos de situar el cristal sobre la preparación con microporos que permite la perfusión por debajo del cristal, no se producen cambios en las principales propiedades electrofisiológicas: duración del potencial de acción (DPA), velocidad de conducción (VC) o el calcio intracelular (Ca). De esta forma, se valida que el cristal no presenta un efecto local mecánico significativo que altere las propiedades electrofisiológicas del cultivo.



#### **IV.B. Los cambios electrofisiológicos durante la isquemia y la reperfusión regional.**

Al colocar el cristal sobre los cultivos sin microporos, sí se limitaba la entrada de oxígeno y nutrientes a los mismos.<sup>55</sup> En este caso se observaban cambios significativos en las propiedades electrofisiológicas como muestra la **figura 38**.

Basalmente, los cultivos presentaban una propagación uniforme al estimular a 2Hz (n=11) y los parámetros basales electrofisiológicos fueron los siguientes:

- La duración del potencial de acción (**PA**) (ver métodos) de  $117\pm 12$  ms
- La duración de los cambios en el calcio intracelular (**Ca**) de  $160\pm 36$  ms.
- La velocidad de conducción (**VC**) fue de  $0.16\pm 0.02$  m/s
- La longitud de onda de propagación (**LO**) de  $18\pm 0.3$  mm.

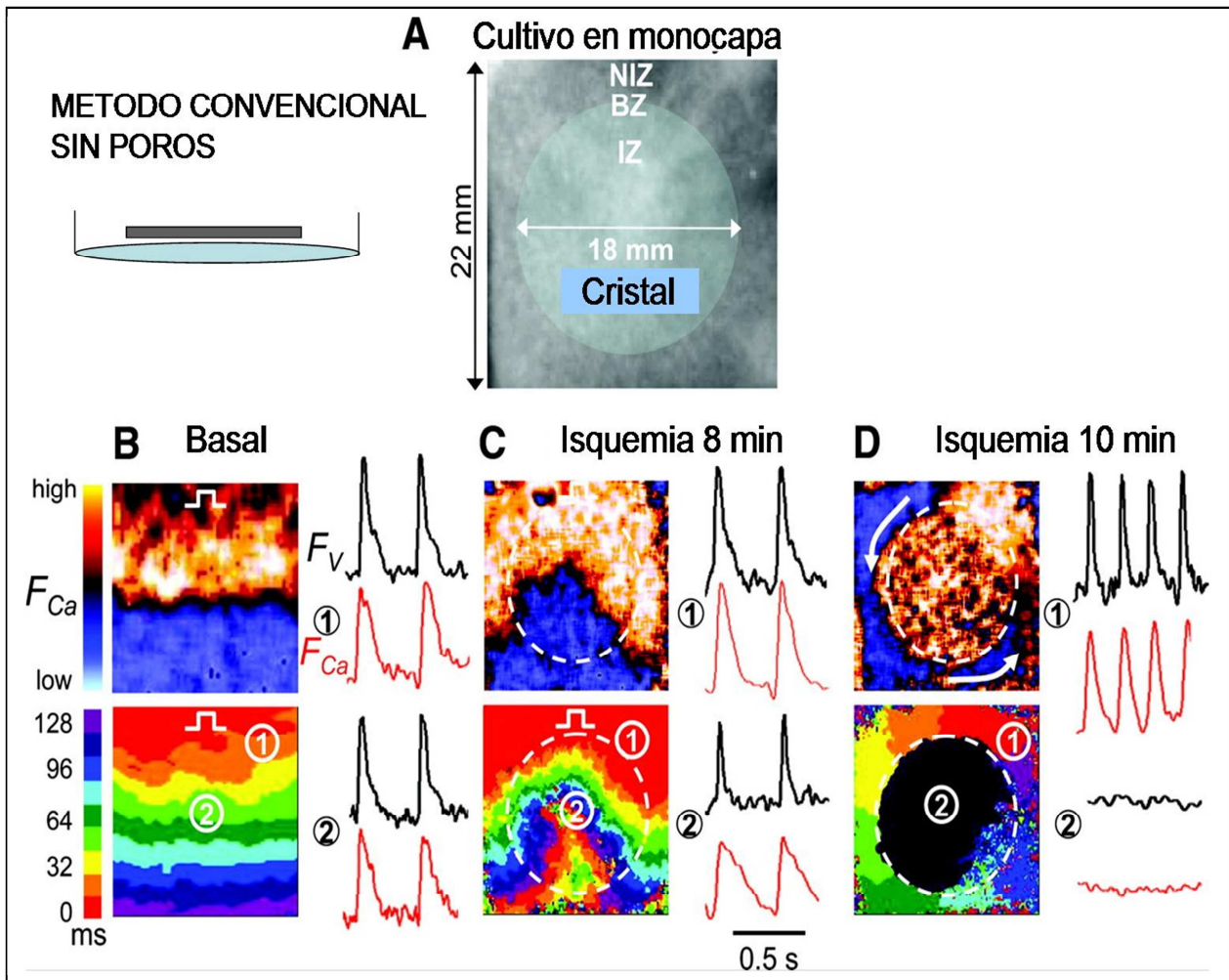
Tras colocar el cristal sobre los cultivos (inicio de isquemia), se observaron los cambios electrofisiológicos con una secuencia temporal en la zona isquémica (ver **figuras 38 y 39, Películas 6-8**):

- Una disminución progresiva de la duración y de la amplitud del **PA**.
- Una prolongación de la duración del **Ca**.
- Un descenso gradual en la **VC** hasta convertirse en un tejido que no era excitable a los  $10.6\pm 3.6$  minutos (**Figura 38D y 40A**).
- Un acortamiento importante de la **LO** debido a la disminución de tanto la duración del **PA** como de la **VC**.



Como muestra la **figura 39**, la **VC** disminuye al  $58\pm 12\%$  de los niveles basales ( $P < 0.05$ ) a los 5 minutos de la isquemia, al  $46\pm 16\%$  a los 7 minutos ( $P < 0.05$ ), y a  $0\%$  después de  $10.6\pm 3.6$  minutos. Por el contrario, la **VC** en la zona sana (área alrededor del cristal) no varía significativamente durante el periodo de isquemia ( $-5\pm 7\%$  a los 5 minutos de isquemia,  $-9\pm 7\%$  a los 7 minutos, y  $-9\pm 7\%$  cuando la zona isquémica se torna no excitable;  $P = \text{NS}$ ). Por consiguiente, se genera un gradiente progresivo de **VC** entre la zona isquémica y la zona sana, conforme avanza el tiempo de isquemia (**Figura 39D, Películas 6-8**).

Al retirar el cristal se instauraba el periodo de “reperfusión” ( $n=11$ ), la zona isquémica recuperaba su excitabilidad en la mayoría de las preparaciones ( $n=9$ ) con una recuperación rápida a los niveles basales de la duración y amplitud del **PA** y del **Ca**, que sucede en los primeros minutos (**Figura 39**). Sin embargo, se produce una recuperación más lenta de la **VC** y de la **LO**, que tarda una media de  $9.0\pm 3.0$  minutos para alcanzar  $>90\%$  del nivel basal ( $n=7/9$ ). En 2 preparaciones, la **VC** se recupera solo parcialmente (al  $44\pm 4\%$  del nivel basal).

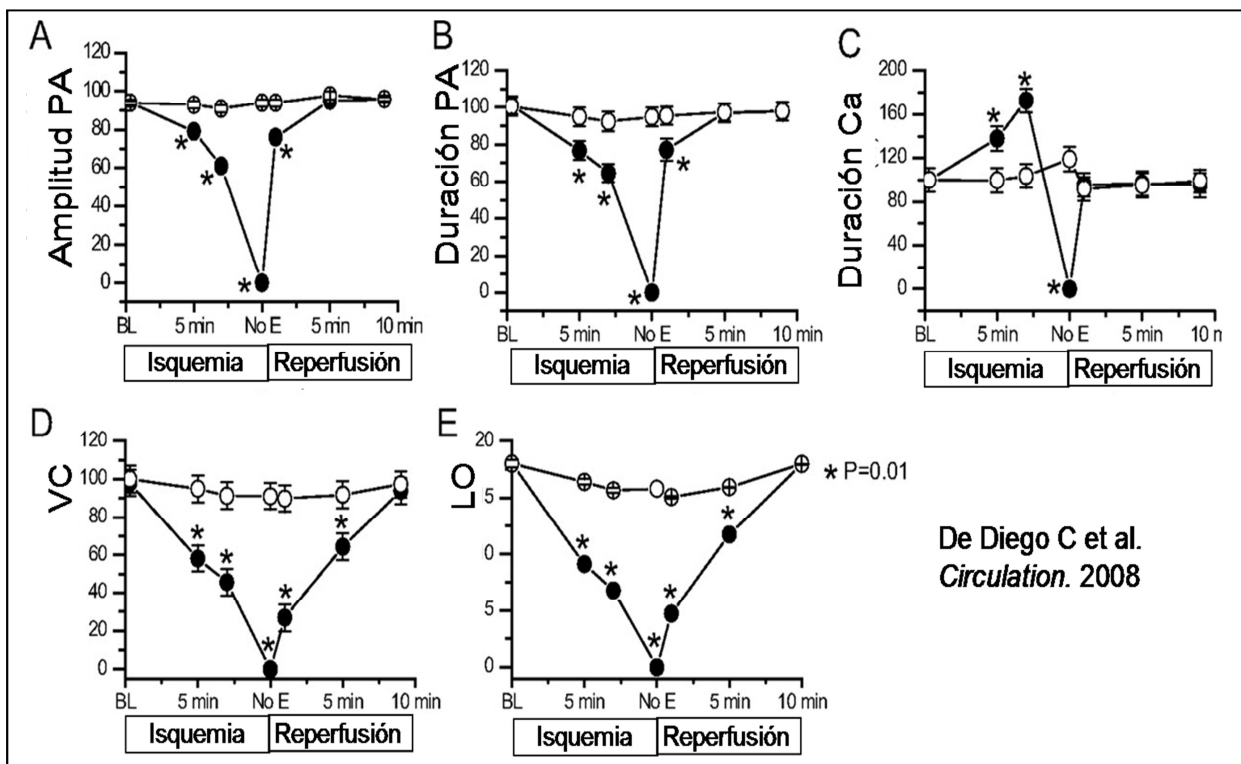


**Figura 38.** Los efectos de la isquemia regional en el potencial de acción y el calcio citosólico en cultivos de miocitos de rata: Los patrones de propagación típicamente observados. **A**, Fotografía de un cultivo en monocapa de miocitos de rata neonata (22x22 mm) con el cristal de 18-mm situado en posición central. El significado de las abreviaturas es: NIZ zona no isquémica; BZ, zona borde o de transición; y IZ, zona isquémica. De **B a D**, se muestran fotografías de la propagación demostrada por cambios de fluorescencia y los mapas de isócronas durante





estimulación desde el extremo superior de la preparación en distintas fases: básicamente, a los 8 minutos de la isquemia y a los 10 minutos. Junto a los mapas, se muestran los trazados de dos puntos de la preparación (1 y 2) de la señal de voltaje (FV, negro) y del calcio intracelular (FCa, rojo) en cada una de las fases temporales. La propagación era uniforme básicamente, pero se enlentece progresivamente en la zona isquémica (ver a los 8 minutos) y finalmente la zona central ya no es excitable a los 10 minutos, desarrollando una macro-reentrada que circula en sentido horario alrededor de la zona isquémica.



De Diego C et al.  
*Circulation*. 2008

**Figura 39.** Resumen de los cambios electrofisiológicos observados durante el proceso de isquemia y reperfusion regional en nuestro modelo. **A y B**, Cambios temporales en la amplitud y en la duración del potencial de acción (PA), respectivamente. **C**), Secuencia temporal de los cambios en el calcio intracelular (**Ca**) **D y E**), Velocidad de conducción y la longitud de onda de propagación, respectivamente. Zona isquémica (círculos negros) y Zona sana (círculos blancos). La secuencia temporal sucede de la siguiente forma: periodo isquémico, la ausencia de excitabilidad a los  $10.6 \pm 3.6$  minutos (no E) y posteriormente el periodo de reperfusion. Los valores se muestran como media  $\pm 2$  desviaciones estándar.



#### **IV.C. Los experimentos adicionales:**

##### **A) Isquemia prolongada más allá de la pérdida de excitabilidad.**

A un grupo separado de preparaciones (n=7) se les sometió a un periodo más prolongado de isquemia. En 4 de ellos, el cristal se retiró a los  $17 \pm 1$  minutos y la mayoría (n=3/4) de ellos recuperaron la excitabilidad durante el periodo de reperfusión. Por contra, 3 preparaciones fueron sometidas un periodo aún más prolongado de isquemia (una media de  $25 \pm 6$  minutos de isquemia), y ninguna de ellas recuperó la excitabilidad durante la reperfusión.

##### **B) Periodos de isquemia más cortos y efecto de “precondicionamiento”.**

Para explorar la presencia de “precondicionamiento” (fenómeno por el cual periodos repetidos de isquemia promueven una mayor resistencia a los efectos de la isquemia), los especímenes fueron sometidos a periodos más cortos de isquemia, siendo retirado el cristal al observar bloqueo de la conducción de tipo 2:1 (una media de  $6 \pm 1.7$  minutos) pero antes de la pérdida completa de la excitabilidad tisular. Posteriormente, se retiró el cristal (reperfusión) hasta recuperar la conducción 1:1 ( $7 \pm 2$  minutos) y entonces se aplicó de nuevo el cristal. En este segundo tiempo de isquemia, las preparaciones mantienen conducción 1:1 en la zona isquémica hasta  $16 \pm 3$  minutos, presentando la pérdida completa de excitabilidad a los  $18 \pm 2$  minutos (comparado con los  $10.6 \pm 3.6$  minutos de isquemia sin “precondicionamiento” previo;  $P < 0.05$ ).



#### IV.D. El estudio de la conexina-43 durante la isquemia y la reperfusión regional:

La amplitud de la corriente de sodio y la conductancia de las uniones gap son los dos determinantes más importantes de la VC. Durante la isquemia, existe una disminución tanto en la disponibilidad de canales de sodio como en la conductancia de las uniones gap (siendo la conexina-43 la más predominante). Esta última se ha asociado a un aumento de la fracción no fosforilada de la conexina-43 (una forma no funcional).<sup>60</sup>

Durante el periodo de reperfusión, hemos encontrado que la duración del potencial de acción se recupera rápidamente (incluso dentro del primer minuto, Figura 39). En cambio, la VC se recupera más lentamente en nuestro modelo.

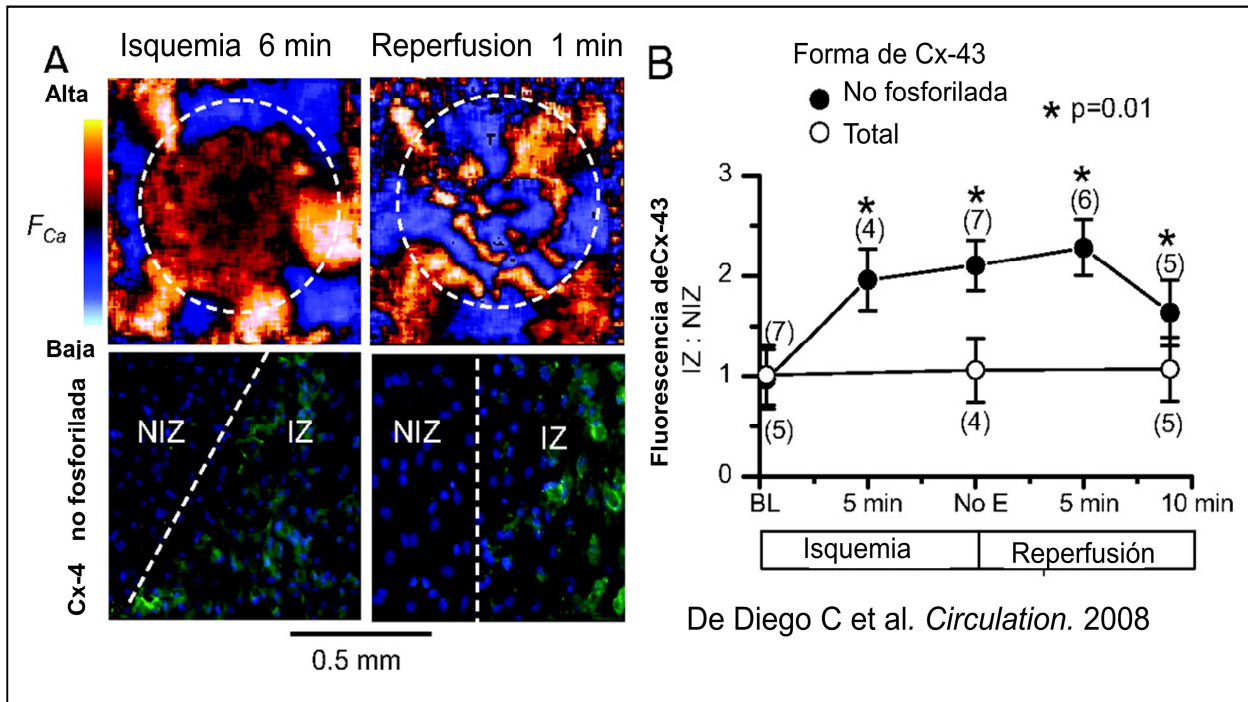
Nuestro objetivo fue examinar si esta recuperación lenta de la VC se asociaba con la persistencia de la forma no fosforilada de conexina-43. Para ello, las preparaciones fueron teñidas en distintos momentos de la isquemia y la reperfusión, mediante técnicas de inmunohistoquímicas que detectan tanto la forma total de conexina-43 como la forma no fosforilada de la misma (**Figura 40**).

Durante el periodo de isquemia, la forma no fosforilada de conexina-43 aumentó significativamente en la zona isquémica en relación a la zona sana, y esta diferencia se mantuvo durante el periodo de reperfusión. En la **figura 40B**, se muestra en una secuencia temporal el conjunto de resultados de la forma no fosforilada de la conexina-



43 en la zona isquémica y en la zona sana. El cociente zona isquémica/zona sana de la forma no fosforilada aumentó en los primeros 5 minutos de la isquemia y se mantiene elevado durante la reperfusión durante 10 minutos. El cociente de la forma total de la conexina-43 (que incluye la forma fosforilada y la no fosforilada) no experimentó cambios durante los 10 minutos de la isquemia o de la reperfusión (**Figura 40B**).

En resumen, hemos encontrado una correlación temporal entre el retraso en la recuperación de la VC y la presencia de la forma no fosforilada de la conexina-43.



**Figura 40. La tinción con fluorescencia de la conexina-43 durante la isquemia y la reperfusion.** A, Los paneles superiores muestran fotografías de mapeo óptico mostrando los patrones de preparación a los 6 minutos de la isquemia y en el primer minuto de la reperfusion. En los paneles inferiores, se muestran las correspondientes imágenes con marcado fluorescente de la forma no fosforilada en la zona isquémica (IZ) y sana (NIZ). A los 6 minutos de isquemia, se observa que el centro ya no es excitable y se produce una macro-reentrada alrededor. En el primer minuto de la reperfusion, se visualiza la recuperación de la excitabilidad con conducción muy lenta en el centro de la preparación. La línea blanca intermitente delimita la zona isquémica y la zona no isquémica. En los paneles inferiores, se observa la forma no fosforilada de la conexina-43 en verde, cuya presencia es marcadamente mayor en la zona isquémica.



Los núcleos de los miocitos se visualizan en color azul (tinción con DAPI). **B**, Gráfico que muestra el cociente zona isquémica/ zona sana de la conexina-43 en su forma total y en su forma no fosforilada. La primera no se modifica durante la isquemia y reperusión (círculos blancos). La forma no fosforilada experimenta un aumento durante la isquemia que se mantiene temporalmente durante la reperusión (círculos negros). Los valores se muestran como la media  $\pm$  2 veces la desviación estándar y los números representan los especímenes estudiados en cada etapa.



#### IV.E. Las arritmias durante la isquemia en el modelo:

En la fase de isquemia, se generaron rotores en 5 de 11 preparaciones a los  $6.0 \pm 3.7$  minutos. Dichos rotores se localizaron en la zona borde en 4 preparaciones y en la zona isquémica en 1 caso. Inicialmente los rotores conducían 1:1 en la zona isquémica. Conforme el tiempo de isquemia progresó, la propagación de los rotores en la zona isquémica mostró un fenómeno de alternancia eléctrica y posteriormente se desarrolló un bloqueo 2:1 de la conducción. (**Figura 41, Película 9-11**). En las fases tardías de la isquemia, los rotores fueron sustituidos por macro-reentrada estable con ondas únicas (**Figura 38D, Película 8**) o múltiples circulando alrededor de la zona isquémica (**Figura 40A, Película 12**).

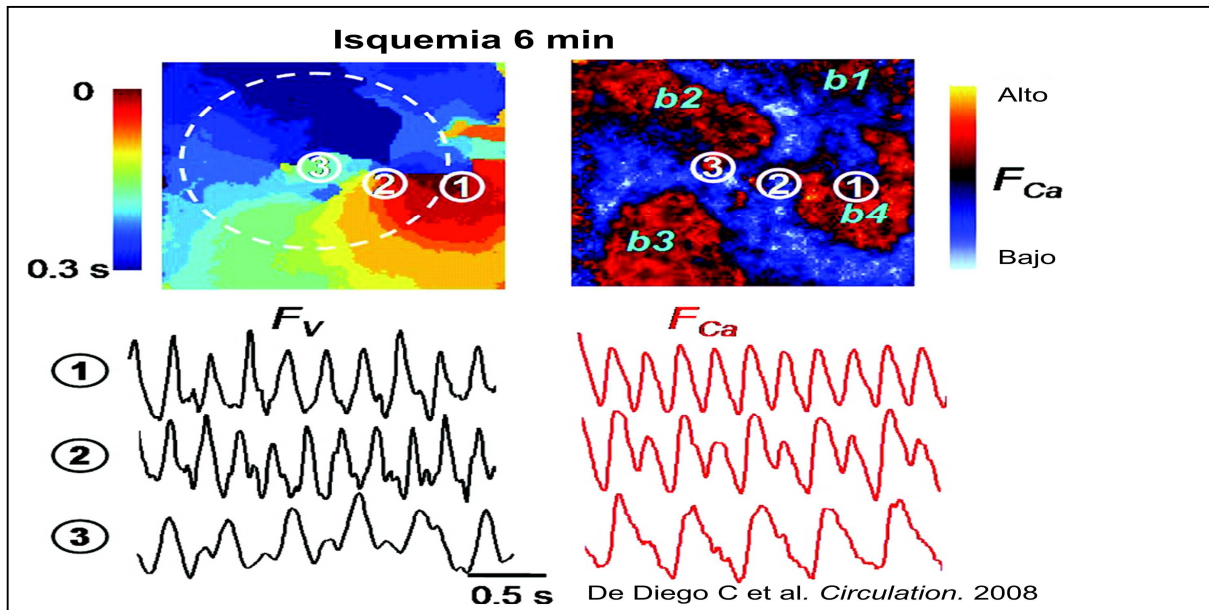
Como se comenta en los métodos, se realizaron registros con mapeo óptico cada 1-2 minutos, lo que no permitió observar el momento preciso de la iniciación de la reentrada en todos los cultivos. El inicio de la reentrada fue observado en 3 preparaciones. En 2 de ellas, un extrasístole originado en la zona peri-isquémica inició el mecanismo de reentrada (**Figura 42**). Un extrasístole producido en la zona de transición ó zona borde (zona 1) no se propaga a la zona isquémica pero sí a la zona sana en el sentido de las agujas del reloj. En la zona de origen del extrasístole, la duración del potencial de acción fue corta y la duración calcio citosólico estaba dramáticamente prolongada. Esta combinación se ha relacionado como causa de actividad desencadenada en otros contextos experimentales.<sup>61</sup> En la **figura 42B-C**, se



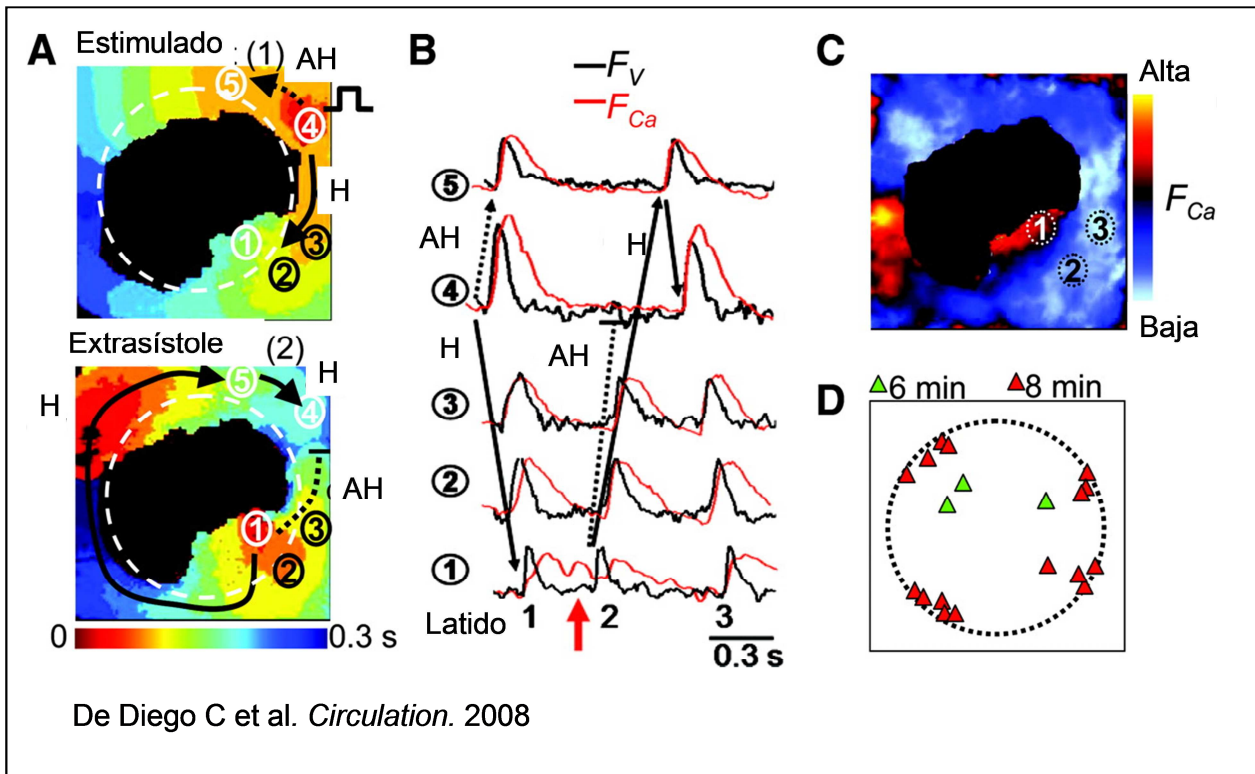


visualiza que los niveles del calcio citosólico están persistentemente aumentados en el área de origen del extrasístole. Estos extrasístoles fueron frecuentes durante la fase de isquemia y sus puntos de origen se muestran en la misma figura (**42D**). La localización más frecuente fue la zona borde (peri-isquémica), aunque en las fases precoces de isquemia se observaron extrasístoles que aparecen en la zona isquémica mientras ésta era aún excitable.

En otro cultivo en monocapa, se observó el inicio de reentrada debido a un mecanismo diferente. En este caso, el impulso estimulado se bloqueó al entrar en la zona isquémica (**Figura 43**), propagándose por la zona sana y ejecutando una rotación en torno a la zona de transición (zona borde) e iniciando entonces la reentrada.



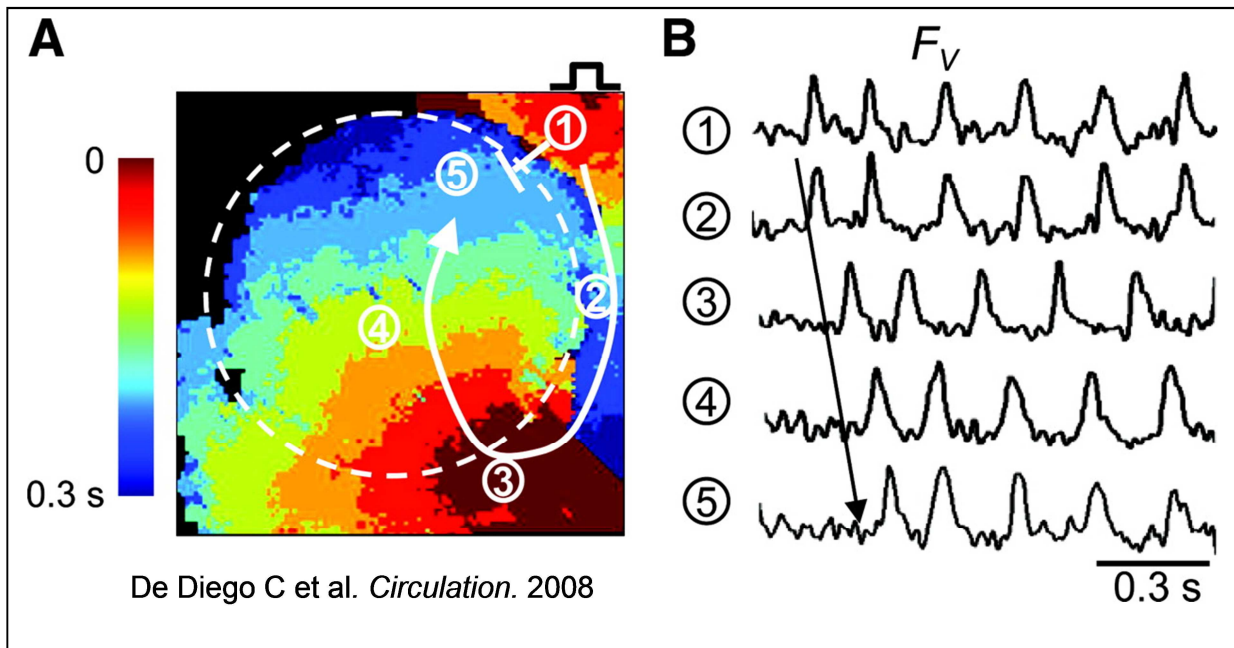
**Figura 41.** Un ejemplo de reentrada iniciada de forma espontánea a los 6 minutos de la isquemia en un cultivo en monocapa. Los paneles superiores muestran un mapa de activación y una fotografía con los cambios en fluorescencia del calcio. Se observa un rotor anclado en la zona peri-isquémica o de transición próximo a las 4 horas. Dicho rotor genera ondas de propagación que circulan alrededor en la zona sana (zona 3). En la parte inferior, se muestran trazados con los cambios en el voltaje de membrana ( $F_v$ ) y el calcio intracelular ( $F_{Ca}$ ) mediante la técnica de mapeo óptico. Nótese que la amplitud del calcio intracelular alterna en la zona de transición (zona 2) de la forma siguiente: mayor amplitud-menor amplitud-mayor amplitud. En la zona 3 (centro de la zona isquémica) se observa bloqueo de la conducción de tipo 2:1. En cambio, no se detecta la alternancia en la duración de potencial de acción debido a que la misma es inferior a la capacidad de detección de la técnica.



**Figura 42.** La iniciación de reentrada por un extrasístole durante la isquemia en cultivos en monocapa. **A**, Muestra un mapa de activación (panel superior) durante la isquemia. Nótese que el cultivo es estimulado desde uno de los extremos (latido 1) y conduce alrededor del centro de la preparación que ya no es excitable (en negro). En el panel inferior, se muestra el mapa de activación de un extrasístole originado en la zona peri-isquémica (latido 2) en un cultivo en monocapa tras 8 minutos de isquemia. El latido 1 estimulado (zona 4) se propaga en sentido antihorario (AH) a la zona 5 (flecha intermitente) y en sentido horario (H) a las zonas 3,2 y 1 (flecha continua). Entonces, un latido ectópico se origina en la zona 1 (zona peri-isquémica), que se propaga en sentido antihorario (AH) hacia las zonas 2 y 3 pero la conducción se



bloquea (flecha intermitente). A su vez, el mismo latido ectópico se propaga en sentido horario (flecha continua) alcanzado las zonas 5 y 4 en sentido opuesto y continuando (por el lugar donde previamente se produjo el bloqueo del impulso en sentido antihorario) hasta activar las zonas 3 y 2 , lo que inicia la reentrada (latido 3). **B**, Trazados de los registros de mapeo óptico del potencial de acción (FV) y el calcio intracelular (FCa) detectados en las zonas de 1 a 5. Se ilustra la activación más precoz, siendo en la zona 4 durante el latido estimulado y en la zona 1 cuando la extrasístole se produce. Nótese los efectos de la isquemia en la zona 1 con un potencial de acción corto y una duración de la salida del calcio intracelular muy prolongada. **C**, Fotografía de la fluorescencia de los cambios intracelulares de calcio justo antes del latido ectópico (latido 2, que corresponde a la flecha roja en B). Se demuestra que existe una elevación persistente del calcio intracelular justo en el área donde el latido ectópico posteriormente se origina. Nótese que el latido 1 aún se propaga en sentido horario en la zona no isquémica en este momento (lado izquierdo). **D**, Esquema que muestra los puntos de origen de los latidos ectópicos en el grupo de cultivos en monocapa. Se observa una predilección de localización en la zona isquémica a los 6 minutos de la isquemia, mientras que a los 8 minutos de la isquemia se localiza predominantemente en la zona peri-isquémica.



**Figura 43. La iniciación de reentrada por bloqueo de la conducción en la zona isquémica.** **A**, muestra el mapa de activación de una propagación producida por estimulación desde el borde superior derecho de la preparación (zona 1). La activación se inicia en la zona sana y se bloquea al alcanzar la zona isquémica, continuando su propagación por la zona circundante (no isquémica, zona 2) hasta una zona peri-isquémica (zona 3) donde ejecuta una rotación penetrando en la zona isquémica (zonas 4-5). **B**, Los registros de voltaje muestran la misma secuencia desde las zonas 1 a 5.

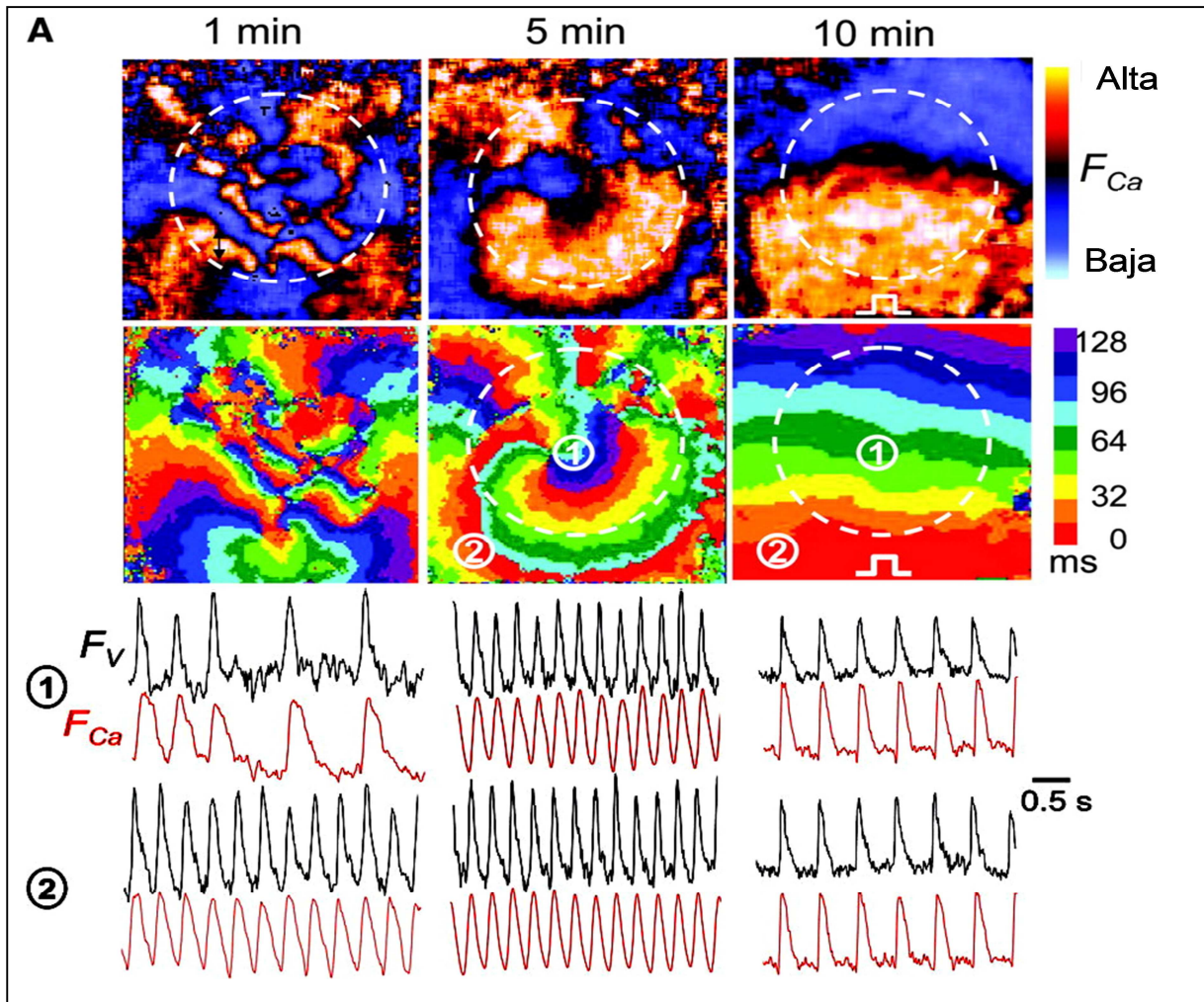


#### IV.F. Las arritmias durante la reperfusión.

Tras observarse la ausencia de excitabilidad en la zona central o isquémica, se procede a la retirada del cristal (ver métodos). De forma muy rápida ( $1.0 \pm 0.8$  minutos), se observaba la recuperación de la duración del potencial de acción y de los cambios intracelulares de calcio (**Figura 44**). Por contra, la velocidad de conducción (VC) se mantuvo deprimida durante aproximadamente 10 minutos desde el inicio de la reperfusión. Este fenómeno, la combinación de la excitabilidad que se recupera en presencia de una velocidad de conducción muy reducida, constituye un substrato altamente arritmogénico. De hecho, se observaron patrones de propagación del tipo fibrilatorio en el 45% de las preparaciones durante la reperfusión ( $n=5/11$ ). Este patrón se caracterizó por un rotor anclado en la zona de transición (peri-isquémica) con propagación de tipo 1:1 en la zona sana, pero con conducción fibrilatoria en la zona de reperfusión. En la zona reperfundida, se observaba fallo de la conducción 1:1 y conducción extremadamente lenta (**Figura 44A y Película 14**). El rotor “madre” se observó típicamente en el primer minuto de la reperfusión,<sup>62,63</sup> en consonancia con la recuperación rápida de la excitabilidad. Es interesante destacar que el rotor anclado en la zona de transición, presentaba una longitud de onda larga cuando se propagaba en la zona sana, mientras que mostraba una longitud de onda corta en la zona isquémica o reperfundida (**Figura 44A**). Después de los 5 minutos de la reperfusión (**Figura 44B**),



el patrón observado es de reentrada pero más organizado, en relación con el aumento de la longitud de onda (**Película 15**). Este aumento es debido tanto a la normalización progresiva de la duración del potencial de acción como a la recuperación parcial de la velocidad de conducción. A los 10 minutos de la reperfusión, la reentrada se termina y la estimulación de la preparación permite observar que la propagación es similar en la zona sana o la zona previamente isquémica y reperfundida (**Figura 39 y 44C, Película 16**).



**Figura 44. Las arritmias durante la reperfusión.** Se muestran 3 puntos claves representativos: en el primer minuto, a los 5 minutos y a los 10 minutos. En los paneles superiores, se muestran las fotografías de los mapas de propagación mostrando los cambios de fluorescencia. En los paneles inferiores, se observan los correspondientes mapas de activación de tiempo. En la parte inferior, se encuentran los registros de voltaje y de calcio que corresponden a cada momento. Al minuto, un rotor en “figura de 8” se encuentra anclado en la zona de transición (a las 6 horas del reloj) con





propagación normal hacia la zona sana pero en la zona reperfundida la propagación muestra las siguientes características: 1) una velocidad de conducción muy lenta, 2) una longitud de onda corta y 3) conducción fibrilatoria en la zona, con zonas localizadas donde se produce la fractura de la onda (fallo de la conducción 1:1). Todo ello configura las características de una fibrilación con un rotor madre. A los 5 minutos, se observa un rotor único en la zona reperfundida con propagación 1:1 en toda la preparación. A los 10 minutos, la reentrada se ha terminado de forma espontánea y se visualiza una propagación uniforme producida por estimulación.



## V. DISCUSION

En la presente tesis,<sup>64</sup> se han caracterizado los cambios electrofisiológicos y las arritmias relacionadas con la isquemia regional en un nuevo modelo bidimensional cardiaco experimental. Para ello se ha empleado la técnica de mapeo simultáneo de la señal de calcio y del voltaje en un cultivo en monocapa de miocitos (de rata neonata) sometido a un novedoso método de inducción de isquemia regional.

Los hallazgos en nuestro modelo experimental reproducen los múltiples cambios electrofisiológicos (el acortamiento de la duración del potencial de acción, la prolongación de la liberación del calcio citosólico y el enlentecimiento de la velocidad de conducción) así como los mecanismos arritmogénicos (los latidos prematuros ectópicos, la alternancia eléctrica, el bloqueo de la conducción y la reentrada) que han sido previamente observados a nivel experimental en los modelos de tejido cardiaco sujeto a isquemia regional por el procedimiento de la oclusión coronaria.

Además, el método que examinamos también presentó el fenómeno de “precondicionamiento”, por el cual un cultivo de monocapa sometido a isquemia previamente experimentó un retraso en el desarrollo de los cambios electrofisiológicos en un segundo episodio de isquemia.

Por tanto, este modelo podría ser útil para futuros estudios de arritmogénesis con el objetivo de probar el beneficio de antiarrítmicos y/o intervenciones de tipo cardioprotector durante la isquemia regional. Una de las ventajas de este método



(modelo bidimensional) es que la zona borde o peri-infarto está bien demarcada y es un substrato menos complejo anatómicamente que en el caso del tejido cardíaco intacto (modelo tridimensional).

### **V.A. El curso temporal de los cambios electrofisiológicos**

En un estudio previo, Pitts y col emplearon un método de inducción de isquemia regional similar al utilizado en la presente tesis.<sup>55</sup> Estos autores centraron sus esfuerzos en caracterizar el daño celular a partir de los 15 minutos de isquemia. En su estudio observaron tanto la ausencia de contracción como la muerte de los miocitos dentro de los primeros 15 minutos de isquemia. Su nuevo método de inducción de isquemia regional podía producir las mismas consecuencias observadas en el corazón intacto a nivel experimental, tanto en la severidad como en la rapidez de su instauración. En nuestro estudio, el curso temporal de los cambios electrofisiológicos (duración del potencial, cambios del calcio citosólico y velocidad de conducción) se instauraron de forma rápida (primeros minutos) hasta que finalmente el centro sometido a isquemia ya no era excitable (justo después de 10 minutos). Este comportamiento temporal está dentro del rango observado en el corazón intacto después de la oclusión coronaria<sup>16,19,65</sup> o bajo hipoxia severa.<sup>66</sup> En estos modelos tridimensionales, los cambios en la duración del potencial de acción ocurrieron antes que la disminución en



el acoplamiento intercelular (conductancia de las uniones gap), que comenzaba a disminuir después de 15 a 20 de isquemia<sup>67</sup> o de anoxia.<sup>66</sup>

En nuestro estudio no se realizó una medida directa del acoplamiento eléctrico. Sin embargo, sí se documentó un aumento de la defosforilación de la conexina 43 (un marcador indirecto de la disminución del acoplamiento intercelular)<sup>60</sup> que sucedió dentro de los primeros 5-10 minutos. Nuestros hallazgos sugieren que la defosforilación de la conexina 43 contribuye al enlentecimiento precoz de la velocidad de conducción que finalmente produce el bloqueo de la conducción en la zona isquémica de los cultivos en monocapa.

#### **V.B. Los latidos prematuros espontáneos**

Los latidos ectópicos prematuros originan arritmias ventriculares con frecuencia en el músculo cardiaco intacto sometido a la oclusión coronaria. En estos experimentos de isquemia regional, la alta incidencia de arritmias ventriculares en los primeros 15-20 minutos<sup>67, 68</sup> se ha atribuido a los extrasístoles producidas por la despolarización de la membrana. Como causa de esta despolarización, se ha implicado el flujo de corrientes de lesión diastólicas a través de la zona borde <sup>26, 69</sup> hacia la zona sana o hacia fibras de Purkinje a nivel subendocardico.<sup>26,70</sup> En nuestro modelo de isquemia regional bidimensional, hemos encontrado que los extrasístoles se originaron principalmente a nivel de la zona borde y menos frecuentemente en la zona isquémica cuando era



todavía excitable. El mecanismo de estos extrasístoles podría ser automatismo, actividad desencadenada o micro-reentrada, sin poder discernir de nuestros datos con certeza absoluta el mecanismo predominante. Sin embargo en la **figura 42**, se observa el aumento persistente del calcio citosólico después de la repolarización en la zona borde. De dichas áreas se originaron extrasístoles. Todo ello apoya que la actividad desencadenada es un mecanismo preponderante de inicio de arritmias en este modelo en coherencia con otros modelos experimentales como en aurícula<sup>61</sup> o en el ventrículo con infarto subagudo.<sup>71</sup> Desafortunadamente, la resolución espacial de nuestro modelo (340  $\mu\text{m}$ ) no permite identificar ondas de calcio intracelulares o pequeños circuitos de micro-reentrada.

### **V.C. Las arritmias durante la isquemia regional**

Como ocurre en el músculo cardíaco intacto,<sup>26,67</sup> hemos encontrado que los extrasístoles espontáneos iniciaron reentrada como resultado del bloqueo de la conducción unidireccional en la zona borde y en la zona isquémica. Además, los latidos estimulados también desarrollaron el bloqueo de la conducción unidireccional cuando la onda de propagación cruzó la zona borde hacia la zona isquémica, dando lugar al inicio de reentrada.

La alternancia eléctrica representa otro mecanismo arritmogénico que es bien reconocido experimentalmente. En nuestros cultivos durante reentrada, los impulsos



que se propagaron hacia la zona isquémica mostraron la alternancia del calcio citosólico. Esta observación es común en el modelo de isquemia de los corazones intactos.<sup>72, 73</sup> En nuestro modelo no hemos detectado la alternancia de la duración del potencial de acción acompañando a la alternancia del calcio citosólico. Esto lo atribuimos a que la duración del potencial de acción es más corto durante la isquemia y la variación latido a latido del mismo sea inferior al límite de detección del sistema. Sin embargo, la alternancia del calcio citosólico que observamos fue seguida del bloqueo de la conducción, lo que refleja de forma indirecta un acoplamiento bidireccional entre la duración del potencial de acción y el calcio citosólico.<sup>50,74</sup> En nuestros cultivos de monocapa, el mecanismo de la alternancia del calcio durante la isquemia aguda es probablemente originado por las alteraciones dinámicas del sistema del calcio “per se” (particularmente por una disminución de la actividad de la ATPasa del retículo sarcoplasmático).<sup>50</sup> Es conocido que la isquemia conlleva un aplanamiento de la curva de restitución de la duración del potencial de acción, por lo que el voltaje de membrana no parece jugar un papel predominante como líder de la alternancia eléctrica durante la isquemia.<sup>75</sup> Sin embargo, no hemos determinado la curva de restitución del potencial de acción en nuestro modelo.

En referencia a las arritmias por reentrada, nuestros hallazgos han sido coherentes con los observados experimentalmente en el corazón intacto sometido a la isquemia regional.<sup>67</sup> Estos modelos tridimensionales donde se mapea solo la superficie, presentan el inconveniente de que los eventos bajo la superficie pueden ser relevantes



para explicar los mecanismos básicos de las arritmias (la fractura de la onda y el mantenimiento de la reentrada). Nuestro modelo bidimensional carece de esa limitación. Nuestros datos demuestran que la zona borde representa un área crítica donde se sitúan los circuitos de reentrada. En nuestro modelo, la zona isquémica es el área donde con más frecuencia se produce la fractura de la onda de propagación. Previamente, se ha descrito que el anclaje de los circuitos de reentrada se produce en regiones con heterogeneidad espacial de las condiciones electrofisiológicas.<sup>41, 53</sup> En el corazón intacto, la fractura de onda se produce también frecuentemente en la zona isquémica,<sup>48, 51</sup> aunque asimismo en la zona borde.<sup>52</sup> Otra similitud con los estudios en el corazón intacto<sup>76</sup> es que hemos observado un patrón fibrilatorio con rotores “madre”. Posteriormente la zona central perdió completamente la excitabilidad, por lo que el patrón fibrilatorio se convirtió en una macro-reentrada que gira en torno a un centro isquémico inactivo.

#### **V.D. Las arritmias durante la fase de reperfusión y los efectos en la conexina 43**

En las arritmias durante la reperfusión estudiadas en el corazón intacto se han implicado tanto mecanismos focales como reentrantes.<sup>27</sup> En nuestro modelo, la retirada del cristal daba paso al inicio de la reperfusión. Hemos observado una recuperación de la excitabilidad más rápida que la recuperación de la velocidad de conducción. En estudios previos, se ha demostrado que la sobrecarga del calcio intracelular favorece



arritmias en la isquemia y la reperfusión,<sup>14</sup> promoviendo la actividad desencadenada y el descenso del acoplamiento intercelular.<sup>77</sup> No hemos podido determinar de forma directa la contribución de la sobrecarga de calcio intracelular o visualizar la actividad focal que iniciara reentrada en la fase de reperfusión. Sin embargo, pudimos documentar que el tejido reperfundido era altamente arritmogénico, exhibiendo patrones de tipo fibrilatorio en las fases precoces de la reperfusión. Además, cuando la velocidad de conducción se recuperó hasta alcanzar los valores normales, este estado fibrilatorio se resolvió de forma espontánea. Se ha de destacar que la recuperación en la velocidad de conducción se asoció temporalmente con la recuperación de la fosforilación de la conexina 43. En el corazón intacto, no se había caracterizado en detalle el curso temporal de la recuperación de la fosforilación de la conexina 43. Por consiguiente, estos hallazgos son novedosos y permiten postular que el retraso en la fosforilación de la conexina 43 sea un factor significativo en las arritmias durante la reperfusión. Esto explicaría la persistencia en el descenso de la velocidad de conducción, cuando la excitabilidad se ha recuperado, creando así un substrato arritmogénico en la zona reperfundida.





## **V.E. Implicaciones de tipo clínico-experimental.**

Este modelo presenta, por consiguiente, una potencial utilidad para los futuros estudios de isquemia aguda y arritmogénesis, puesto que se mimetizan la vasta mayoría de los efectos de la isquemia aguda en los modelos in vivo. En contraste con otros modelos, esta preparación promoverá el establecer más fácilmente las relaciones de tipo mecanístico entre los fenómenos eléctricos y los eventos de tipo químico o molecular. Estos hallazgos podrán ser estudiados en otros modelos o en humanos. Además, este nuevo modelo permitirá el testado de fármacos antiarrítmicos o intervenciones cardioprotectoras de una forma muy ventajosa, debido a que la zona de transición (peri-isquémica) está bien demarcada y es menos compleja anatómicamente que en otros modelos de corazón intacto. Una potencial área para próximos estudios en esta preparación es el daño post-reperfusión y la prevención del mismo.



## Limitaciones del estudio

Los cultivos de miocitos de rata neonata sometidos a la isquemia regional presentan múltiples similitudes con el método de oclusión coronaria en el corazón intacto. Sin embargo, la extrapolación de estos resultados debe ser realizada con cautela en los grandes mamíferos, incluyendo los humanos. Los miocitos de rata neonata son inmaduras, con propiedades electrofisiológicas y con un sistema del calcio intracelular diferente a las características propias de los miocitos adultos del ventrículo.<sup>57</sup> El sistema metabólico y el funcionamiento de la conexina 43 también pueden ser diferentes. Además, la oclusión coronaria presenta por ejemplo grados variables de circulación colateral y otros factores que no estarían presentes en este modelo.<sup>78</sup>

Se debe hacer referencia que hemos determinado el nivel diastólico del calcio citosólico en términos relativos, pero una determinación de la concentración de los niveles de calcio en términos absolutos no fue posible debido al efecto del “blanqueado” que sufren los colorantes sensibles a la luz con el tiempo de exposición.

Los cultivos en monocapa carecen de alteraciones macroscópicas que sean significativas, sin embargo las heterogeneidades anatómicas de tipo microscópico pueden estar presentes.



## CONCLUSIONES

Pitt y col,<sup>55</sup> en un estudio muy elegante, presentaron previamente un nuevo método de inducción de isquemia regional. Estos autores validaron su modelo y demostraron que producía los cambios metabólicos y morfológicos típicos de la isquemia aguda.

En la UCLA hemos desarrollado un modelo experimental de tipo bidimensional con cultivos en monocapa de miocitos de rata neonata. A estos cultivos, hemos aplicado la técnica de mapeo óptico para detectar la señal del voltaje de membrana y del calcio intracelular. De esta forma, hemos obtenido las características electrofisiológicas más significativas (la duración del potencial de acción, la velocidad de conducción, el calcio intracelular) así como los patrones de propagación o arritmogénicos (la excitabilidad, la presencia de extrasistolia, la reentrada, los patrones fibrilatorios) durante la isquemia aguda y la reperfusión en el cultivo de miocitos en monocapa. La ventaja este modelo cardiaco, es que carece de la complejidad de los modelos tridimensionales, que poseen heterogeneidades macroscópicas importantes como vasos coronarios, cambios de orientación en las fibras o fibrosis. Esto permite analizar las características electrofisiológicas sin otros factores que podrían introducir “confusión” en los resultados.

Además, el modelo en monocapa elimina la participación de los eventos que acontecen por debajo de la superficie epicárdica o a nivel intramural.



En la presenta tesis<sup>64</sup> se ha adaptado este método de inducción de isquemia de Pitts a nuestro modelo bidimensional cardiaco de cultivos en monocapa de miocitos sometidos a la técnica de mapeo óptico y hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1. Por primera vez, hemos estudiado los cambios electrofisiológicos y la producción de arritmias que suceden al aplicar este método de isquemia regional. Nuestros hallazgos reproducen los típicos fenómenos electrofisiológicos y arritmogénicos que acaecen durante la isquemia y la reperfusión.
2. En este modelo, la zona borde (peri-isquémica) representa una región de anclaje de los circuitos de reentrada. La fractura de la onda de propagación, un fenómeno también crucial para el mantenimiento del estado fibrilatorio, se produce con mayor frecuencia en la zona isquémica.
3. Durante la fase isquémica, existe un descenso de la velocidad de conducción que se asocia con un aumento de la forma no fosforilada de la conexina 43 (forma no funcional). En la fase de reperfusión, se normaliza progresivamente la velocidad de conducción, lo que se correlaciona con el descenso de la forma no fosforilada de la conexina 43.



## Bibliografía

1. Marrugat J, Elosua R, Gil M. [epidemiology of sudden cardiac death in Spain]. *Revista española de cardiología*. 1999;52:717-725
2. Turakhia M, Tseng ZH. Sudden cardiac death: Epidemiology, mechanisms, and therapy. *Current problems in cardiology*. 2007;32:501-546
3. Bayes de Luna A, Coumel P, Leclercq JF. Ambulatory sudden cardiac death: Mechanisms of production of fatal arrhythmia on the basis of data from 157 cases. *American heart journal*. 1989;117:151-159
4. Guindo J, Bayes de Luna A. [ischemic heart disease (xii). Sudden death in ischemic heart disease]. *Revista española de cardiología*. 1989;42:116-125
5. Zipes DP, Wellens HJ. Sudden cardiac death. *Circulation*. 1998;98:2334-2351
6. Lopshire JC, Zipes DP. Sudden cardiac death: Better understanding of risks, mechanisms, and treatment. *Circulation*. 2006;114:1134-113



7. Perez G, Pena A, Sala J, Roset P, Masia R, Marrugat J. Acute myocardial infarction case fatality, incidence and mortality rates in a population registry in gerona, spain, 1990-1992. Regicor investigators. *International journal of epidemiology*. 1998;27:599-604
8. José R. Banegas FV, Auxiliadora Graciani y Fernando Rodríguez-Artalejo. Cardiovascular disease epidemiology in spain. *Revista española de cardiología*. 2006; Supl.;6:3G-12G
9. Yeh RW, Sidney S, Chandra M, Sorel M, Selby JV, Go AS. Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2010;362:2155-2165
10. Preliminary report: Effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. The cardiac arrhythmia suppression trial (cast) investigators. *The New England journal of medicine*. 1989;321:406-412
11. Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, Pitt B, Pratt CM, Schwartz PJ, Veltri EP. Effect of d-sotalol on mortality in patients with left



ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The sword investigators. Survival with oral d-sotalol. *Lancet*. 1996;348:7-12

12. Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Brown MW, Andrews ML, Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial III. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *The New England journal of medicine*. 2002;346:877-883

13. Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *The New England journal of medicine*. 2001;345:1473-1482

14. Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: From channels to arrhythmias. *Physiological reviews*. 1999;79:917-1017

15. Rodriguez-Sinovas A, Cinca J. [sudden death (ii). Myocardial ischemia and ventricular arrhythmias in experimental models: Triggering mechanisms]. *Revista espanola de cardiologia*. 1999;52:851-859



16. Downar E, Janse MJ, Durrer D. The effect of "ischemic" blood on transmembrane potentials of normal porcine ventricular myocardium. *Circulation*. 1977;55:455-462
  
17. Pandit SV, Noujaim SF, Jalife J. Postrepolarization refractoriness in acute ischemia and after antiarrhythmic drug administration. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2012;9:e13-14
  
18. Holland RP, Brooks H. The qrs complex during myocardial ischemia. An experimental analysis in the porcine heart. *The Journal of clinical investigation*. 1976;57:541-550
  
19. Kleber AG, Janse MJ, Wilms-Schopmann FJ, Wilde AA, Coronel R. Changes in conduction velocity during acute ischemia in ventricular myocardium of the isolated porcine heart. *Circulation*. 1986;73:189-198
  
20. Kleber AG, Riegger CB, Janse MJ. Electrical uncoupling and increase of extracellular resistance after induction of ischemia in isolated, arterially perfused rabbit papillary muscle. *Circulation research*. 1987;61:271-279





21. Cinca J, Warren M, Carreno A, Tresanchez M, Armadans L, Gomez P, Soler-Soler J. Changes in myocardial electrical impedance induced by coronary artery occlusion in pigs with and without preconditioning: Correlation with local st-segment potential and ventricular arrhythmias. *Circulation*. 1997;96:3079-3086
  
22. Cinca J, Warren M, Rodriguez-Sinovas A, Tresanchez M, Carreno A, Bragos R, Casas O, Domingo A, Soler-Soler J. Passive transmission of ischemic st segment changes in low electrical resistance myocardial infarct scar in the pig. *Cardiovascular research*. 1998;40:103-112
  
23. Lee HC, Mohabir R, Smith N, Franz MR, Clusin WT. Effect of ischemia on calcium-dependent fluorescence transients in rabbit hearts containing indo 1. Correlation with monophasic action potentials and contraction. *Circulation*. 1988;78:1047-1059
  
24. Gupta A, Hoang DD, Karlner L, Tice JA, Heidenreich P, Wang PJ, Turakhia MP. Ability of microvolt t-wave alternans to modify risk assessment of ventricular tachyarrhythmic events: A meta-analysis. *American heart journal*. 2012;163:354-364



25. Harris AS RA. The initiation of ventricular fibrillation due to coronary occlusion. *Experimental medicine and surgery*. 1943;1: 105-122
  
26. Janse MJ, van Capelle FJ, Morsink H, Kleber AG, Wilms-Schopman F, Cardinal R, d'Alnoncourt CN, Durrer D. Flow of "injury" current and patterns of excitation during early ventricular arrhythmias in acute regional myocardial ischemia in isolated porcine and canine hearts. Evidence for two different arrhythmogenic mechanisms. *Circulation research*. 1980;47:151-165
  
27. Pogwizd SM, Corr PB. Reentrant and nonreentrant mechanisms contribute to arrhythmogenesis during early myocardial ischemia: Results using three-dimensional mapping. *Circulation research*. 1987;61:352-371
  
28. Kaplinsky E, Ogawa S, Balke CW, Dreifus LS. Two periods of early ventricular arrhythmia in the canine acute myocardial infarction model. *Circulation*. 1979;60:397-403
  
29. Pogwizd SM, Corr PB. Mechanisms underlying ventricular tachycardia and fibrillation in the ischemic heart: Relation to nonlinear dynamics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990;591:278-300



30. Lukas A, Antzelevitch C. Phase 2 reentry as a mechanism of initiation of circus movement reentry in canine epicardium exposed to simulated ischemia. *Cardiovascular research*. 1996;32:593-603
31. Xie F, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN. Effects of simulated ischemia on spiral wave stability. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2001;280:H1667-1673
32. Janse MJ, Cinca J, Morena H, Fiolet JW, Kleber AG, de Vries GP, Becker AE, Durrer D. The "border zone" in myocardial ischemia. An electrophysiological, metabolic, and histochemical correlation in the pig heart. *Circulation research*. 1979;44:576-588
33. Arnar DO, Bullinga JR, Martins JB. Role of the purkinje system in spontaneous ventricular tachycardia during acute ischemia in a canine model. *Circulation*. 1997;96:2421-2429
34. Janse MJ, van Capelle FJ. Electrotonic interactions across an inexcitable region as a cause of ectopic activity in acute regional myocardial ischemia. A study in intact porcine and canine hearts and computer models. *Circulation research*. 1982;50:527-537



35. Kumar R, Joyner RW. An experimental model of the production of early after depolarizations by injury current from an ischemic region. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1994;428:425-432
36. Dart AM, Schomig A, Dietz R, Mayer E, Kubler W. Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part b: Effect of sympathetic nerve stimulation. *Circulation research*. 1984;55:702-706
37. Russell DC, Lawrie JS, Riemersma RA, Oliver MF. Mechanisms of phase 1a and 1b early ventricular arrhythmias during acute myocardial ischemia in the dog. *The American journal of cardiology*. 1984;53:307-312
38. Cinca J, Bardaji A, Salas-Caudevilla A. Ventricular arrhythmias and local electrograms after chronic regional denervation of the ischemic area in the pig heart. *Journal of the American College of Cardiology*. 1989;14:225-232
39. Penny WJ. The deleterious effects of myocardial catecholamines on cellular electrophysiology and arrhythmias during ischaemia and reperfusion. *European heart journal*. 1984;5:960-973



40. Molina-Viamonte V, Anyukhovskiy EP, Rosen MR. An alpha-1-adrenergic receptor subtype is responsible for delayed afterdepolarizations and triggered activity during simulated ischemia and reperfusion of isolated canine Purkinje fibers. *Circulation*. 1991;84:1732-1740
41. Weiss JN, Qu Z, Chen PS, Lin SF, Karagueuzian HS, Hayashi H, Garfinkel A, Karma A. The dynamics of cardiac fibrillation. *Circulation*. 2005;112:1232-1240
42. Weiss JN, Chen PS, Qu Z, Karagueuzian HS, Garfinkel A. Ventricular fibrillation: How do we stop the waves from breaking? *Circulation research*. 2000;87:1103-1107
43. El Sherif N, Scherlag BJ, Lazzara R. Electrode catheter recording during malignant ventricular arrhythmia following experimental acute myocardial ischemia. Evidence for re-entry due to conduction delay and block in ischemic myocardium. *Circulation*. 1975;51:1003-1014
44. Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *American heart journal*. 1964;67:200-220



45. Allesie MA LW, Bonke FIM, Hollen J. Experimental evaluation of moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. *In: Zipes DP, Jalife J, eds. Cardiac Arrhythmias. New York: Grune & Stratton. 1985::265–276.*
46. Allesie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. *Circulation research. 1973;33:54-62*
47. Davidenko JM, Pertsov AV, Salomonsz R, Baxter W, Jalife J. Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle. *Nature. 1992;355:349-351*
48. Liu YB, Pak HN, Lamp ST, Okuyama Y, Hayashi H, Wu TJ, Weiss JN, Chen PS, Lin SF. Coexistence of two types of ventricular fibrillation during acute regional ischemia in rabbit ventricle. *Journal of cardiovascular electrophysiology. 2004;15:1433-1440*
49. Karma A. Electrical alternans and spiral wave breakup in cardiac tissue. *Chaos. 1994;4:461-472*
50. Weiss JN, Karma A, Shiferaw Y, Chen PS, Garfinkel A, Qu Z. From pulsus to pulseless: The saga of cardiac alternans. *Circulation research. 2006;98:1244-1253*



51. Rankovic V, Patel N, Jain S, Robinson N, Goldberger J, Horvath G, Kadish A. Characteristics of ischemic and peri-ischemic regions during ventricular fibrillation in the canine heart. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 1999;10:1090-1100
52. Zaitsev AV, Guha PK, Sarmast F, Kolli A, Berenfeld O, Pertsov AM, de Groot JR, Coronel R, Jalife J. Wavebreak formation during ventricular fibrillation in the isolated, regionally ischemic pig heart. *Circulation research*. 2003;92:546-553
53. Valderrabano M, Lee MH, Ohara T, Lai AC, Fishbein MC, Lin SF, Karagueuzian HS, Chen PS. Dynamics of intramural and transmural reentry during ventricular fibrillation in isolated swine ventricles. *Circulation research*. 2001;88:839-848
54. Kim YH, Xie F, Yashima M, Wu TJ, Valderrabano M, Lee MH, Ohara T, Voroshilovsky O, Doshi RN, Fishbein MC, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN, Karagueuzian HS, Chen PS. Role of papillary muscle in the generation and maintenance of reentry during ventricular tachycardia and fibrillation in isolated swine right ventricle. *Circulation*. 1999;100:1450-1459
55. Pitts KR, Toombs CF. Coverslip hypoxia: A novel method for studying cardiac myocyte hypoxia and ischemia in vitro. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2004;287:H1801-1812



56. de Diego C, Pai RK, Dave AS, Lynch A, Thu M, Chen F, Xie LH, Weiss JN, Valderrabano M. Spatially discordant alternans in cardiomyocyte monolayers. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2008;294:H1417-1425
57. Rohr S, Scholly DM, Kleber AG. Patterned growth of neonatal rat heart cells in culture. Morphological and electrophysiological characterization. *Circulation research*. 1991;68:114-130
58. Kwong KF, Schuessler RB, Green KG, Laing JG, Beyer EC, Boineau JP, Saffitz JE. Differential expression of gap junction proteins in the canine sinus node. *Circulation research*. 1998;82:604-612
59. Nagy JI, Ochalski PA, Li J, Hertzberg EL. Evidence for the co-localization of another connexin with connexin-43 at astrocytic gap junctions in rat brain. *Neuroscience*. 1997;78:533-548
60. Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kleber AG, Schuessler RB, Saffitz JE. Dephosphorylation and intracellular redistribution of





ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circulation research*. 2000;87:656-662

61. Patterson E, Lazzara R, Szabo B, Liu H, Tang D, Li YH, Scherlag BJ, Po SS. Sodium-calcium exchange initiated by the  $ca^{2+}$  transient: An arrhythmia trigger within pulmonary veins. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47:1196-1206

62. Zaitsev AV, Berenfeld O, Mironov SF, Jalife J, Pertsov AM. Distribution of excitation frequencies on the epicardial and endocardial surfaces of fibrillating ventricular wall of the sheep heart. *Circulation research*. 2000;86:408-417

63. Wu TJ, Lin SF, Weiss JN, Ting CT, Chen PS. Two types of ventricular fibrillation in isolated rabbit hearts: Importance of excitability and action potential duration restitution. *Circulation*. 2002;106:1859-1866

64. de Diego C, Pai RK, Chen F, Xie LH, De Leeuw J, Weiss JN, Valderrabano M. Electrophysiological consequences of acute regional ischemia/reperfusion in neonatal rat ventricular myocyte monolayers. *Circulation*. 2008;118:2330-2337



65. Yamada KA, McHowat J, Yan GX, Donahue K, Peirick J, Kleber AG, Corr PB. Cellular uncoupling induced by accumulation of long-chain acylcarnitine during ischemia. *Circulation research*. 1994;74:83-95
66. Riegger CB, Alperovich G, Kleber AG. Effect of oxygen withdrawal on active and passive electrical properties of arterially perfused rabbit ventricular muscle. *Circulation research*. 1989;64:532-541
67. Janse MJ, Wit AL. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiological reviews*. 1989;69:1049-1169
68. Harris AS. Delayed development of ventricular ectopic rhythms following experimental coronary occlusion. *Circulation*. 1950;1:1318-1328
69. Arutunyan A, Swift LM, Sarvazyan N. Initiation and propagation of ectopic waves: Insights from an in vitro model of ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2002;283:H741-749



70. Arnar DO, Martins JB. Purkinje involvement in arrhythmias after coronary artery reperfusion. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology.* 2002;282:H1189-1196

71. Chou CC, Zhou S, Hayashi H, Nihei M, Liu YB, Wen MS, Yeh SJ, Fishbein MC, Weiss JN, Lin SF, Wu D, Chen PS. Remodelling of action potential and intracellular calcium cycling dynamics during subacute myocardial infarction promotes ventricular arrhythmias in langendorff-perfused rabbit hearts. *The Journal of physiology.* 2007;580:895-906

72. Dilly SG, Lab MJ. Electrophysiological alternans and restitution during acute regional ischaemia in myocardium of anaesthetized pig. *The Journal of physiology.* 1988;402:315-333

73. Wu Y, Clusin WT. Calcium transient alternans in blood-perfused ischemic hearts: Observations with fluorescent indicator fura red. *The American journal of physiology.* 1997;273:H2161-2169



74. Kaplan P, Hendrikx M, Mattheussen M, Mubagwa K, Flameng W. Effect of ischemia and reperfusion on sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *Circulation research*. 1992;71:1123-1130
75. Taggart P, Sutton PM, Boyett MR, Lab M, Swanton H. Human ventricular action potential duration during short and long cycles. Rapid modulation by ischemia. *Circulation*. 1996;94:2526-2534
76. Wu TJ, Lin SF, Hsieh YC, Ting CT, Chen PS. Ventricular fibrillation during no-flow global ischemia in isolated rabbit hearts. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 2006;17:1112-1120
77. Ter Keurs HE, Boyden PA. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiological reviews*. 2007;87:457-506
78. Seiler C, Fleisch M, Garachemani A, Meier B. Coronary collateral quantitation in patients with coronary artery disease using intravascular flow velocity or pressure measurements. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;32:1272-1279