

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DEL  
CALCIO Y LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA QUE SE  
ASOCIAN CON LA FIBRILACIÓN AURICULAR  
EN MIOCITOS AURICULARES HUMANOS Y UN  
MODELO PORCINO DE INFARTO AURICULAR

Tesis presentada por Sergi Casabella Ramón para la obtención del grado de Doctor.

Director y tutor: Dr. Marcel Jiménez Farrerons  
Director: Dr. Leif Hove Madsen

Año: 2023

Programa de doctorado en Neurociencias

Universitat Autònoma de Barcelona



D. Marcel Jiménez Farrerons, doctor en Veterinaria y catedrático del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona, y D. Leif Hove Madsen, doctor en Biología y científico titular del CSIC en el Departamento Patología Experimental, certifican que la tesis titulada “ Alteraciones en la homeostasis del calcio y la actividad eléctrica que se asocian con la fibrilación auricular en miocitos auriculares humanos y un modelo porcino de infarto auricular” ha sido realizada bajo su dirección en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona por D. Sergi Casabella Ramón, licenciado en Veterinaria y consideran que esta tesis se encuentra terminada y reúne los requisitos necesarios para que el interesado pueda optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona.

En Barcelona, octubre de 2023

Doctorando

Director y tutor

Director

Sergi Casabella Ramón

Marcel Jiménez Farrerons

Leif Hove Madsen



## **AGRADECIMIENTOS**

Vull agrair especialment al Dr. Leif Hove Madsen tot el que m'ha ensenyat, tant en la ciència com en la vida, i per haver-me deixat formar part del seu equip durant quasi cinc anys.

També, li agrairé sempre al Dr. Marcel Jiménez Farrerons que m'hagi ajudat a arribar fins aquí i que m'hagi donat l'oportunitat de donar classes a la Facultat de Veterinària de la UAB. Per mi, ha sigut el millor professor que he tingut mai.

Al Dr. Juan Cinca, Dr. Gerard Amorós, Dra. Laura Casaní i Dr. Jose Guerra per tot el que m'han ensenyat i espero que continuïn ensenyant-me.

A la Verónica per tot el suport emocional durant la tesi i que sempre ha estat disposada a ajudar-me per poder-la fer realitat.

A la Paloma pels moments cantant al laboratori i debatent sobre la vida.

I també, molt especialment li vull agrair a la Cristina, per passar a ser una de les persones més importants a la meva vida.

Als meus estimats pares i germà, per l'amor i l'ajuda constant i incondicional.

A la meva estimada sogra, per ser un àngel.

I per acabar, al Jordi i Xavi, per ser part fonamental en la meva vida i estimar-me tant.



## ABREVIATURAS

AC: Adenilil ciclasa

ACh: Acetilcolina

ADA: Adenosina desaminasa

AV: Atrioventricular

Ca<sup>2+</sup>: Ion calcio

CaM: Calmodulina

CaMKII: Proteína quinasa II dependiente de calcio- CaM

Ca<sub>v</sub>1.2: Canal de calcio tipo L

CSQ-2: Calsecuestrina cardíaca (tipo 2)

DAD: *Delayed afterdepolarization* o despolarización espontánea de membrana tardía

EAD: *Early afterdepolarization* o despolarización espontánea de membrana temprana

FA: Fibrilación auricular

IA: Infarto auricular

I<sub>Ca</sub>: Corriente de calcio

I<sub>CaL</sub>: Corriente de calcio tipo L

I<sub>CaT</sub>: Corriente de calcio tipo T

I<sub>f</sub>: *Funny current* o corriente marcapaso

I<sub>Na</sub>: Corriente de sodio

I<sub>TI</sub>: *Transient inward currents* o corrientes transitorias de entrada

LCX: Arteria coronaria circunfleja izquierda

M<sub>2</sub>: Receptor muscarínico (tipo 2)

NCX: Intercambiador sodio - calcio

PA: Potencial de acción

PDE *Phosphodiesterase* o fosfodiesterasa

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PLB: *Phospholamban* o fosfolamban

RS: Retículo sarcoplasmático

RyR2: Receptor de rianodina cardíaco (tipo 2)

SA: Sinoatrial

SERCA: ATPasa de calcio cardíaca del RS

SK: Canal de potasio activado por calcio.

SNA: Sistema nervioso autónomo

TnC: Troponina C

TnI: Troponina I

TnT: Troponina T

Túbulos T: Túbulos transversos

$V_m$ : Potencial de membrana

# ÍNDICE

1. RESUMEN.....	11
2. INTRODUCCIÓN.....	18
2.1. LA EXCITACIÓN ELÉCTRICA DE LOS CARDIOMIOCITOS.....	18
2.1.1. POTENCIAL DE ACCIÓN CARDÍACO.....	20
2.1.2. CANALES DE IONES TRANSMEMBRANA Y TRANSPORTADORES EN EL CORAZÓN.....	22
2.1.3. POTENCIALES DE ACCIÓN ESPECÍFICOS DE CADA TEJIDO.....	29
2.1.4. ELECTROCARDIOGRAMA.....	32
2.2. ESTRUCTURA DEL CARDIOMIOCITO.....	33
2.2.1. EL SARCÓMERO DEL MÚSCULO ESTRIADO.....	33
2.2.2. REGULACIÓN DE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO ESTRIADO.	34
2.3. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN - CONTRACCIÓN CARDIACA.....	36
2.3.1. CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES: LA DÍADA.....	37
2.3.2. REGULACIÓN DEL CONTENIDO DE CALCIO DEL RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO.....	38
2.3.3. RECEPTORES DE RIANODINA TIPO 2 (RYR2).....	38
2.3.4. LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DEL CALCIO.....	39
2.4. LA FIBRILACIÓN AURICULAR.....	40
2.4.1. MECANISMOS ELECTROFISIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA APARICIÓN INICIAL DE FIBRILACIÓN AURICULAR.....	42
2.5. PAPEL DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO EN LA REGULACIÓN DEL RITMO AURICULAR.....	47
2.5.1. REMODELACIÓN AUTONÓMICA Y FIBRILACIÓN AURICULAR.....	52
2.5.2. EFECTOS AUTONÓMICOS SOBRE LOS MECANISMOS QUE GOBIERNAN LA APARICIÓN DE FIBRILACIÓN AURICULAR.....	52

2.6.	EL INFARTO Y LA FIBRILACIÓN AURICULAR .....	54
2.7.	LA FIBROSIS Y LA FIBRILACIÓN AURICULAR.....	54
2.8.	LA INFLAMACIÓN Y LA FIBRILACIÓN AURICULAR.....	55
2.9.	MODELOS ANIMALES DE FIBRILACIÓN AURICULAR .....	55
2.9.1.	PEQUEÑOS MODELOS ANIMALES DE FIBRILACIÓN AURICULAR.....	56
2.9.2.	MODELOS ANIMALES GRANDES DE FIBRILACIÓN AURICULAR 59	
2.9.3.	ELABORACIÓN DE UN MODELO PROPIO PARA ESTUDIAR LA FIBRILACIÓN AURICULAR .....	63
3.	RESULTADOS .....	65
3.1.	Artículo 1: <i>Beta-blocker treatment of patients with atrial fibrillation attenuates spontaneous calcium release-induced electrical activity.</i> .....	65
3.2.	Artículo 2: <i>Impact of R-Carvedilol on <math>\beta</math>2-Adrenergic Receptor-Mediated Spontaneous Calcium Release in Human Atrial Myocytes</i> .....	77
3.3.	Artículo 3: <i>Changes in Local Atrial Electrograms and Surface ECG Induced by Acute Atrial Myocardial Infarction.</i> .....	91
3.4.	Artículo 4: <i>Electrophysiological and histological characterization of atrial scarring in a model of isolated atrial myocardial infarction</i> .....	101
4.	DISCUSIÓN.....	110
4.1.	SEÑALIZACIÓN $\beta$ -ADRENÉRGICO COMO DIANA PARA REGULAR PROCESOS DE REMODELADO ELÉCTRICO. ....	111
4.2.	DESARROLLO DE UN MODELO PORCINO DE ISQUEMIA AURICULAR PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DE ARRITMIAS AURICULARES.....	115
4.3.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	118
5.	CONCLUSIONES .....	119
6.	BIBLIOGRAFÍA .....	120

# 1. RESUMEN

## Antecedentes:

La fibrilación auricular (FA) se ha asociado a anomalías estructurales, moleculares y electrofisiológicas en la aurícula (1). El sistema nervioso autónomo desempeña un papel muy relevante en el inicio y mantenimiento de esta enfermedad ya que puede inducir cambios significativos y heterogéneos en la electrofisiología auricular. Se ha demostrado que los métodos que reducen la inervación autónoma en la aurícula reducen la incidencia de arritmias por lo que la neuromodulación puede ser útil para controlar la FA (2). Además, se ha observado un aumento en la densidad en la inervación simpática en muestras auriculares de pacientes con FA (2–5). Este aumento del tono simpática es el resultado de la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos acoplados a una proteína Gs (2,6), que estimula adenilil ciclasa (AC) aumentando los niveles de AMP cíclico con la posterior activación de la proteína quinasa A (PKA) (2,6,7). Ésta última, activa proteínas que se encargan de regular la homeostasis del calcio como el receptor de rianodina de tipo 2 (RyR2) (8,9). La hiperfosforilación de este receptor es de gran importancia ya que ésta se ha relacionado con un incremento en la liberación espontánea de calcio desde el retículo sarcoplasmático (RS) (2,10–13).

En la clínica, se usan antagonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos como tratamiento para pacientes con arritmias auriculares (2), sobre todo para controlar la frecuencia cardíaca de los pacientes. Sin embargo, estos fármacos también modifican la activación de RyR2 previniendo la actividad espontánea y las arritmias ventriculares (14), sugiriendo que también podrían prevenir la liberación espontánea de calcio y reducir la incidencia de postdespolarizaciones en pacientes con FA (15).

Otro factor que puede contribuir en la generación de arritmias auriculares es el infarto auricular (IA). Éste ocurre cuando se ocluyen ramas coronarias auriculares que normalmente provienen de los segmentos proximales de las arterias coronarias derecha o circunfleja izquierda (16). Además, su diagnóstico, a partir del electrocardiograma (ECG), es difícil y podría deberse a los sistemas de registro convencionales o al bajo impacto de la oclusión de la rama auricular en la estructura miocárdica local y la electrofisiología. En la clínica, los cambios en la onda P y la desviación del segmento PR son criterios que permiten sospechas de IA, pero son inconstantes y pueden requerir de un ECG de referencia (17). Además, se sabe que las alteraciones electrofisiológicas

intrínsecas inducidas por el infarto de miocardio auricular aislado provocan ralentización de la conducción auricular local, prolongación del período refractario y cambios en el segmento ST y el voltaje de los electrogramas auriculares locales (18–20), sustrato que podría propiciar las arritmias. Actualmente, la caracterización electrofisiológica de la cicatrización del IA, y su capacidad para inducir arritmias auriculares se ve obstaculizada por la escasez de modelos animales que imiten esta entidad clínica.

### **Hipótesis:**

La manipulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos es capaz de modificar la homeostasis del calcio y la actividad eléctrica espontánea en miocitos auriculares aislados humanos, siendo una posible diana terapéutica para el control de arritmias auriculares.

Un modelo experimental porcino de infarto auricular es idóneo para investigar cambios estructurales y electrofisiológicos en la aurícula capaces de generar un sustrato para el inicio y mantenimiento de arritmias auriculares.

### **Objetivos:**

Debido a que los antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos se usan en la práctica clínica como tratamiento para la fibrilación auricular, el **primer objetivo** es evaluar cómo el tratamiento de los pacientes con bloqueadores  $\beta$  afecta la fosforilación de las proteínas reguladoras del calcio dependiente de AMP cíclico, la liberación espontánea de calcio y las corrientes en miocitos auriculares aislados, con el fin de determinar el impacto de este tratamiento en la homeostasis del calcio intracelular.

El **segundo objetivo** es estudiar cómo la manipulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos afecta a la homeostasis del calcio y a la actividad eléctrica espontánea de este mismo ion en miocitos auriculares humanos aislados de pacientes con y sin fibrilación auricular.

La oclusión de una rama coronaria auricular es una entidad clínica difícilmente reconocible que puede promover la fibrilación auricular. El **tercer objetivo** es poner a punto un modelo experimental de infarto auricular en cerdo (modelo experimental cercano a la anatomía y electrofisiología cardíacas humanas), para futuros estudios de remodelación eléctrica y estructural, y de arritmias cardíacas auriculares.

## **Métodos:**

Para el estudio electrofisiológico, los experimentos se llevaron a cabo en miocitos auriculares humanos aislados. Se utilizó la técnica de patch-clamp (en la configuración de voltaje-clamp) para medir la corriente de calcio ( $I_{Ca}$ ) y sus características electrofisiológicas, así como las corrientes transitorias de entrada ( $I_{TI}$ ) o la configuración de current-clamp para medir las despolarizaciones espontáneas de membrana. Para visualizar el calcio intracelular se utilizó microscopia confocal. La expresión de proteínas se determinó mediante la técnica de western blot y su distribución se analizó con marcaje inmunofluorescente.

Para el modelo de IA, se utilizó cerdos anestesiados y bajo analgesia. A seis de ellos se les abrió el tórax y se sometieron a oclusión quirúrgica de una rama coronaria auricular, surgida de la arteria coronaria derecha, durante 4 h. Se registraron simultáneamente electrogramas auriculares y ECG. Además, un cerdo adicional actuó como *sham*. En todos los casos, los corazones fueron procesados para análisis anatomopatológico. Para la segunda parte de la generación del modelo, se sometieron a siete cerdos a oclusión de la rama coronaria auricular, sin abrir el tórax. Se usaron dos animales adicionales como controles para el mapeo de voltaje endocárdico y datos de impedancia multifrecuencia.

## **Resultados:**

La densidad de la corriente de calcio ( $I_{Ca}$ ) de tipo L disminuyó significativamente en pacientes con FA crónica pero no paroxística y el tratamiento de pacientes con  $\beta$ -bloqueantes no afectó la densidad de  $I_{Ca}$  en ningún grupo. Por el contrario, la frecuencia de  $I_{TI}$  aumentó en pacientes con FA paroxística o crónica que no recibieron tratamiento, y el tratamiento con  $\beta$ - bloqueantes redujo la frecuencia a los niveles observados en pacientes sin FA. Las imágenes confocales de calcio mostraron que el tratamiento con estos antagonistas también redujo la frecuencia de *sparks* de calcio en pacientes con FA a los niveles observados en aquellos sin FA. Además, la fosforilación del receptor de rianodina (RyR2) en Ser-2808 y de fosfolamban en Ser-16 fue significativamente menor en pacientes con FA que recibieron  $\beta$ -bloqueantes.

Una característica distintiva de la FA es un exceso de eventos de liberación espontánea de calcio, que pueden ser imitados por la estimulación adrenérgica  $\beta_1$  o  $\beta_2$ . De acuerdo con ello, el agonista  $\beta_2$ -adrenérgico Fenoterol, aumentó la incidencia de *sparks* y ondas de calcio a los niveles observados con el agonista  $\beta$ -adrenérgico no específico

Isoproterenol. Además, el Fenoterol aumentó tanto la amplitud como la duración de los *sparks*, facilitando su fusión en ondas de calcio. La aplicación posterior del enantiómero R-Carvedilol revirtió estos efectos inducidos por Fenoterol de una manera dependiente de la dosis. El R-Carvedilol también revirtió la fosforilación inducida por este agonista del RyR2 en Ser-2808 de forma dependiente de la dosis, y 1  $\mu\text{M}$  de R- o S-Carvedilol lo revirtió por completo. Por lo tanto, la estimulación  $\beta_2$ -adrenérgica, por si sola, estimula la fosforilación de RyR2 en Ser-2808 y la liberación espontánea de calcio, y apunta al Carvedilol como una herramienta para atenuar la activación patológica de los receptores  $\beta_2$ .

En nuestro modelo porcino, el infarto de miocardio afecta a la orejuela auricular izquierda sin afectar al miocardio ventricular, ya que no se registró elevación del segmento ST en el ECG de superficie en ningún caso y el análisis histológico descartó la presencia de infarto ventricular. Esto indica que el despliegue de un *stent* cubierto de Papyrus en el segmento proximal de la arteria circunfleja izquierda es un método exitoso para crear un modelo de isquemia miocárdica auricular aislado. Además, nuestro estudio abordó la fase de curación del IA y reveló, por primera vez, que las áreas de bajo voltaje también presentaban baja impedancia eléctrica tisular en todas las frecuencias de corriente.

## SUMMARY

### **Background:**

Atrial fibrillation (AF) has been associated with structural, molecular, and electrophysiological abnormalities in the atrium (1). The autonomic nervous system plays a crucial role in the onset and maintenance of this disease, as it can induce significant and heterogeneous changes in atrial electrophysiology. Methods that decrease autonomic innervation in the atrium have been shown to reduce the incidence of arrhythmias, making neuromodulation a potential approach to control AF. Furthermore, there has been a noted increase in sympathetic nerve density in atrial samples taken from patients with AF (2–5). This heightened sympathetic tone results from the activation of  $\beta$ -adrenergic receptors coupled to a Gs protein (2,6), which stimulates adenylate cyclase (AC) and increases cyclic AMP levels, leading to the subsequent activation of protein kinase A (PKA) (2,6,7). The PKA activates proteins responsible for regulating calcium homeostasis, such as the type 2 ryanodine receptor (RyR2) (8,9). Hyperphosphorylation of this receptor is of

significant importance, as it has been linked to increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum (SR) (2,10–13).

In clinical practice,  $\beta$ -adrenergic receptor antagonists are used to treat patients with atrial arrhythmias (2), mainly to control their heart rate. However, these drugs also modify RyR2 activation, which prevents spontaneous activity and ventricular arrhythmias (14). This suggests that such drugs may also prevent spontaneous calcium release and reduce the incidence of afterdepolarizations in patients with AF (15).

Another factor that may contribute to the generation of atrial arrhythmias is atrial infarction (AI). AIs occur when atrial coronary branches that normally arise from the proximal segments of the left circumflex or right arteries are occluded (16). Moreover, diagnosing AIs based on electrocardiograms (ECG) is challenging. This might be due to the use of conventional recording systems or to the limited impact that atrial branch occlusion has on the local myocardial structure and electrophysiology. In clinical practice, changes in the P-wave and PR segment deviation are indicators of a potential AI, but they are inconsistent and may require a reference ECG (17). Additionally, intrinsic electrophysiological alterations induced by isolated atrial myocardial infarction are known to lead to local atrial conduction slowing, prolonged refractory periods, and changes in the ST segment and in the voltage of local atrial electrograms (18–20), which could create a substrate for arrhythmias. Currently, the electrophysiological characterization of AI scarring and its potential to induce atrial arrhythmias is hindered by the scarcity of animal models that mimic this clinical entity.

### **Hypothesis:**

Manipulating  $\beta$ -adrenergic receptors can alter the calcium homeostasis and the spontaneous electrical activity in isolated human atrial myocytes, potentially serving as a therapeutic target to control atrial arrhythmias.

A porcine experimental model of atrial infarctions is ideal for investigating structural and electrophysiological changes in the atrium that can create a substrate for the initiation and maintenance of atrial arrhythmias.

## **Objectives:**

$\beta$ -adrenergic antagonists are used in clinical practice as a treatment for atrial fibrillation. Therefore, the **first objective** is to evaluate how treating patients with  $\beta$ -blockers affects the phosphorylation of cyclic AMP-dependent calcium regulatory proteins, the spontaneous calcium release, and the currents in isolated atrial myocytes. The aim is to determine the impact of this treatment on intracellular calcium homeostasis.

The **second objective** is to investigate how manipulating  $\beta$ -adrenergic receptors affects calcium homeostasis and the spontaneous electrical activity of such ions in isolated human atrial myocytes from patients with and without atrial fibrillation.

Atrial coronary branch occlusion is a clinically challenging-to-detect condition that can potentially trigger atrial fibrillation. The **third objective** is to develop an experimental model of atrial infarction in pigs (a model closely resembling human cardiac anatomy and electrophysiology) for future studies on electrical and structural remodeling and atrial cardiac arrhythmias.

## **Methodology:**

The electrophysiological study experiments were conducted on isolated human atrial myocytes. The calcium current ( $I_{Ca}$ ) and its electrophysiological characteristics, as well as transient inward currents ( $I_{Ti}$ ), were measured using the patch-clamp technique with the voltage-clamp configuration. To measure spontaneous membrane depolarizations, the current-clamp configuration was utilized. Confocal microscopy was used to visualize intracellular calcium. Protein expression was determined using the western blot technique, and their distribution was analyzed with immunofluorescent labeling.

For the AI model, anesthetized and analgesized pigs were used. Six of them had their chests opened, and they underwent surgical occlusion of an atrial coronary branch arising from the right coronary artery for 4 hours. Atrial electrograms and ECGs were recorded simultaneously. Furthermore, an additional pig acted as a sham. In all cases, their hearts were processed for histopathological analysis. For the second part of the model generation, seven pigs underwent occlusion of the atrial coronary branch without opening the chest. Two additional animals were used as controls for endocardial voltage mapping and multifrequency impedance data.

## Results:

L-type calcium current ( $I_{Ca}$ ) density significantly decreased in patients with chronic, non-paroxysmal AF, and treatment with  $\beta$ -blockers did not affect  $I_{Ca}$  density in any group. Conversely, the frequency of  $I_{T1}$  increased in patients with paroxysmal or chronic AF who were not treated, and treatment with  $\beta$ -blockers reduced the frequency to levels observed in patients without AF. Confocal calcium imaging showed that, in patients with AF, treatment with these antagonists also reduced the frequency of calcium sparks to the levels observed in those without AF. Furthermore, phosphorylation of the ryanodine receptor (RyR2) at Ser-2808 and phospholamban at Ser-16 was significantly lower in patients with AF who received  $\beta$ -blockers.

A distinctive feature of AF is an excess of spontaneous calcium release events, which can be mimicked by  $\beta_1$  or  $\beta_2$  adrenergic stimulation. Accordingly, the  $\beta_2$ -adrenergic agonist Fenoterol increased the incidence of calcium sparks and waves to levels observed with the non-specific  $\beta$ -adrenergic agonist Isoproterenol. Additionally, Fenoterol increased both the amplitude and the duration of sparks, which eased their fusion into calcium waves. Subsequent application of the R-Carvedilol enantiomer reversed these Fenoterol-induced effects in a dose-dependent manner. R-Carvedilol also dose-dependently reversed the phosphorylation induced by this agonist of RyR2 at Ser-2808, and 1  $\mu$ M of R- or S-Carvedilol completely reversed it. Therefore,  $\beta_2$ -adrenergic stimulation alone stimulates RyR2 phosphorylation at Ser-2808, as well as spontaneous calcium release. This suggests that Carvedilol can be used as a tool to attenuate pathological activation of  $\beta_2$  receptors.

In our porcine model, myocardial infarction affects the left atrial appendage without affecting the ventricular myocardium: there was no ST segment elevation on surface ECG in any case, and histological analysis ruled out the presence of ventricular infarction. This indicates that delivering a Papyrus-covered stent in the proximal segment of the left circumflex artery can successfully create an isolated atrial myocardial ischemia model. Additionally, our study addressed the healing phase of AI and revealed, for the first time, that low-voltage areas also had low tissue electrical impedance at all current frequencies.

## **2. INTRODUCCIÓN**

Las arritmias cardíacas se encuentran entre las principales causas de mortalidad. Frecuentemente éstas son producidas por alteraciones en la electrofisiología de las células cardíacas (21). La FA es la arritmia cardíaca más común en humanos y su incidencia aumenta con la edad (22–24). Actualmente, las terapias disponibles tienen una eficacia limitada tanto el tratamiento farmacológico como el quirúrgico (23,24). Su prevalencia varía de un 2% en la población general a un 10-12% en las personas mayores de 80 años, afectando a unas 33.5 millones de personas en todo el mundo (22). Esta enfermedad se asocia con una alta morbilidad, que incluye un aumento de la tasa de accidentes cerebrovasculares, demencia e insuficiencia cardíaca congestiva (25).

A través de un proceso de remodelación del sustrato auricular (tanto estructural como eléctrico), la enfermedad a menudo progresa de paroxística; donde los episodios de FA duran menos de una semana, a persistente; donde los episodios duran semanas, meses o hasta un año, llegando eventualmente a ser permanente (25). Así, el sustrato arrítmico va progresando con el tiempo, siendo éste un problema importante que limita el éxito a largo plazo de su tratamiento farmacológico y de la ablación. Por ello, una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes y fisiopatología de la FA ayudaría a obtener mejores enfoques terapéuticos (23).

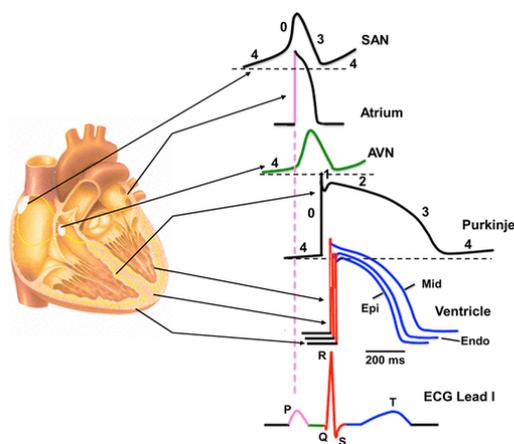
### **2.1. LA EXCITACIÓN ELÉCTRICA DE LOS CARDIOMIOCITOS**

Las arritmias a menudo son producidas por alteraciones en la electrofisiología de las células cardíacas y de sus mecanismos iónicos subyacentes (21). Por ello, es fundamental conocer la base iónica de la electrofisiología cardíaca humana para poder comprender mejor su fisiopatología. En este apartado se describen los canales iónicos y sus propiedades, al igual que las propiedades de los procesos iónicos que determinan la morfología y las características de los potenciales de acción cardíacos, además de la dinámica del calcio de los cardiomiocitos en diferentes regiones del corazón.

El corazón tiene la función vital de aportar la sangre al resto del organismo. En los humanos, la frecuencia de contracción y relajación normal es de 60 por minuto. Si esta función de suministrar sangre a todo el cuerpo se ve interrumpida por más de dos minutos,

la falta de oxígeno provoca daños irreversibles a los órganos vitales, incluido el propio corazón (21).

Para que el corazón se pueda contraer de una manera coordinada, requiere de una señal bioeléctrica conocida como potencial de acción (PA), que desencadena el proceso denominado acoplamiento excitación-contracción. El PA es generado e iniciada por las células situadas en el nódulo sinusal (**Figura 1**) y se propaga a través de todo el corazón en un proceso electrofisiológico activo. Este proceso genera unos impulsos que pueden medirse como la diferencia en el potencial eléctrico entre el espacio intracelular y extracelular. Una vez que el PA es generado por las células del nódulo sinusal, éste se propaga por ambas aurículas, provocando su contracción. Posteriormente, la señal llega al nódulo atrioventricular, que transmite la señal a los ventrículos y lo hace con un pequeño retraso para que se puedan contraer las aurículas y se puedan acabar de llenar de sangre los ventrículos. Esta señal que llega a los ventrículos se propaga a través del siguiente componente del sistema de conducción llamado Haz de His, que conduce el estímulo a lo largo de la pared septal del corazón, hasta las fibras subendocárdicas de Purkinje, estimulando así los ventrículos que se contraerán de manera sincronizada(21).



**Figura 1. Diferencias regionales del potencial de acción cardíaco.** En el dibujo se muestra un corte transversal del corazón con la morfología de los diferentes PA según la zona del corazón donde se producen. Cada zona está conectada a su PA correspondiente con una flecha negra. Por colores, se relacionan los potenciales de acción locales con un electrocardiograma de superficie. SAN, nódulo sinusal; AVN, nódulo atrioventricular; Epi, epicardio; Endo, endocárdico; Miocárdico medio, medio. (Imagen obtenida del artículo Varró et al. 2021)(21).

### 2.1.1. POTENCIAL DE ACCIÓN CARDÍACO

El PA se genera a través de la apertura y cierre de varios canales iónicos y transportadores (intercambiadores y bombas). El PA cardíaco es un cambio en el potencial transmembrana, con una amplitud entre 60 y 120 mV y valor basal negativo. El potencial de membrana en reposo (durante la fase de diástole del corazón) en las células del miocardio es del rango de -95 a -40 mV. Este potencial, al igual que en otras células excitables, se define principalmente por la conductancia de la corriente de potasio. La dirección del flujo de iones de potasio se puede estimar aproximadamente mediante la **ecuación de Nernst**. Típicamente el potencial de equilibrio para el ion de potasio está cerca de -80 mV, por lo que el potencial de reposo se acerca a este valor cuando la conductancia de potasio predomina. También participa en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo la bomba electrogénica de sodio/potasio dependiente de ATP, al eliminar de la célula 3 iones de sodio e introducir 2 de potasio (21).

No obstante, el potencial de membrana de una célula que tiene una membrana homogénea, un entorno circundante, y que no bombea iones electrogénicamente (no pasa corriente neta a través de sus membranas), y aunque el potencial de membrana en reposo se defina principalmente por la conductancia de la corriente de potasio, las células excitables de los mamíferos son permeables a más de un ion. Por ello, el voltaje viene determinado por el gradiente entre todos ellos. De esta manera, el voltaje depende de la polaridad de cada ion, la permeabilidad de la membrana a cada ion y también a los gradientes de concentración entre el interior y el exterior de la membrana. Los iones sodio, potasio y cloruro son los iones más importantes en la generación del voltaje de las células en reposo. Por eso, **Goldman-Hodgkin-Katz** hizo la ecuación, que lleva su mismo nombre, y que nos permite hacer una predicción del potencial de membrana teniendo en cuenta estos 3 iones. Ésta es inapropiada para otras células no excitables (26).

Ecuación de **Goldman-Hodgkin-Katz**:

$$V_m (mV) = 61 \times \log \frac{P_K[K^+]_e + P_{Na}[Na^+]_e + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_e}$$

En esta ecuación, 61 es  $2.303 RT/F$  a  $37^\circ\text{C}$ , R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura absoluta y F es la constante de Faraday. P se refiere a la permeabilidad relativa de la membrana al ion indicado en subíndice, y  $[\text{ion}]_i$  y  $[\text{ion}]_e$  es la concentración del ion en el interior y en el exterior de la célula respectivamente.

En condiciones fisiológicas, la duración del PA determina el período refractario. Éste es el intervalo de tiempo necesario que se requiere hasta que se pueda volver a generar un nuevo estímulo; es decir, que se pueda generar otro PA. La relación entre el período refractario y la duración del PA puede alterarse en condiciones patológicas (21).

La forma del PA cardíaco, es decir; los cambios del potencial transmembrana, no es igual entre las diversas regiones del corazón (**Figura 1**) y por lo tanto se deben presentar por separado. Además, existen diferencias significativas entre especies (21).

El potencial de acción se puede dividir en **cinco fases (Figura 1)**:

- **Fase 0.** Se abren los canales de sodio, de manera que hay una despolarización rápida debido a la entrada masiva de este ion dentro de la célula.
- **Fase 1.** Se caracteriza por una repolarización transitoria y relativamente rápida provocada por una disminución en la entrada de sodio y un aumento transitorio de la salida de potasio.
- **Fase 2.** Se llega a una meseta donde el potencial de membrana permanece casi constante. Esta meseta se mantiene en el tiempo gracias a una pequeña corriente transmembrana neta generada por la entrada simultánea de calcio, con algo de sodio, y la salida de potasio.
- **Fase 3.** Se genera la rápida repolarización para llevar el potencial de membrana a su potencial diastólico, principalmente debido al aumento de la salida de potasio y a la disminución de la entrada de calcio y sodio.
- **Fase 4.** Representa el potencial de membrana en reposo, en diástole para los cardiomiocitos, donde el voltaje se mantiene estable (no laten espontáneamente). Por el contrario, esta fase 4 representa la despolarización espontánea para las células marcapasos, donde ocurre la despolarización diastólica espontánea, proceso en el que el potencial cambia gradualmente hacia valores positivos y cuando se llega al umbral de despolarización se genera un nuevo PA (21).

## 2.1.2. CANALES DE IONES TRANSMEMBRANA Y TRANSPORTADORES EN EL CORAZÓN

El flujo de iones a través de la apertura y cierre dinámico y simultáneo de los canales iónicos transmembrana, es lo que produce el cambio de voltaje que se da durante el PA.

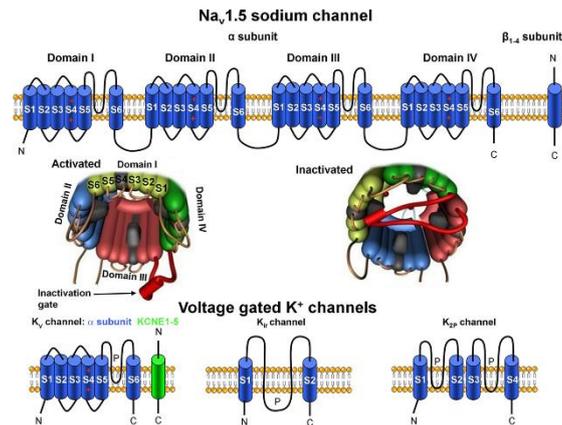
Las corrientes iónicas transmembrana normalmente se registran con la técnica de patch-clamp en cardiomiocitos aislados enzimáticamente y gran parte del conocimiento adquirido se sabe gracias a esa técnica. Cabe aclarar que las corrientes iónicas medidas a partir de esta técnica no corresponden sólo a un canal iónico y ciertas corrientes transmembrana pueden ser generadas por varios canales iónicos diferentes (27,28).

Además, la repolarización de estas células cardíacas se produce por múltiples corrientes iónicas que son redundantes. Esto compensa la pérdida de función de alguna corriente de repolarización, sin provocar necesariamente un efecto patológico en la repolarización (21).

### 2.1.2.1 LA CORRIENTE RÁPIDA DE ENTRADA DE SODIO

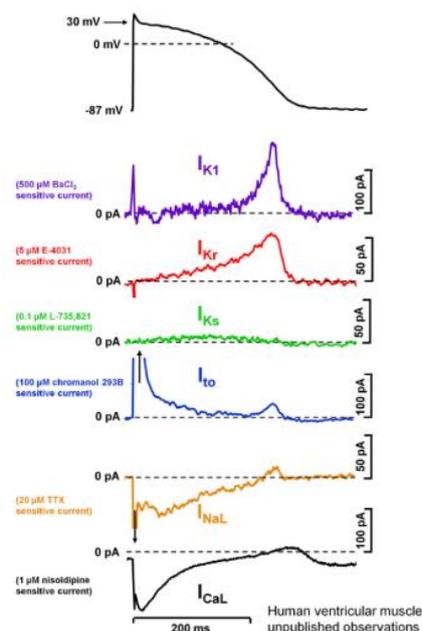
La corriente de entrada de sodio ( $I_{Na}$ ) rápida es la corriente más importante para la conducción del impulso en los cardiomiocitos. Esta corriente es generada por los canales de sodio voltaje-dependientes, denominados  $Na_v1.5$ , y es la responsable de la entrada de sodio durante la fase 0 del PA. Estos canales de sodio constan de una subunidad  $\alpha$  que forma poros y que contiene cuatro dominios (I al IV). Cada dominio consta de seis segmentos transmembrana (S1-S6), siendo el S4 responsable de la detección del voltaje (**Figura 2**). El bucle extracelular que se genera entre los segmentos S5 y S6 forma la estructura responsable de la selectividad iónica del canal. Entre los dominios III y IV existe una región capaz de bloquear el poro del canal después de su activación (**Figura 2**) (21,29).

A potenciales mayores a  $-60\text{mV}$ , los canales  $Na_v1.5$  se abren en una fracción de milisegundo. Al ser su densidad elevada en la membrana celular y el gradiente electroquímico grande, la  $I_{Na}$  es elevada, con una amplitud mayor de  $100\text{ pA/pF}$ . Una vez abiertos, se inactivan rápidamente a voltajes más positivos que  $-80\text{ mV}$ , con una inactivación del 50% entre  $-60$  y  $-70\text{ mV}$  (21).



**Figura 2. Ilustración esquemática de la estructura de los canales de sodio (Na<sub>v</sub>1.5) y potasio (K<sub>v</sub>) dependientes de voltaje.** (Imagen obtenida del artículo Varró et al. 2021)(21).

Además de esta inactivación rápida de I<sub>Na</sub>, los Na<sub>v</sub>1.5 también producen una inactivación lenta, que corresponde a la apertura tardía de estos canales y que, aunque es una corriente de baja amplitud (<0,5% de la amplitud de la I<sub>Na</sub>), representa una importante corriente despolarizante sostenida durante la fase 2 del PA (**Figura 1**). Así, ésta contribuye al mantenimiento de la meseta del PA (30), y su aumento prolonga la repolarización y aumenta la heterogeneidad de la repolarización. Además, al aumentar la concentración de sodio intracelular, también aumenta la concentración de calcio intracelular, a través del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX). Esto puede evocar actividad arritmogénica desencadenada, como posdespolarizaciones tempranas y tardías (EAD y DAD, respectivamente)(21).



**Figura 3. Representación gráfica del potencial de acción y de las corrientes iónicas subyacentes registradas en miocitos ventriculares humanos.** La corriente de potasio del rectificador de entrada ( $I_{K1}$ ), los componentes rápido ( $I_{Kr}$ ) y lento ( $I_{Ks}$ ) de la corriente de potasio del rectificador retardado, la corriente de salida transitoria ( $I_{to}$ ), la corriente de calcio tipo L ( $I_{Ca,L}$ ) y la corriente tardía de sodio ( $I_{NaL}$ ). (Imagen obtenida del artículo Varró et al. 2021)(21).

La homeostasia del calcio regula la  $I_{Na}$  a través de múltiples proteínas. Una de ellas es la calmodulina (CaM). Esta proteína es sensible al calcio y tiene un papel importante en la función de la corriente de sodio, al modificar la inactivación rápida de la corriente de sodio (31). También, aparte de CaM, la quinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMKII), modifica la función de la corriente de sodio dependiendo del calcio. La fosforilación de esta proteína regula los canales de sodio al retardar su recuperación de la inactivación (32).

#### 2.1.2.2. LA CORRIENTE DE SALIDA TRANSITORIA

En el músculo ventricular, la corriente de salida de potasio transitoria ( $I_{to}$ ) está generada por las subunidades  $\alpha$   $K_v4.3$  y  $K_v4.2$ , que forman poros en la membrana y que están coensambladas con las subunidades auxiliares KChIP2 y DPP codificadas por *KCND3*, *KCND2* y *KCNIP2* y los genes *DPP6/10*, respectivamente. Las subunidades del canal  $\alpha$   $K_v1.4$  constituyen entre un 10 y un 20% de la densidad de  $I_{to}$  (21).

La constante de tiempo de recuperación de la  $I_{to}$  tiene un componente rápido, de aproximadamente 50-100 ms, y un componente con una constante de tiempo de recuperación lenta, del orden de segundos, que es característica de los canales  $K_v1.4$  (33).

La corriente  $I_{to}$  se activa a partir de potenciales de membrana más positivos que -30 mV y la constante de inactivación rápida es de aproximadamente 5 ms, y lenta de aproximadamente 25 ms (34). El  $I_{to}$  mediado por el canal  $K_v4.3$ , a diferencia de  $K_v1.4$ , se recupera rápidamente de la inactivación en el rango de voltaje de la membrana de -60 a -80 mV, con una constante de tiempo de aproximadamente 50 ms (33).

La corriente transitoria de salida de potasio y la rápida inactivación de  $I_{Na}$  contribuyen de manera importante a la repolarización temprana/rápida del PA (Fase 1) (33,34) (**Figura 3**). También, en esa fase del PA,  $I_{to}$  modula el voltaje de la meseta y, en consecuencia, tiene una influencia indirecta en la activación, inactivación y desactivación de varias otras

corrientes iónicas transmembrana que operan durante la fase de meseta (34). Además, esta corriente está sujeta a regulación adrenérgica  $\alpha$  y  $\beta$ , ambas disminuyendo esta corriente a través de las vías PKA y proteína quinasa C (PKC), mientras que CaMKII aumenta  $I_{to}$  (35).

### 2.1.2.3. CORRIENTE DE ENTRADA DE CALCIO

Existen dos tipos de corriente de entrada de calcio ( $I_{Ca}$ ). El tipo más abundante es generado por los canales de calcio tipo L ( $Ca_v1.2$ ). Éstos están formados por la subunidad  $\alpha_1$  que forma poros en la membrana y está codificada por el gen *CACNA1C* (36). Esta subunidad consta de cuatro dominios repetidos (I-IV), cada uno de los cuales tiene seis segmentos transmembrana (S1-S6) (37). El segmento transmembrana S4 de cada dominio es el sensor de voltaje del canal (37) y la región que conecta los segmentos S5 y S6 es la responsable de la selectividad al calcio de la región del poro(38). La subunidad formadora de poros se coensambla con las subunidades extracelulares  $\alpha_2\delta$  y auxiliares  $\beta$  intracelulares que modulan la cinética, la activación y las propiedades del paso del calcio a través del canal (39).

La corriente de entrada de calcio de tipo L ( $I_{Ca,L}$ ) tiene una activación muy rápida y juega un papel muy importante en el proceso de acoplamiento excitación-contracción, pues sirve como iniciador de la liberación de calcio inducida por calcio del retículo sarcoplasmático (RS) (40). Electrofisiológicamente, esta corriente  $I_{Ca,L}$  desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la fase de meseta del PA (**Figura 3**) y en la despolarización de las células del nodo sinoatrial y atrioventricular (41). En estas células excitables, la  $I_{Ca}$  es el principal contribuyente a la conducción del impulso eléctrico (21).

La cinética de inactivación de la  $I_{Ca,L}$  (tiempo de activación rápida de aproximadamente 2-8 ms y lenta de aproximadamente 30-100 ms) es dependiente del voltaje de la membrana y de la concentración intracelular de calcio(42),que cambia dinámicamente durante el PA.

La  $I_{Ca,L}$  está modulada por la fosforilación dependiente de AMPc y de factores como los niveles de calcio intracelular (42). La  $I_{Ca}$  también se estimula a través de la CaMKII que fosforila los  $Ca_v1.2$  (43), independientemente de AMPc, a través de PKA (44) que implica Rad, una proteína G que interactúa con  $Ca_v1.2$  (45).

El segundo tipo es la corriente de calcio de tipo T ( $I_{Ca,T}$ ). Ésta contribuye significativamente a la función marcapasos de las células del nodo sinusal y atrioventricular (21). Esta corriente es conducida por los canales  $Ca_v3.1$  y  $Ca_v3.2$ , codificados por los genes *CACNA1G* y *CACNA1H*, respectivamente (46).

#### 2.1.2.4. CORRIENTES DE POTASIO RECTIFICADORAS RETARDADAS

Antes de la aparición de la técnica de patch-clamp, se registró una corriente de potasio que aparecía en la fase de meseta del PA. Esta corriente se denominó corriente de potasio rectificadora retardada. Al aparecer la técnica de patch-clamp se observó que dicha corriente tenía dos componentes; un componente rápido y otro lento. Además, estos dos componentes se generan por canales iónicos diferentes (21).

#### 2.1.2.5. LA CORRIENTE RÁPIDA DE POTASIO DE RECTIFICACIÓN RETARDADA

La rápida corriente de potasio de rectificación retardada ( $I_{Kr}$ ) se genera a través de la subunidad  $\alpha$  formadora de poros  $K_v11.1$ , que está asociada a varias subunidades accesorias  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  consta de seis segmentos transmembrana (S1 – S6) y el canal funcional contiene cuatro subunidades  $\alpha$  (47).

$I_{Kr}$  se activa de manera dependiente del voltaje durante la meseta del PA (Fase 3) con un  $\tau$  de activación de 31 ms a +30 mV en miocitos ventriculares humanos (48).

Estos canales se abren a medida que el voltaje cambia a valores más negativos generándose una corriente relativamente pequeña pero que es crucial para la repolarización (**Figura 3**). Además,  $I_{Kr}$  se desactiva lentamente y no se desactiva por completo durante el PA provocando una salida residual, acortando así el siguiente potencial de acción. Esto permite aumentar la frecuencia cardíaca (21).

#### 2.1.2.6. LA CORRIENTE LENTA DE POTASIO DE RECTIFICACIÓN RETARDADA

La corriente lenta de potasio de rectificación retardada ( $I_{Ks}$ ) está generada por el canal  $K_v7.1$ . Éste consta de una subunidad  $\alpha$  formadora de poros y codificada por el gen *KCNQ1*. Esta corriente es dependiente de voltaje y se activa a potenciales más positivos que -30 mV (49) y se desactiva a potenciales más negativos de -40 mV (50).

Durante la meseta del PA,  $I_{Ks}$  es pequeña debido a su activación lenta (**Figura 3**) y tiene una contribución mínima en la repolarización. Esta corriente adquiere más importancia cuando aumenta el tono simpático contribuyendo más a la repolarización (51).

#### 2.1.2.7. CORRIENTE DE POTASIO DEL RECTIFICADOR DE ENTRADA

La corriente de potasio del rectificador de entrada ( $I_{K1}$ ), como también  $I_o$ , está generada por varios canales. En este caso, a través de diferentes isoformas del canal  $K_{ir}$  (52). Estos canales están constituidos por subunidades  $\alpha$  formadoras de poros  $K_{ir2.1}$ ,  $K_{ir2.2}$ ,  $K_{ir2.3}$  y  $K_{ir2.4}$ , codificadas por los genes *KCNJ2*, *KCNJ12*, *KCNJ4* y *KCNJ14*, respectivamente (53).

La corriente  $I_{K1}$  tiene un papel muy importante en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, dando forma a la repolarización terminal en la Fase 3 del PA (**Figura 3**) (21).

#### 2.1.2.8. CORRIENTE DE RECTIFICADOR RETARDADA ULTRARRÁPIDA

Esta corriente de potasio de rectificación retardada ultrarrápida ( $I_{Kur}$ ) es generada a través de un canal que consta de una subunidad  $\alpha$   $K_v1.5$ , codificada por el gen *KCNA5*, y las subunidades accesorias  $K_v\beta1.2$  y  $1.3$  (54) y que se expresa mucho más en las aurículas que en el ventrículo (21).

$I_{Kur}$  se activa rápidamente tras la despolarización a potenciales de membrana más positivos que 0 mV, con un tiempo de activación de 13 ms a un potencial de 0 mV y se inactiva lentamente a potenciales despolarizados (54).

#### 2.1.2.9. CORRIENTE DE POTASIO ACTIVADA POR CALCIO DE CONDUCTANCIA PEQUEÑA

La corriente de potasio activada por calcio de conductancia pequeña se genera a través de los canales de potasio activados por calcio de baja conductancia SK1-3. Éstos se encuentran unidos a la calmodulina y están codificados por los genes *KCNN1*, *KCNN2* y *KCNN3* (55).

La importancia fisiológica de esta corriente aún no está completamente dilucidada. La evidencia sugiere que esta corriente tiene importancia en las aurículas (56). Ésta se activa

independientemente del voltaje, y lo hace en respuesta al aumento de la concentración de calcio intracelular (57). Se requiere más investigaciones para una mejor comprensión del papel exacto de las corrientes SK en la fisiología cardíaca (21).

#### 2.1.2.10. **TRANSPORTADORES DE IONES TRANSMEMBRANA**

Los transportadores de iones transmembrana se encargan de intercambiar iones a través del sarcolema y, de esta forma, mantener la distribución desigual de iones entre el espacio extracelular e intracelular. Esta distribución desigual influye en la electrofisiología celular cardíaca, al cambiar varias concentraciones intracelulares, sobre todo de calcio, que activa y regula otras corrientes iónicas transmembrana.

##### 2.1.2.10.1. **LA BOMBA SODIO-POTASIO ATPASA**

Durante el PA, el sodio extracelular entra en el espacio intracelular. La bomba sodio-potasio se encarga de eliminar del espacio intracelular este sodio, y lo hace intercambiando 3 iones de sodio por 2 iones de potasio, transportando así una corriente hacia el exterior. De esta forma, esta bomba desempeña un papel importante en la homeostasis iónica y en la repolarización cardíaca (58), bombeando más del 80% del sodio (59). Además, esta bomba necesita ATP intracelular como energía para poder bombear el sodio en contra de su gradiente electroquímico (60).

Esta bomba consta de dos subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . La  $\alpha 1$ , localizada uniformemente por el sarcolema, regula el sodio intracelular (61). La  $\alpha 2$  ayuda al control del calcio liberado del RS, ya que se sitúa en la hendidura diádica, donde interactúa con el NCX (59).

La actividad de esta bomba está regulada por la concentración intracelular de sodio y también por la fosforilación de la proteína fosfolipídica FXYD (PLM). Esta proteína, cuando está desfosforilada, inhibe la bomba sodio-potasio, mientras que su fosforilación reduce esta inhibición(62).

Una disminución de ATP provoca una reducción de la actividad de la bomba sodio-potasio, lo que conduce a un nivel elevado de sodio intracelular, activando el modo inverso del intercambiador NCX y provocando así una sobrecarga de calcio (63).

##### 2.1.2.10.2. **EL INTERCAMBIADOR SODIO-CALCIO (NCX)**

Existen tres isoformas de NCX (NCX1-NCX3) en los tejidos de los mamíferos, codificados por los genes *SLC8A1-SLC8A3*, respectivamente (64). *SLC8A1* genera 17

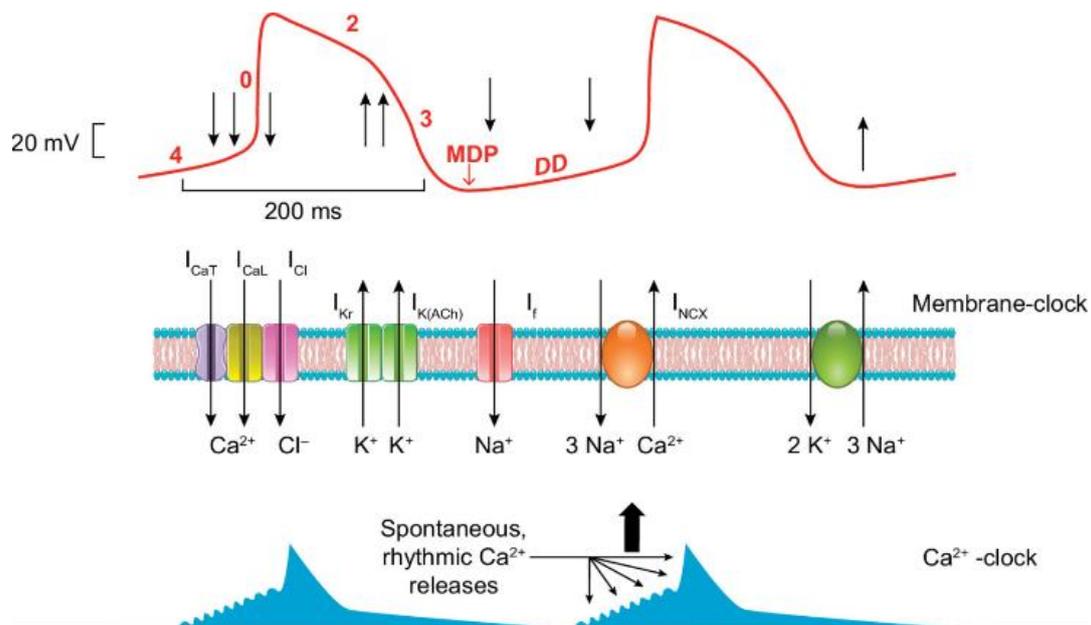
proteínas NCX-1, y la variante NCX1.1 es la isoforma cardíaca. Esta isoforma consta de 10 segmentos transmembrana repartidos en dos grupos de cinco segmentos separados por un bucle intracelular (65), que es la parte inhibidora del intercambiador, que lo inactiva cuando aumenta la concentración de sodio intracelular (66). Este bucle intracelular también contiene dos dominios de unión al calcio que se encargan de la regulación de este ion (67).

La función principal de NCX es controlar el flujo de calcio a través de la membrana plasmática, transportando tres iones sodio por cada uno de calcio (68). Así, el NCX es electrogénico (69) dando lugar al transporte de una carga positiva neta y una corriente transmembrana cuya dirección depende de las concentraciones de sodio y calcio, así como el potencial de membrana, por lo que cambia dinámicamente durante el PA (70). Cuando el PA es positivo, durante la primera fase, y el calcio intracelular es bajo, NCX introduce calcio a la célula, generando una corriente de salida. Por el contrario, cuando la concentración de calcio intracelular ya ha aumentado, NCX actuará introduciendo sodio y expulsando el calcio de la célula, generando así una corriente de entrada (71). Así, NCX es la fuente principal, pero no la única, de eliminación del calcio de la célula durante la última fase del PA y durante la diástole (72).

### **2.1.3. POTENCIALES DE ACCIÓN ESPECÍFICOS DE CADA TEJIDO.**

#### **2.1.3.1. FUNCIÓN DEL NÓDULO SINOATRIAL Y MARCAPASOS**

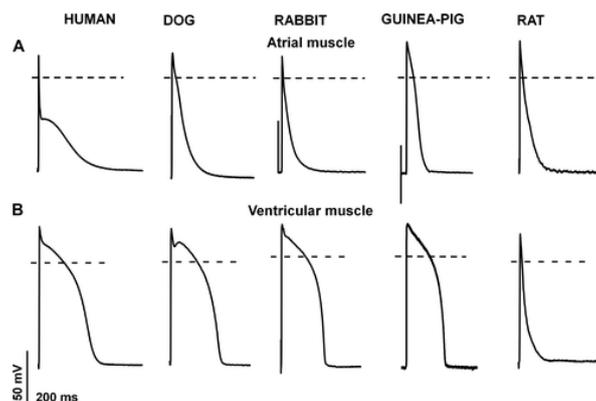
En la parte superior de la aurícula derecha se encuentra el nódulo sinusal. Éste es el que marca la frecuencia cardíaca de manera fisiológica (ritmo sinusal). Las células que componen ese nódulo tienen un potencial de membrana diastólico de  $-60\text{mV}$ , que, una vez terminada la repolarización, gradualmente va volviéndose más positivo generando una despolarización diastólica espontánea, hasta que los  $\text{Ca}_v1.2$  se abren y se vuelve a generar un nuevo PA (73) (**Figura 3**).



**Figura 3. Potencial de acción del nódulo sinoatrial.** En la imagen se dibuja el potencial de acción del nódulo sinusal con sus diferentes fases marcadas con números (4, 0, 2 y 3). Se han representado los canales involucrados en la despolarización espontánea de estas células marcapasos. En la fase 0 se abren los canales de calcio T ( $I_{CaT}$ ) y L ( $I_{CaL}$ ), creando una corriente de entrada que despolariza la célula. En la fase 3 se da la repolarización de la membrana, donde se abren los canales de rectificación retardados ( $I_{Kr}$ ) y la corriente de potasio dependiente de acetilcolina ( $I_{K(ACh)}$ ). De esta forma se alcanza el potencial diastólico máximo. A partir de aquí, la corriente  $I_f$  despolariza progresivamente la membrana, con ayuda de la NCX ( $I_{NCX}$ ) activada por liberaciones espontáneas locales de calcio. (Imagen obtenida del artículo Varró et al. 2021)(21).

### 2.1.3.2. POTENCIAL DE ACCIÓN AURICULAR

Existen variaciones en la PA auricular dependientes de la especie (**Figura 4**), al igual que también existe una diversidad significativa dentro de un mismo corazón (74).



**Figura 4. Diferencias entre especies de la morfología del potencial de acción del cardiomiocito auricular (A) y ventricular (B).** (Imagen obtenida del artículo Varró et al. 2021)(21).

En la mayoría de las especies, el PA carece de una fase de meseta larga y estable (**Figura 4**). En la aurícula humana la fase de meseta se encuentra entre -10 y -30 mV más negativo que en ventrículo, debido a la función de las corrientes de potasio  $I_{to}$  e  $I_{Kur}$  (**Figura 3**). En las aurículas,  $I_{Kur}$  es grande y contribuye a la repolarización, en contraste con el ventrículo, donde está ausente o se expresa muy débilmente (75).

#### 2.1.3.3. VENAS PULMONARES

Las venas pulmonares son propensas a tener focos de actividad eléctrica espontánea. Esta actividad eléctrica, en los manguitos de las venas pulmonares, tiene un papel importante en la FA (76). Se demostró que en las venas pulmonares de perros y cobayas existe tejido de origen miocárdico con propiedades electrofisiológicas similares a las del tejido auricular (77).

El potencial de reposo de las células de las venas pulmonares es menos negativo que los miocitos auriculares, careciendo también de una fase de meseta prominente (21).

#### 2.1.3.4. POTENCIAL DE ACCIÓN Y CONDUCCIÓN DEL NODO ATRIO-VENTRICULAR

Las células del nodo atrio-ventricular difieren de las células del nodo sinoatrial en que tienen una frecuencia espontánea más baja y un potencial diastólico máximo más negativo (78). Además, la conducción es lenta a través de este nódulo, proporcionando así un lapso de tiempo fisiológico entre la contracción de las aurículas y de los ventrículos (79).

#### 2.1.3.5. POTENCIAL DE ACCIÓN DE LAS FIBRAS DE PURKINJE

Las fibras de Purkinje tienen un papel fundamental en la conducción y propagación de impulsos en los ventrículos (80). Estas células también pueden actuar como marcapasos ya que tienen una despolarización diastólica espontánea, aunque su frecuencia normalmente es inhibida por las descargas de mayor frecuencia del nódulo sinusal (80). Además, las fibras de Purkinje tienen una despolarización de dos a tres veces más rápida que las células musculares auriculares o ventriculares (21), lo que permite que aumente la velocidad de conducción del impulso. La rápida repolarización de la Fase 1 (**Figura 3**) está causada por la inactivación rápida de  $I_{Na}$  y la activación de  $I_{to}$ . Esta última corriente

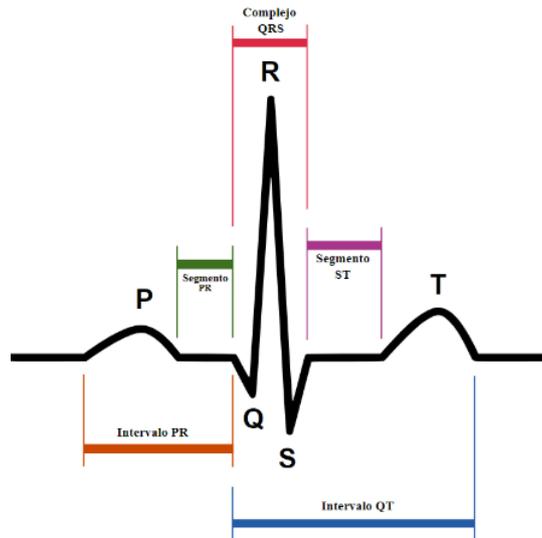
es más grande que en el músculo ventricular, se inactiva un poco más lentamente y se recupera de la inactivación diez veces más lentamente que en las células del músculo ventricular (81).

#### 2.1.3.6. POTENCIAL DE ACCIÓN VENTRICULAR: DIFERENCIAS TRANSMURALES Y REGIONALES

El PA ventricular (**Figura 1**) tiene una fase de meseta positiva de +20 a +30 mV y larga, con una repolarización de Fase 1 pequeña o pronunciada con una muesca posterior que depende de su origen; subendocárdica, miocárdica media o subepicárdica (82). Las células ventriculares expresan las corrientes  $I_{Na}$ ,  $I_{CaL}$  e  $I_{Na}$  tardía. Estas corrientes son relativamente débiles pero persistentes, proporcionando así una despolarización robusta que asegura la conducción del impulso (83) (**Figura 3**).

#### 2.1.4. ELECTROCARDIOGRAMA

El ECG es generado por la función de los canales iónicos transmembrana y los transportadores situados en las células cardíacas que provocan cambios en el potencial de membrana. La onda P (**Figura 5**) corresponde a la despolarización y repolarización de las células auriculares. El complejo QRS muestra el transcurso temporal de la despolarización de los ventrículos causada principalmente por la activación de los canales rápidos de sodio. El segmento PQ corresponde a la conducción del impulso desde las aurículas a los ventrículos (21). Las células que están involucradas en este segmento PQ corresponden al nódulo atrioventricular, y están poco acopladas entre ellas, lo que provoca que el impulso se propague a través del nódulo de una forma relativamente retardada (84). El siguiente segmento es isoelectrico y corresponde al segmento ST. Éste refleja la fase de meseta del PA ventricular. En esta fase, el potencial de membrana apenas cambia a nivel celular debido al equilibrio entre la apertura y cierre de los diferentes canales iónicos involucrados. La onda T corresponde a la repolarización de los ventrículos. Es el equilibrio entre las corrientes de potasio y cloruro que repolarizan a las células y que se activan paulatinamente. Por último, el intervalo PP nos proporciona información sobre la frecuencia y regularidad del ritmo cardíaco (21).



**Figura 5. Representación gráfica de un electrocardiograma.** Los diferentes componentes del electrocardiograma están indicados con letras negras, mientras que los segmentos están delimitados con líneas de diferentes colores. Imagen obtenida de Wikipedia.

## 2.2. ESTRUCTURA DEL CARDIOMIOCITO

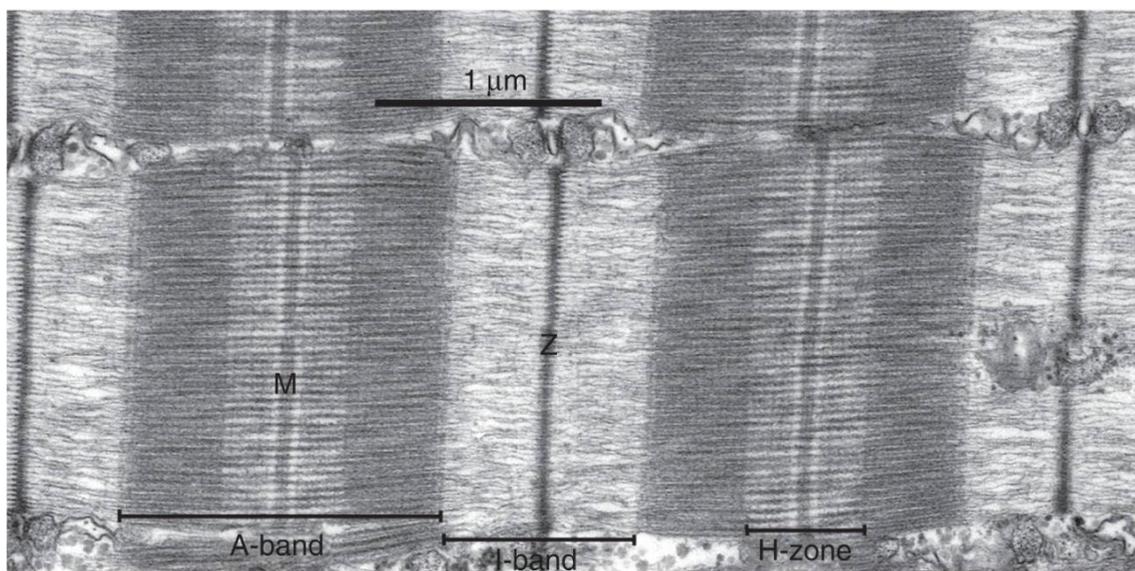
La capacidad de moverse de los organismos superiores del reino animal se adquirió gracias a la evolución del músculo contráctil. Existen tres tipos de músculos: esquelético, cardíaco y liso, siendo los miocitos la unidad celular que constituye la estructura de éstos. Estas células contienen proteínas especializadas que, usando energía química, generan la fuerza mecánica para la contracción celular (85).

Tanto el músculo esquelético como el cardíaco se denominan músculo estriado por la organización visible de unidades repetitivas (conocidas como sarcómeros) de filamentos contráctiles cilíndricos denominados miofibrillas. La mayor parte del volumen de las fibras musculares está ocupado por las miofibrillas, dejando poco espacio para el núcleo y otros orgánulos como las mitocondrias y el RS. Este último es el retículo endoplasmático especializado del músculo estriado (85).

### 2.2.1. EL SARCÓMERO DEL MÚSCULO ESTRIADO

En el músculo estriado encontramos el sarcómero (**Imagen 1**), considerado la unidad contráctil básica, que está limitado por las líneas Z y se organizan formando miofibrillas. Cada sarcómero está constituido por una banda A donde encontramos los filamentos de miosina, que son los filamentos gruesos, y por filamentos de actina, que son los filamentos

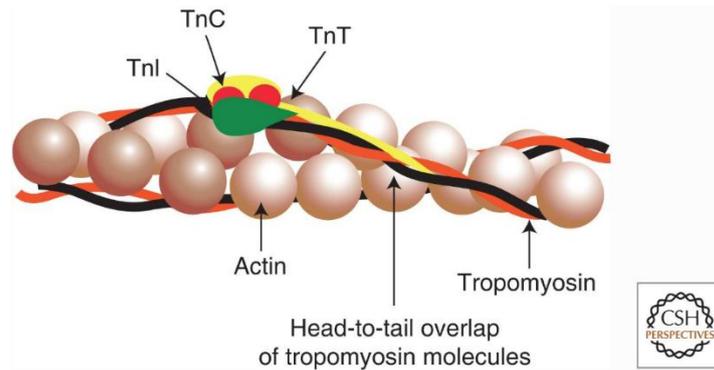
delgados. Esta banda A está localizada a la región central del sarcómero. La miosina es la proteína motora encargada de generar la fuerza del músculo esquelético y cardíaco. Las miofibrillas del músculo cardíaco se componen por unidades de sarcómeros unidos en serie, delimitados entre sí por las líneas Z (86).



**Imagen 1. Organización del sarcómero del músculo esquelético.** Se muestra una micrografía electrónica de una sección delgada longitudinal de una fibra muscular donde se observa la organización del sarcómero del músculo esquelético, con el eje largo de la fibra horizontal. Se muestran dos sarcómeros completos. (Imagen obtenida del artículo de Sweeney et al. 2018) (85).

### **2.2.2. REGULACIÓN DE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO ESTRIADO.**

En presencia de magnesio y potasio, los monómeros de actina se polimerizan a filamentos largos, hidrolizando ATP a ADP durante ese proceso (87). La troponina responde al calcio para regular la contracción del músculo estriado. La troponina se conforma de tres subunidades que, en conjunto, se unen a cada molécula de tropomiosina. Estas tres subunidades son: la troponina T, troponina I y troponina C. La troponina T es alargada y se encarga de unir el complejo troponina a la tropomiosina. La troponina I y C son globulares y unen la troponina T a la actina (**Figura 7**) (85). Cada molécula de tropomiosina abarca siete monómeros de actina.



**Figura 7. Representación gráfica de los elementos que componen los filamentos delgados.** Se puede identificar la tropomiosina, que es una molécula enrollada alargada que se une a la superficie del filamento de actina. Por otro lado, se observan las tres subunidades de la troponina: la troponina T (TnT), troponina I (TnI), y troponina C (TnC). Además, se representa la posición relativa de estas proteínas respecto al filamento de actina. (Imagen obtenida del artículo de Sweeney et al. 2018) (85).

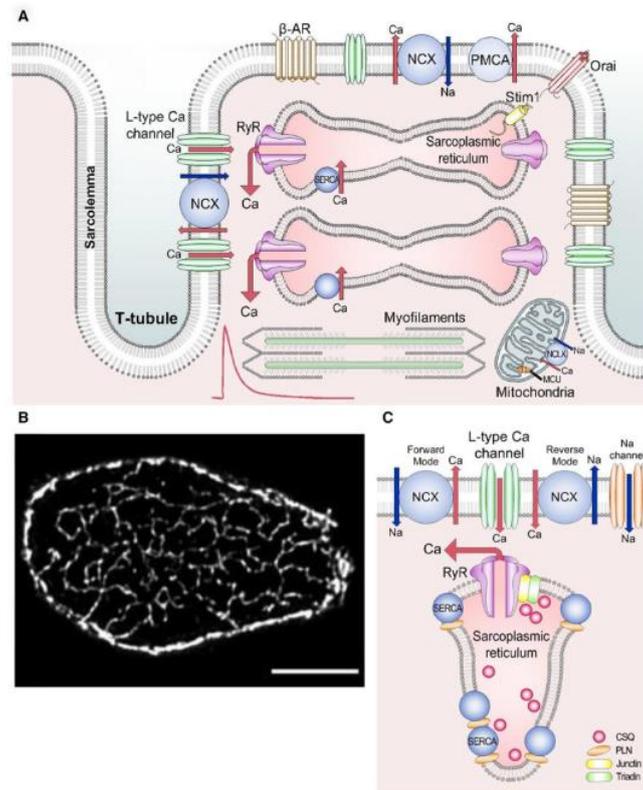
Cuando las concentraciones de calcio libre son bajas, el complejo troponina-tropomiosina bloquea estéricamente la interacción actina-miosina. Al incrementar las concentraciones de calcio liberado del RS, se permite la interacción actina-miosina, activando el proceso de contracción al unirse a los sitios de unión de calcio amino-terminales de baja afinidad de la troponina C. Una vez el calcio se ha unido, la troponina C libera la tropomiosina de su posición de bloqueo estérico, permitiendo así que la miosina interactúe con la actina generando fuerza. Este proceso se produce debido a los cambios conformacionales de la troponina I que se transmiten a la tropomiosina vía troponina T (85). Por lo tanto, para que el músculo esté relajado se requiere de concentraciones muy bajas de calcio. Cuando esto se cumple, las cabezas de miosina están localizadas muy cerca de la superficie del filamento grueso. Durante la contracción muscular, las cabezas de miosina interactúan con el filamento delgado generando puentes cruzados. Esto da como resultado que las líneas Z se acerquen entre sí provocando el acortamiento del músculo (85).

## 2.3. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN - CONTRACCIÓN CARDIACA

El corazón se contrae gracias a los cambios en la concentración del calcio intracelular. Para que éste se pueda contraer, se requieren concentraciones elevadas de este ion durante la sístole y bajas durante la diástole. Gran parte del calcio involucrado en este proceso proviene del RS y se libera mediante el proceso de liberación de calcio inducido por calcio (88).

Los eventos que ocurren en el acoplamiento excitación-contracción dependen de la actividad de los canales y transportadores de calcio, así como de la ubicación precisa y espacial de éstos (**Figura 8**). Cuando se despolariza la célula, gracias a la llegada del PA, los  $Ca_v1.2$ , situados en la membrana superficial y en los túbulos transversos (túbulos T), se abren. Esto resulta en una pequeña entrada de calcio que acaba produciendo un gran aumento de la concentración de este ion en el espacio diádico. Este espacio es la región delimitada por los túbulos T y el RS. Este aumento de la concentración de calcio hace que se abran los RyR2, liberando así una cantidad mucho mayor de calcio en un proceso conocido como liberación de calcio inducida por calcio. Esto activa la contracción por el proceso mencionado anteriormente. Cabe indicar que las concentraciones de calcio no solo dependen de lo mencionado anteriormente, sino también de la unión de este ion a tampones y su absorción por parte de orgánulos como las mitocondrias (88).

Para que se pueda dar la relajación muscular, el calcio debe eliminarse del citoplasma. Así que se cierran primero los RyR2 y luego se bombea el calcio otra vez al RS, a través de SERCA. Asimismo, el NCX expulsa el calcio que anteriormente entró a través del sarcolema, manteniendo así la homeostasis del calcio (88).



**Figura 8. Estructuras involucradas en el ciclo del calcio.** A) Diagrama esquemático donde se muestra el sarcolema, el túbulo T, el retículo sarcoplásmico y las mitocondrias. También se muestran los diversos canales y transportadores. B) Corte transversal de alta resolución de un miocito ventricular que muestra la red de túbulos T. C) Representación esquemática de la díada donde se muestran las principales proteínas involucradas en el ciclo del calcio. (Imagen obtenida del artículo de Sweeney et al. 2018) (85).

### 2.3.1. CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES: LA DÍADA

Los túbulos T son invaginaciones profundas del sarcolema de la célula, con una anchura de entre 150 a 300 nm que se producen en la unión de cada sarcómero (línea Z) (89). El acoplamiento excitación-contracción se produce gracias a que la membrana del RS y la del túbulo T están estrechamente asociados, permitiendo un estrecho contacto entre estas dos estructuras, de modo que el RyR2 se encuentra muy próximo a los Cav1.2 en este espacio denominado díada cardíaca, fundamental para los procesos que inician el transitorio de calcio sistólico (90).

La díada cardíaca es pues un nexo de señalización especializado con la finalidad de iniciar la contracción cardíaca (88).

En la diada, el NCX también participa en el acoplamiento excitación-contracción que contribuye a la liberación de calcio del RS durante la sístole a través de su acción de modo inverso para contribuir a la entrada de calcio durante el pico y la meseta del PA (91).

### **2.3.2. REGULACIÓN DEL CONTENIDO DE CALCIO DEL RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO.**

Dentro del RS hay una concentración de calcio de entre 1 a 1.5 mmol/L al final de la diástole, que disminuye entre un 50% y un 75% cuando los RyR2 se abren durante la contracción (92). Un factor importante que controla la cantidad de calcio que es liberado del RS a través del RyR2 es el contenido de calcio del propio RS, que a la vez está determinado por el equilibrio entre la recaptación de calcio del retículo mediada por SERCA, y salida de calcio a través de los RyR2. Por otro lado, esa salida no solo depende de las propiedades de SERCA y de los RyR2, sino también de la concentración de calcio en el citosol y RS.

Cuando el contenido del RS está por debajo del valor de la amplitud requerido para la máxima activación de los RyR2, entonces la salida de calcio será menor que la entrada y el contenido de calcio del retículo aumentará. El contenido del RS cambiará hasta que el gradiente de calcio alcanza el equilibrio. Así, si se aumenta la actividad de SERCA o disminuye la apertura de RyR2, se aumentará el contenido del calcio del retículo. En cambio, si se aumenta la actividad del NCX el contenido de calcio del RS disminuirá (93).

### **2.3.3. RECEPTORES DE RIANODINA TIPO 2 (RYR2).**

Encontramos 3 isoformas del receptor de rianodina en los mamíferos (RyR1- 3). El RyR2 es el canal iónico conocido más grande, con un peso molecular de unos dos millones de Dalton. El canal es un complejo macromolecular homotetramérico compuesto por 4 protómeros de RyR2 (94). Esta isoforma predomina en el corazón, aunque también podemos encontrar algunos RyR3 (95).

Los RyR2 están localizados en clústeres, con una densidad de entre 10 y 300 RyRs por clúster. Los RyR2 forman microdominio con los Cav1.2 del sarcolema, en la diada. Los niveles de calcio presentes en estos microdominios son dependientes del calcio que entra a través de los Cav1.2 y de su eliminación vía NCX1. Además, estos receptores están unidos a otras proteínas, formando complejos macromoleculares con las que se regula su actividad y la propagación del calcio liberado. Las proteínas que conforman este complejo

macromoleculares son la CaMKII, calsecuestrina (CSQ-2), proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), fosfatasa 1 (PP1), fosfatasa 2A (PP2A) y fosfodiesterasas (PDEs) (95,96). Además, en el lumen del RS se encuentra una proteína que tampona el calcio; la CSQ-2. Ésta permite que el calcio se pueda almacenar en altas concentraciones dentro de este orgánulo. Además, su baja afinidad al calcio permite que exista concentraciones de entre 100 y 500  $\mu\text{M}$  de este ion libre dentro del RS (97). La CSQ-2 tiene dos configuraciones; oligomérica y monomérica, dependiendo de las concentraciones de calcio luminal. Cuando hay concentraciones altas de calcio, se encuentra en su forma oligomérica y cuando la concentración de este ion baja, la proteína se disocia y entonces su configuración monomérica se une al RyR2 inhibiéndolo (98). Otra proteína que inhibe a este receptor es la calmodulina (CaM). En su forma unida al calcio, CaM inhibe al RyR2 impidiendo la liberación de calcio a través de éste. Cuando las concentraciones de calcio bajan en el citosol, se disocia CaM del calcio y del RyR2, permitiendo así que el canal se pueda abrir (99). Además, cuando hay concentraciones altas de calcio, CaM activa a CaMKII, que a su vez fosforila diferentes residuos del RyR2, entre los que encontramos Ser2808 y Ser2814, que aumenta la probabilidad de apertura del RyR2 y con ello la liberación espontánea de calcio (100).

Otra proteína importante involucrada en la regulación del RyR2 es la sorcina, que al unirse a él inhibe la liberación espontánea de calcio. Si sorcina es fosforilada por PKA, el efecto inhibitorio desaparece (101). También, al igual que CaMKII, PKA fosforila los residuos de Ser2808 y Ser2030 del RyR2 (entre otros), incrementando su probabilidad de apertura (13).

Las PDEs también forman parte del complejo macromolecular del RyR2. Éstas regulan la cantidad de AMPc circundante al receptor. Y, por último, los RyR2 también están asociados a fosfatasas (PP1 y PP2A) que desfosforilan las proteínas para regresar al estado basal (103).

#### **2.3.4. LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DEL CALCIO**

Como hemos visto anteriormente, la probabilidad de apertura de los RyR2 es más alta cuando aumentan las concentraciones de calcio en el citosol y puede dar lugar a eventos breves de liberación de calcio del RS no sincronizados durante la diástole que también se conoce como la fuga diastólica de calcio del RyR2 (104). Los eventos visibles de esta fuga de calcio son conocidas como chispas de calcio o *calcium sparks*. En condiciones

fisiológicas, esta fuga de calcio diastólica ayuda a regular los niveles de calcio luminal del RS. En condiciones patológicas, una fuga diastólica excesiva, producida por un elevado contenido de calcio luminal y/o por la fosforilación del RyR2, puede contribuir a aumentar la cantidad de *calcium sparks*, facilitando que éstos se unan y se propaguen en forma de ondas de calcio (*calcium waves*), que, a su vez, generan una corriente despolarizante de entrada a través del NCX que generan despolarizaciones tardías (DADs) y contribuye a la generación de arritmias adquiridas o hereditarias (105,106). Además, durante la activación adrenérgica, el cardiomiocito se carga de calcio aumentando la fuga, lo que también lleva a la arritmogénesis (107).

## **2.4. LA FIBRILACIÓN AURICULAR**

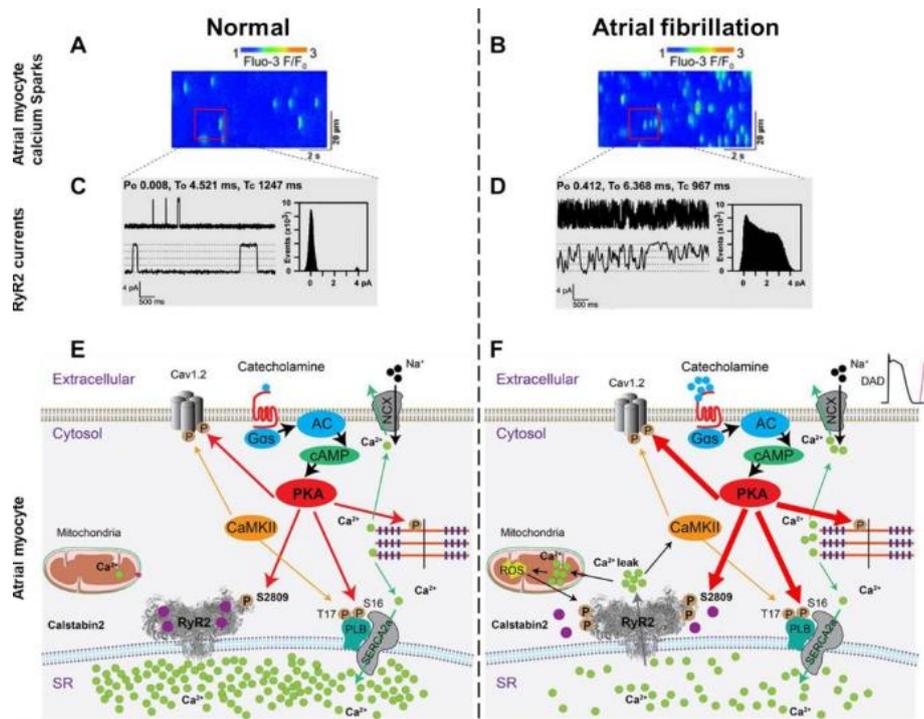
Como se ha explicado anteriormente, el calcio tiene un papel muy importante en la fisiología celular. La regulación defectuosa del calcio se encuentra en diferentes patologías cardíacas como son la insuficiencia cardíaca o la FA. Estas dos enfermedades cardíacas son las más comunes y principales contribuyentes a un aumento de mortalidad y morbilidad (107).

Durante la FA, la aurícula se contrae de manera rápida (400-500 latidos por minuto) y desorganizada (108). En consecuencia, los ventrículos no se llenan correctamente de sangre reduciendo así el gasto cardíaco.

Al ser estas contracciones irregulares, el riesgo de trombosis dentro de la aurícula izquierda aumenta y puede embolizarse en el cerebro, provocando accidentes cerebrovasculares isquémicos (109).

### **Homeostasis del calcio en la FA:**

Aunque la FA tenga muchos factores contribuyentes, las alteraciones en el manejo del calcio intracelular en los cardiomiocitos es un factor importante en la fisiopatología de la enfermedad, como lo es en muchas funciones fisiológicas (107). La disfunción del RyR2 se debe a la oxidación y a la hiperfosforilación. Esta fosforilación del RyR2 homotetramérico favorece su apertura espontánea al desestabilizar el estado cerrado del canal. Además, las quinasas CaMKII y PKA fosforilan diferentes residuos del RyR2 (ser2808, ser2814 y ser2030), incrementando así las liberaciones espontáneas de calcio. (107).



**Figura 10.** La liberación espontánea de calcio del retículo sarcoplasmático contribuye en la aparición de episodios de fibrilación auricular. En el panel A se observa una línea de *calcium sparks* registrados en un miocito auricular normal, y en la B se observa un registro de un miocito de un paciente con FA. En la C (miocito auricular normal) y D (FA), se observan registros representativos de un solo canal de RyR2 en condiciones que simulan la diástole en cardiomiocitos auriculares. En la E (normal) y F (FA) se observa una representación esquemática de la señalización de calcio. En la FA, los miocitos auriculares muestran un aumento de los eventos espontáneos de calcio. (Figura obtenida del artículo de Dridi et al. 2020) (107).

Como ya hemos dicho, en el acoplamiento excitación-contracción se convierte la señal eléctrica en fuerza mecánica y, para ello, se requiere de la liberación y recaptación coordinada de calcio en los cardiomiocitos. Los eventos individuales de liberación de calcio pueden visualizarse como *calcium sparks*, pudiéndose calcular su frecuencia y otras propiedades (amplitud, duración, anchura, entre otras). En este sentido, varios estudios han asociado la FA con un incremento de liberaciones espontáneas de calcio del RS (110) (**Figura 10**). La diástole cardíaca se inicia cuando finaliza la liberación de calcio y éste es bombeado de nuevo al RS a partir de SERCA 2a y sacado fuera de la célula por NCX. El manejo disfuncional del calcio puede ocurrir en diferentes etapas del proceso de

excitación-contracción, incluida durante la entrada de calcio a los miocitos, durante la liberación intracelular de este ion o durante la recaptación del calcio intracelular. Así, se ha demostrado que las mutaciones heredadas de RyR2 y/o la fosforilación y la oxidación inducidas por el estrés desestabilizan el estado cerrado del canal, lo que da como resultado una fuga patológica de calcio en el RS que desencadena arritmias y altera la contractilidad (107).

### **2.4.1. MECANISMOS ELECTROFISIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LA APARICIÓN INICIAL DE FIBRILACIÓN AURICULAR.**

La FA es de naturaleza progresiva y se autoperpetúa, pero antes de llegar a ese punto, debe haber mecanismos que determinen su aparición inicial. Es importante tener un sentido global de los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la aparición de esta enfermedad, antes de que se dé su progresión (23).

#### **ACTIVIDAD ECTÓPICA**

La actividad ectópica, particularmente la que ocurre en las venas pulmonares, tiene una participación central en el inicio de la FA. Existen varios factores que afectan a las venas pulmonares y que son la causa de la actividad ectópica. En estas se incluyen características estructurales y de los canales iónicos, así como de corrientes de potasio. Estas propiedades acaban reduciendo la duración del PA celular, haciendo más probable la reentrada eléctrica y la generación de actividad ectópica debido a DADs (23). Asimismo, la estructura anatómica de las venas pulmonares está compuesta por ramificaciones y cambios bruscos de orientación de sus fibras, lo que también es un elemento que aumenta su capacidad para generar actividad ectópica y promueve el mecanismo de reentrada eléctrica (23). Además, las venas pulmonares se localizan muy cerca del sistema marcapaso cardíaco modulando sus propiedades eléctricas, así como de otras regiones auriculares, contribuyendo a la susceptibilidad a la FA (23).

Las células auriculares presentan un potencial de reposo de -80 mV. Cuando la célula se despolariza, este voltaje se vuelve más positivo, y después, por los mecanismos anteriormente mencionados, vuelve otra vez a su potencial de reposo (9). La actividad ectópica se da cuando las corrientes de entrada de sodio o calcio aumentan las cargas positivas dentro de la célula. O bien, cuando se reduce la corriente de repolarización

producida por la salida de iones de potasio que reduce las cargas positivas que salen de la célula. En estos dos supuestos, la membrana estará más despolarizada y será más fácil alcanzar el umbral de descarga y que se produzca actividad ectópica (9).

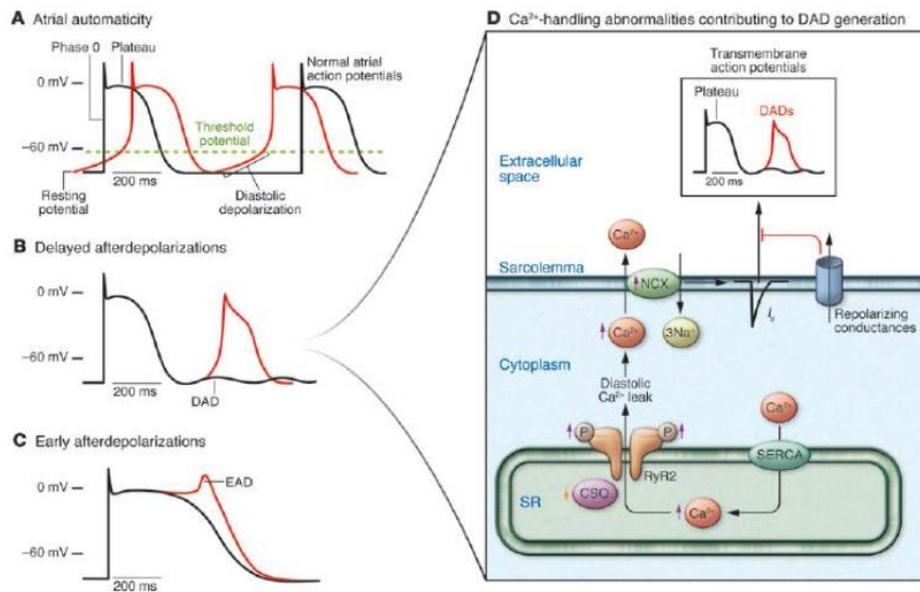
Los principales mecanismos que favorecen la actividad ectópica focal en la aurícula son la automaticidad auricular, despolarizaciones espontáneas de membrana tardías (DADs) o tempranas (EADs) (9)

La automaticidad auricular (ver **figura 11A**) ocurre cuando el tiempo de despolarización aumenta. Las corrientes de entrada de sodio o calcio aumentan las cargas positivas en el interior de la célula, aumentando así el tiempo de despolarización. También puede suceder cuando se disminuye la corriente de repolarización producida por la salida de iones de potasio, disminuyendo las cargas positivas intracelulares. En estos supuestos, es más fácil alcanzar el umbral de descarga y que se produzca la automaticidad auricular. Si esta automaticidad se da antes de un latido con ritmo sinusal, resulta en una activación ectópica auricular (9).

Los DADs (ver **figura 11B-D**) son uno de los mecanismos principales implicados en la aparición de arritmias auriculares. Éstos son el resultado de una liberación espontánea de calcio de RS durante la diástole, después de la repolarización (12), donde parte del calcio liberado espontáneamente es expulsado por NCX1, creando una corriente de entrada transitoria ( $I_{T1}$ ) de una carga positiva por cada ion de calcio, que da lugar a la DAD. Si la DAD es de una amplitud suficientemente grande para alcanzar el umbral de descarga de los canales de sodio, se generará un PA espontáneo y el origen de un foco ectópico. Por lo tanto, si el RS se sobrecarga de calcio o existe una disfunción del RyR2 (por ejemplo, por una excesiva fosforilación), las liberaciones espontáneas de calcio aumentarán, elevando las posibilidades de que se produzcan arritmias. Por otro lado, si CSQ-2 no secuestra bien el calcio, los RyR2 se activan y libera el calcio con más facilidad contribuyendo a la aparición de arritmias (111).

Los EADs se producen cuando el PA se prolonga excesivamente, lo cual da tiempo suficiente para que los canales de calcio puedan recuperarse de su inactivación y activarse de nuevo, produciendo otra corriente de entrada de calcio durante el PA dando lugar a una nueva despolarización o EAD (**figura 11C**), de forma que se aumenta el umbral de descarga de las células adyacentes, permitiendo que estas se despolaricen y se produzca actividad ectópica (112).

En la **figura 11** se muestran los tres mecanismos que pueden producir actividad ectópica focal en la aurícula (9).



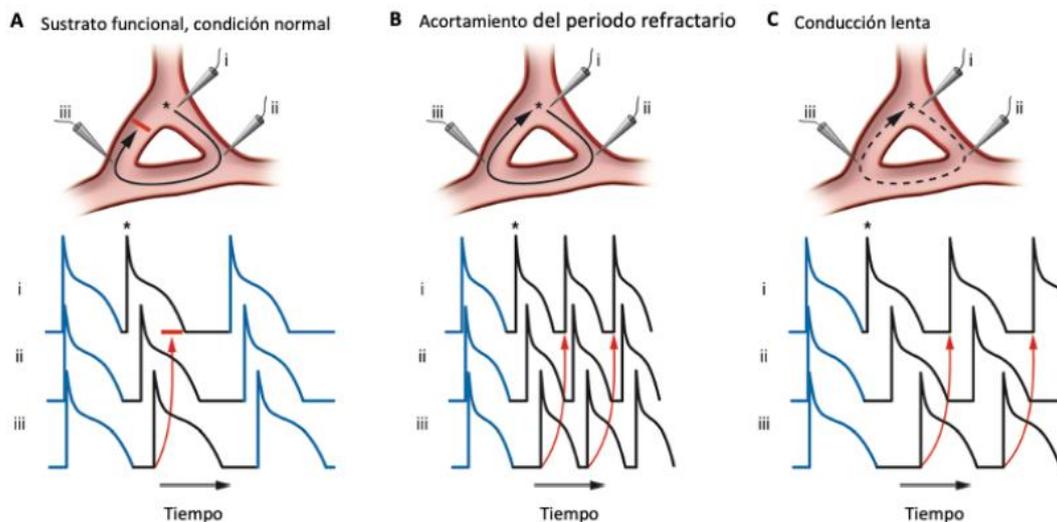
**Figura 11: Mecanismos que contribuyen a la actividad ectópica auricular. A)** Actividad automática : El registro marcado en línea negra representa el PA fisiológico auricular. En cambio, el registro rojo representa la actividad automática anormal resultante de la despolarización diastólica espontánea. Esta despolarización es capaz de llegar al umbral de descarga y generar un PA. **B)** DAD: se representa una despolarización espontánea anormal de la membrana que se genera después de la repolarización completa del potencial de la membrana. **C)** EAD: Se representa una despolarización espontánea anormal de la membrana que se genera antes de que se haya completado la repolarización. **D)** Podemos observar los mecanismos principales implicados en la generación de un DAD. Se muestra cómo el calcio resultante de la apertura de los RyR2, es eliminado de la célula a través de NCX, generando una I<sub>Na</sub> capaz de despolarizar la membrana y generar un DAD (figura obtenida del artículo Wakili et al. 2011) (9).

Una variedad de mutaciones que promueven eventos de liberación espontánea de calcio durante la diástole y la formación de actividad ectópica mediada por DAD también se han asociado con el inicio espontáneo de FA, al igual que el síndrome de QT largo, que también se ha asociado con FA espontánea, aparentemente al inducir actividad ectópica mediada por EAD (23).

## REENTRADA ELÉCTRICA

En los pacientes que sufren FA paroxística se les ha detectado bajo voltaje en el electrograma, conducción eléctrica más lenta, período refractario efectivo más corto y una mayor vulnerabilidad a la inducción de FA durante la estimulación eléctrica programada. Estos factores indican un sustrato propenso a la reentrada eléctrica. Además, el contenido fibrótico auricular en pacientes con FA paroxística aumenta. Por lo tanto, la aparición de FA es más probable si existe un sustrato propenso a la reentrada, y la actividad ectópica parece ser un desencadenante importante del mecanismo de reentrada (23).

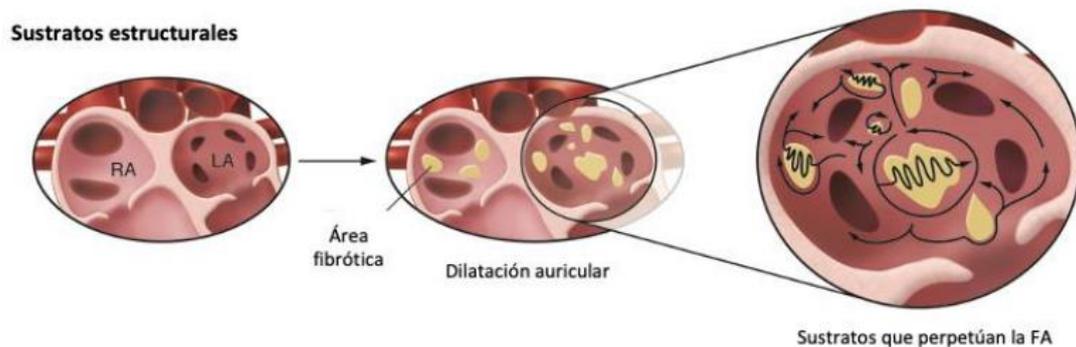
Para que se produzca el fenómeno de reentrada eléctrica debe haber un sustrato vulnerable. Éste puede estar causado por alteraciones electrofisiológicas o por remodelado estructural de la aurícula. El período refractario es el intervalo de tiempo después del último PA en el que el tejido no se puede excitar. En la **figura 12** se representa cómo funcionaría este mecanismo de reentrada.



**Figura 12: Factores electrofisiológicos que intervienen en el fenómeno de la reentrada eléctrica.** A) Se representa cómo un latido prematuro, que se origina en el punto “i”, es conducido al punto “ii”, que ya no se encuentra en el período refractario por lo que el impulso puede seguir y llegar al punto “iii”. Pero al llegar a este último punto, el impulso no puede seguir ya que las células aún se encuentran en su periodo refractario. En este caso, no se produce el fenómeno de reentrada ya que el tiempo refractario es más largo que el tiempo que tarda el impulso en llegar del punto “i” al “iii”, de manera que el impulso no puede avanzar. B) En este caso, vemos que la duración del PA es menor al

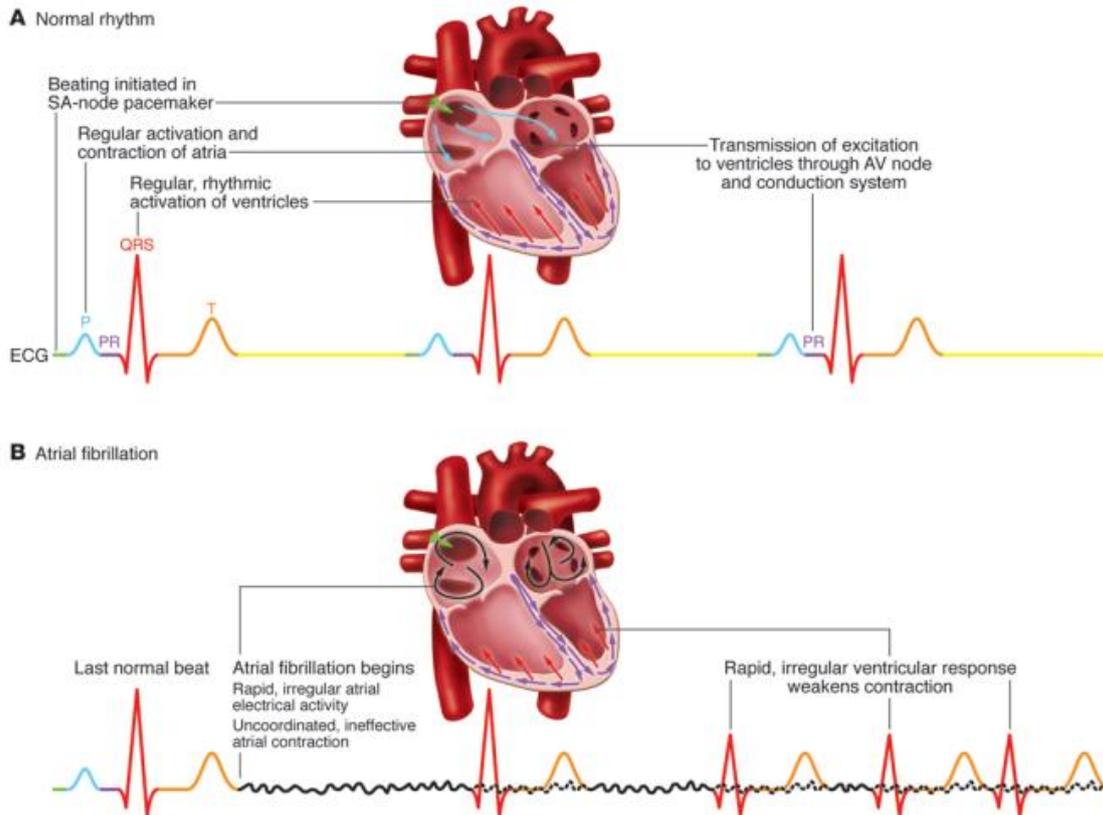
igual que la duración del periodo refractario. Esto hace que el tiempo que transcurre desde que el impulso viaja del punto “i” al “iii” sea suficientemente corto como para que se restaure la excitabilidad y se pueda dar la reentrada, perpetuándose en el tiempo. C) Cuando se reduce la velocidad de conducción del impulso y el tiempo que transcurre desde el punto “i” al punto “iii” es mayor, da tiempo a que se termine el periodo refractario y se pueda volver a excitar nuevamente la célula, dándose el fenómeno de reentrada (figura adaptada del artículo Wakili R, et al. 2011) (9).

En la **figura 13** se muestra el fenómeno de reentrada debido a una remodelación estructural. Se representan áreas fibróticas y dilatación auricular, y cómo viaja el impulso de una forma más lenta por el tejido anómalo. Esta remodelación favorece la iniciación y mantenimiento de múltiples circuitos de reentrada, perpetuando la arritmia.



**Figura 13. Remodelado estructural del tejido que promueve el fenómeno de reentrada.** Representación del fenómeno de reentrada, producido por una remodelación del tejido auricular causado por dilatación auricular y fibrosis (figura adaptada del artículo Wakili R, et al. 2011) (9).

El resultado de esta remodelación eléctrica y estructural es un ritmo cardíaco anómalo (**figura 14**).



**Figura 14: Registros de ECG de ritmo sinusal y FA.** En la **figura 14 A** podemos observar el ritmo cardíaco normal, donde el nodo sinoatrial inicia el impulso nervioso y luego éste se transmite por todo el corazón. No hay actividad ectópica de fuentes distintas al nodo sinoatrial. En cambio, en la **figura 14 B** vemos reflejada la FA en el ECG, donde vemos que se reemplaza las ondas P regulares por una línea base ondulante que refleja una activación auricular anormal, con QRS ventriculares irregulares (figura obtenida del artículo Wakili R, et al. 2011) (9).

## 2.5. PAPEL DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO EN LA REGULACIÓN DEL RITMO AURICULAR.

La actividad de los nervios autónomos juega un papel importante en el inicio y mantenimiento de la FA y su modulación puede contribuir al control de esta arritmia.

El corazón está inervado por el sistema nervioso autónomo (SNA), por lo que éste puede inducir cambios en la electrofisiología del corazón. Concretamente, la activación del sistema nervioso simpático puede inducir taquiarritmias auriculares como la FA (2). Los ganglios nerviosos autónomos están situados fuera (extrínsecos) y dentro (intrínsecos) del

corazón, y ambos son importantes para la función cardíaca y la arritmogénesis (113). Los nervios simpáticos provienen de varios núcleos en la médula y la inervación simpática extrínseca del corazón se compone de los ganglios paravertebrales, incluido el cervical superior, el cervical medio y el ganglio estrellado, y los ganglios torácicos (114). Los nervios cardíacos intrínsecos se encuentran principalmente en la aurícula y tienen un papel fundamental en la regulación del ritmo auricular (115). En la unión entre las venas pulmonares y la aurícula izquierda existen numerosos nervios autónomos, teniendo una densidad mayor dentro de los 5 milímetros de la unión entre estas dos estructuras (2). Además, se ha observado que su densidad es más alta en el epicardio que en el endocardio auricular.

Los nervios adrenérgicos y colinérgicos concomitan a nivel tisular y celular. También, una proporción significativa (30 %) de las células ganglionares expresa fenotipos adrenocolinérgicos duales. Por eso, al existir estructuras nerviosas donde ambas partes del sistema nervioso autónomo se encuentran juntas, es difícil realizar una ablación con catéter de radiofrecuencia que pueda eliminar selectivamente los brazos puramente simpáticos o parasimpáticos del SNA (2).

## **REGULACIÓN SIMPÁTICA DE LA ELECTROFISIOLOGÍA DE LOS CARDIOMIOCITOS AURICULARES**

La neurotransmisión simpática es el resultado de la excitación de las terminaciones nerviosas simpáticas a través de la generación de un impulso eléctrico que se propaga por los nervios postsinápticos eferentes como por ejemplo el ganglio estrellado. Las neuronas involucradas se encargan de la producción, liberación, recaptación y degradación de los neurotransmisores simpáticos, siendo la noradrenalina el principal neurotransmisor (116). Éste se sintetiza en el soma celular, se transporta y se almacena en vesículas (juntamente con otros neuropéptidos) que posteriormente a la despolarización nerviosa y mediante exocitosis, se liberan al espacio sináptico en un proceso que es dependiente de calcio (116). Una vez liberada, la noradrenalina es recaptada rápidamente por los mecanismos de recaptación celular o bien degradada por enzimas, limitando así la cantidad de este neurotransmisor en el espacio sináptico. Además de la recaptación y la degradación enzimática, la acción de la noradrenalina está controlada por la retroalimentación negativa a través de los receptores presinápticos (2). Este neurotransmisor interactúa con los receptores adrenérgicos en los cardiomiocitos para ejecutar acciones adrenérgicas (116).

Existen 3 subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta_{1-3}$ ), de los cuales los receptores  $\beta_1$  son los más relevantes para las arritmias auriculares. Estos receptores forman parte de una gran familia de receptores acoplados a proteína G que incluye 3 subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  se unen entre sí formando una subunidad  $G\beta\gamma$ . La principal subunidad  $G\alpha$  adrenérgica es la  $G\alpha_s$ , o subunidad “estimuladora”. Cuando el receptor  $\beta$  está desocupado, la mayor parte de  $G\alpha_s$  se une a  $G\beta\gamma$ . La unión de la noradrenalina al receptor beta conduce a la unión de GTP de la subunidad  $G\alpha_s$ , lo que reduce su afinidad por  $G\beta\gamma$ , que se disocia y permite que la subunidad  $G\alpha_s$  libre active el AC, que convierte el ATP en AMPc, que es el segundo mensajero  $\beta$ -adrenérgico primario. El AMPc activa la PKA, que ejerce una amplia gama de efectos al fosforilar las proteínas de membrana, incluidas las proteínas que manejan el calcio y los canales iónicos (ver **Figura 15**) (2).

Las principales causas que provocan alteraciones en el ritmo cardíaco a partir de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica se relacionan con el manejo del calcio por parte de los cardiomiocitos. La principal finalidad de esta estimulación en el corazón es el aumento del gasto cardíaco durante las situaciones de lucha o huida. De esta forma, se potencian prácticamente todos los procesos que controlan la entrada, almacenamiento y liberación de calcio en este tipo celular. Este proceso se inicia a través de la PKA y se amplifica por proteína quinasa II, que es dependiente de CaMKII. Estas dos proteínas a su vez pueden fosforilar varias proteínas involucradas en la regulación del calcio intracelular, como son fosfolamban (PLB), los  $Ca_v1.2$  y los RyR2 (**Figura 15**) (2).

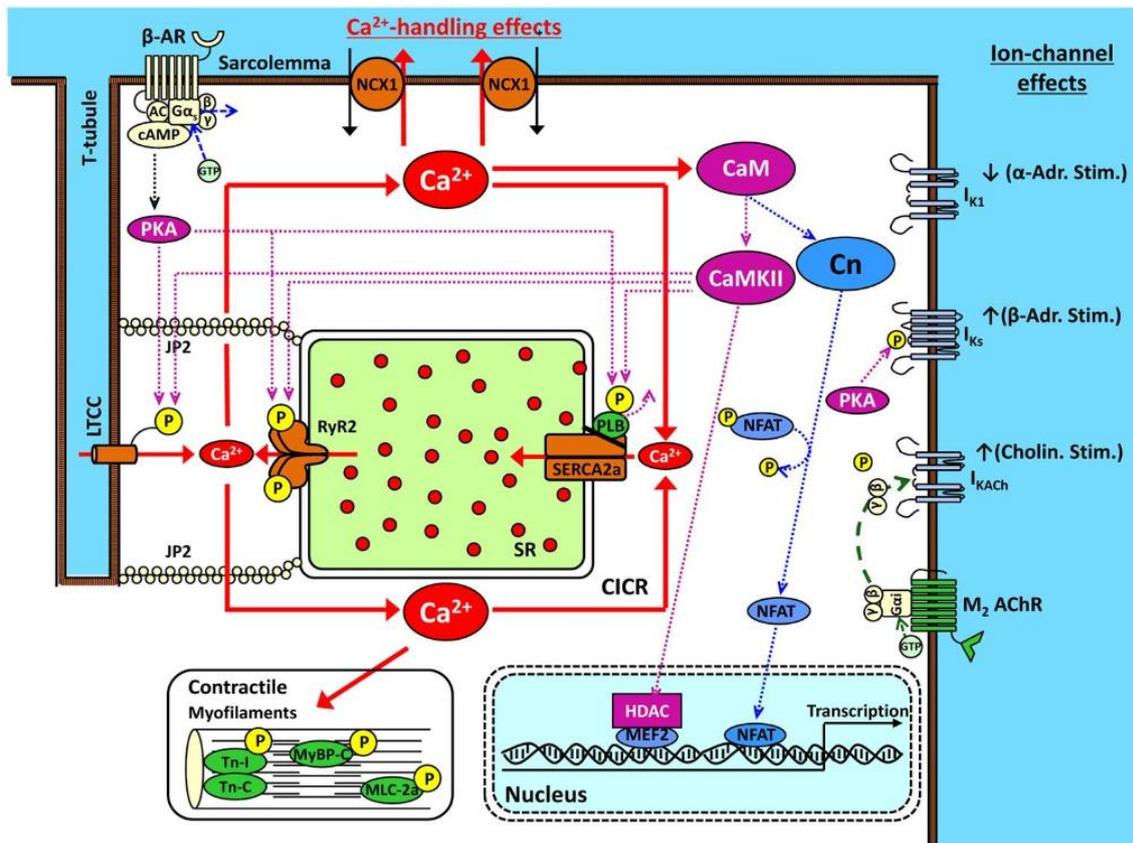
- Cuando PLB está unida a SERCA2a la inhibe. Su fosforilación hace que se disocie de SERCA2a, desinhibiendo el bombeo de calcio de SERCA2a hacia el RS.
- La fosforilación de los RyR2 aumenta la liberación de calcio del RS.
- La fosforilación de los  $Ca_v1.2$  aumenta la entrada de calcio a través de la membrana plasmática (117).

La fosforilación de los RyR2 y los  $Ca_v1.2$  provoca en gran medida el aumento de las concentraciones de calcio durante la sístole y, en consecuencia, de la fuerza de contracción. SERCA2a es el principal mecanismo responsable de mantener las reservas de calcio del RS, recaptando este ion liberado durante la sístole y, de esta manera, restaurando los niveles bajos de éste durante la diástole. La fosforilación de PLB inducida adrenérgicamente por PKA y CaMKII disocia PLB de SERCA2a, desinhibiendo el bombeo de calcio de SERCA2a hacia el RS (118).

Cuando el organismo se ve sometido a un estrés agudo, la activación adrenérgica proporciona un sustrato idóneo para aumentar la función cardíaca dependiente de calcio. Aunque en condiciones fisiológicas la función cardíaca se ve mejorada, el aumento de la carga/liberación del calcio producida por la estimulación adrenérgica es potencialmente arritmogénica (2).

## **REGULACIÓN PARASIMPÁTICA DE LA ELECTROFISIOLOGÍA DE LOS CARDIOMIOCITOS AURICULARES**

Por otro lado, se sintetiza ACh a partir de la colina y la acetilcoenzima-A a través de la colina acetiltransferasa, principalmente en las terminaciones nerviosas colinérgicas, donde se concentra en las vesículas sinápticas. La liberación de ACh se inhibe por retroalimentación a través de los receptores muscarínicos presinápticos y la acetilcolinesterasa es la encargada de su degradación (119). El receptor colinérgico cardíaco es un subtipo muscarínico tipo 2 (M2). Los receptores M2-ACh también están acoplados a proteína G, siendo la proteína G "inhibidora"  $G_{\alpha i}$  el principal subtipo unido a  $G\beta\gamma$ . Cuando la ACh interactúa con el receptor M2, se produce la interacción  $G_{\alpha i}$ -GTP y, en cuanto a los receptores adrenérgicos, esto provoca la disociación de las subunidades  $G\beta\gamma$  de  $G_{\alpha i}$  que inhibe AC y la producción de AMPc. Por otro lado, a diferencia de la activación adrenérgica que utiliza  $G_{\alpha s}$  como la principal proteína G de señalización, los efectos colinérgicos también se deben a la activación de la corriente de potasio activado por ligando  $I_{K_{ACh}}$  por  $G\beta\gamma$ . Los canales de potasio que conducen la corriente  $I_{K_{ACh}}$ , están compuestos por las subunidades  $K_{ir}3.1$  y  $K_{ir}3.4$  (120). La activación de  $I_{K_{ACh}}$  produce una corriente de salida de potasio en la fase de despolarización durante el PA cardíaco, por lo que su activación da como resultado una reducción de la duración del PA (2). La Figure 15 resume como la señalización por receptores acoplados a proteínas G modula la homeostasis del calcio y corrientes iónicas en cardiomiocitos.



**Figura 15: Base molecular de las contribuciones autonómicas.** La activación del receptor β-adrenérgico (β-AR) provoca la unión de GTP a la subunidad G<sub>αs</sub>, lo que le permite disociarse de las subunidades G<sub>β</sub> y γ y activar la AC, que convierte el ATP en AMPc. Éste activa la PKA, que fosforila una variedad de proteínas que manejan el calcio, incluido Cav1.2 (LTCC), RyR2 y PLB. La fosforilación de PLB hace que se disocie de SERCA2a, eliminando la inhibición de PLB y activando la captación de calcio al RS. La fosforilación de RyR2 aumenta la probabilidad de apertura de éste, posibilitando la sistólico, pero también incrementa la fuga de calcio diastólica. La estimulación adrenérgica también aumenta la unión calcio a la CaM, lo que activa la CaMKII, que fosforila muchas de las mismas proteínas que la PKA. La fosforilación de LTCC aumenta I<sub>CaL</sub> y cambia su dependencia del voltaje para causar corrientes de entrada más grandes. La estimulación adrenérgica también inhibe la I<sub>K1</sub> y aumenta la I<sub>Ks</sub>. Activación colinérgica de los receptores de acetilcolina (AChR) muscarínicos tipo 2 (M2) que provocan la unión de GTP a G<sub>αi</sub>, liberando G<sub>βγ</sub> y permitiéndole activar la corriente I<sub>KACh</sub> (figura obtenida del artículo Chen P, et al. 2014) (2).

### **2.5.1. REMODELACIÓN AUTONÓMICA Y FIBRILACIÓN AURICULAR**

La inervación del SNA en el corazón se remodela constantemente, y con más frecuencia en estados patológicos. El aumento de la inervación simpática auricular se asocia con una mayor incidencia y duración de la FA tanto en modelos animales como en humanos. Además, las enfermedades cardíacas, como el infarto de miocardio, pueden aumentar potencialmente las actividades nerviosas y promover el desarrollo de arritmias tanto auriculares como ventriculares (2). La inervación autónoma anómala puede tener un papel relevante en los mecanismos de la FA (2,3,121,122).

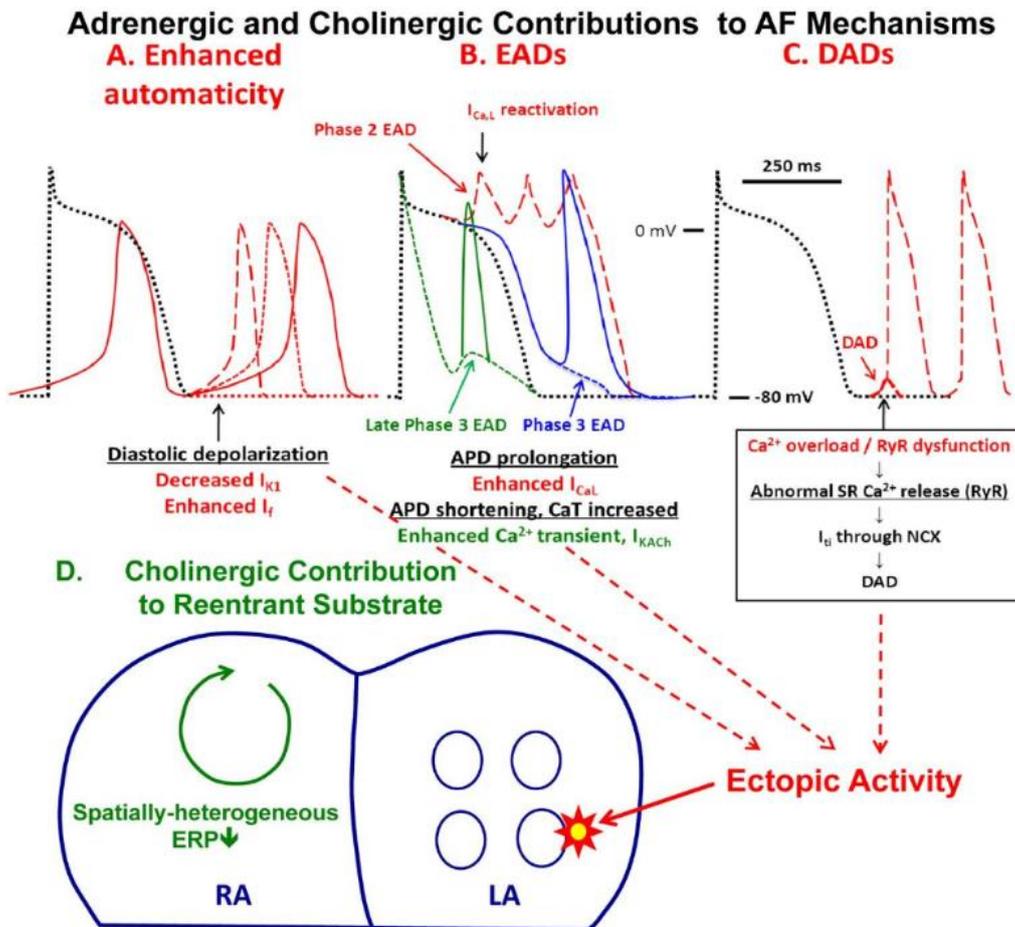
### **2.5.2. EFECTOS AUTONÓMICOS SOBRE LOS MECANISMOS QUE GOBIERNAN LA APARICIÓN DE FIBRILACIÓN AURICULAR**

Dos de los principales mecanismos fisiopatológicos asociados con la FA son la actividad ectópica focal y el mecanismo de reentrada. La activación adrenérgica puede, a través de los principales mecanismos celulares, promover la actividad ectópica focal: mejora el automatismo (**Figura 16 A**), EAD (trazados discontinuos, **Figura 16 B**) o actividad desencadenada asociada a las DADs (trazados discontinuos rojos, **Figura 16 C**) (2,123).

Por un lado,  $I_{K1}$  proporciona una corriente de salida diastólica que evita la despolarización espontánea. La automaticidad se ve reforzada por la reducción de esta corriente. La activación  $\beta$ -adrenérgica mejora la meseta de  $I_{CaL}$  (a través de la fosforilación de PKA/CaMKII), lo que aumenta la probabilidad de EAD, particularmente cuando el aumento adrenérgico de  $I_{K1}$  es deficiente (por ejemplo, en el tipo de síndrome de QT largo). Las DADs (**Figura 16 C**) son el resultado de la fuga diastólica de calcio de los RyR2, favorecidas por el sistema  $\beta$ -adrenérgico que carga la célula de calcio y por el aumento de la probabilidad de apertura de RyR2 debido a la fosforilación de PKA/CaMKII (2).

Por otro lado, el acortamiento del período refractario es un factor que promueve el mecanismo de reentrada. La estimulación vagal es capaz de disminuir el período refractario de la aurícula y lo hace al aumentar el  $I_{KACH}$  (2). Tanto la remodelación estructural como la funcional contribuyen de manera importante al mecanismo de reentrada, y por tanto a la persistencia de la FA. La estimulación  $\beta$ -adrenérgica aumenta

la unión del calcio con la CaM, que activa la proteína-fosfatasa calcineurina. Ésta última, desfosforila el factor nuclear del factor de transcripción de las células T activadas, lo que le permite trasladarse al núcleo y alterar la transcripción de genes, induciendo la expresión de genes hipertróficos y profibróticos. La estimulación adrenérgica también promueve la remodelación estructural a través de otras acciones, incluidas las acciones mediadas por CaMKII, y el estrés oxidativo, entre otras (2).



**Figura 16. Mecanismos por los cuales el tono del sistema nervioso autónomo puede promover la fibrilación auricular.** En la parte superior de la imagen podemos observar los cambios en el potencial de acción donde se muestran los mecanismos celulares por los cuales la activación adrenérgica puede conducir a una descarga ectópica focal. Las líneas de puntos negras muestran un potencial de acción normal. **A.** Mejora de la automaticidad. **B.** Posdespolarizaciones tempranas (EAD). **C.** Posdespolarización retardada (DAD). Las contribuciones de la activación adrenérgica se muestran en la línea roja de punto, y la colinérgica se muestra con línea verde de puntos. La estimulación adrenérgica durante la fase 2 del potencial de acción, puede causar EAD (línea de puntos rojos en la figura B). La mayoría de los EAD en la fase 3 del potencial de acción también

se asocian con DPA prolongada (línea de puntos azules en la figura B). La descarga vagal/adrenérgica combinada puede producir EAD al final de la fase 3 (línea discontinua verde en la figura B). **D.** En la parte inferior de la imagen, se observa el mecanismo de arritmia a nivel tisular, con actividad ectópica focal que mantiene la FA como impulsora o actúa sobre sustratos de reentrada. El estímulo parasimpático libera acetilcolina, disminuyendo el período refractario y el potencial de acción, promoviendo la aparición y el mantenimiento de la reentrada. (Figura obtenida del artículo de Dridi et al. 2020) (107).

En conclusión, la regulación del tono simpático de los pacientes que padecen FA es, pues, un buen abordaje para mejorar la sintomatología de esta enfermedad, y una mejor comprensión de los efectos electrofisiológicos inducidos al bloquear los receptores  $\beta$ -adrenérgicos es un factor importante que puede contribuir a mejorarla.

## **2.6. EL INFARTO Y LA FIBRILACIÓN AURICULAR**

El infarto de miocardio es una de las causas más frecuentes de FA y la cardiopatía isquémica es uno de los cuadros clínicos más frecuentes en humanos (24). Se ha observado que la isquemia auricular experimental crea un sustrato para el mantenimiento de la FA al provocar un enlentecimiento de la conducción local que promueve la reentrada que mantiene la FA. (24).

## **2.7. LA FIBROSIS Y LA FIBRILACIÓN AURICULAR**

La fibrosis contribuye decisivamente al desarrollo de la FA (22). Se han descrito varios mecanismos que desempeñan un papel importante en el desarrollo de la FA a través de la remodelación estructural y eléctrica del tejido auricular. Uno de ellos es la fibrosis auricular, que se define como el depósito de proteínas de matriz extracelular en el tejido intersticial miocárdico, causado por la excesiva proliferación patológica de fibroblastos. La función fisiológica de estas células es del mantenimiento del parénquima del tejido cardíaco (124). Cuando se da el proceso fibrótico, los fibroblastos se diferencian a miofibroblastos. Estas nuevas células son responsables de la reducción de la velocidad de la conducción en el miocardio, estableciendo un sustrato idóneo para las arritmias (124).

## **2.8. LA INFLAMACIÓN Y LA FIBRILACIÓN AURICULAR**

La inflamación, que también contribuye a la remodelación auricular, se ha relacionado con el inicio y el mantenimiento de la FA (22). Bajo el estrés inflamatorio, la angiotensina II estimula la producción de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-6, IL-8) y el reclutamiento de células inmunitarias. Esta hormona se ha relacionado con la fibrosis y la remodelación estructural del tejido cardíaco, promoviendo la diferenciación de fibroblastos. (22).

Se ha demostrado que la inflamación inducida por el infarto de miocardio puede promover la remodelación auricular a través de la activación de receptores tipo Toll; factores del sistema inmune innato (22).

## **2.9. MODELOS ANIMALES DE FIBRILACIÓN AURICULAR**

Como ya hemos dicho, a pesar de que la FA es la arritmia más frecuente en el ser humano, con una alta morbilidad y mortalidad, aún se necesita mejorar la comprensión de la enfermedad para poder proponer nuevas vías terapéuticas.

La FA es una enfermedad que raramente aparece en la mayoría de las especies, y los modelos animales han sido de gran ayuda para la comprensión de ésta y de algunas opciones terapéuticas. Aun así, la fisiología básica de los modelos animales difiere de la del humano, impidiendo la creación de un modelo animal perfecto (25).

Aunque los modelos de FA son abundantes, la capacidad traslacional de éstos es limitada. Por ello, es importante la incorporación de nuevas tecnologías avanzadas para desarrollar modelos animales que se asemejen mejor a la FA humana, para así poder avanzar en la comprensión y las potenciales terapias para que puedan ser finalmente aplicadas en la práctica clínica.

La FA, aunque tiene una prevalencia en el ser humano, en la naturaleza es poco común. Frecuentemente, los animales utilizados para estudiar esta enfermedad sólo suelen manifestar esta arritmia en el entorno experimental, y raramente supera un día de duración. Además, las especies utilizadas son un grupo heterogéneo que varía ampliamente desde una perspectiva electrofisiológica; expresión de canales iónicos y

características del PA. Además, la FA humana es heterogénea, multifactorial y de desarrollo lento, por lo que los modelos animales solo pueden reproducir aspectos particulares de la misma sin representar exactamente su compleja fisiopatología (25). Aun así, el uso de modelos animales es adecuado cuando se estudian mecanismos específicos que tienen una traslacionalidad al ser humano (25).

## **2.9.1. PEQUEÑOS MODELOS ANIMALES DE FIBRILACIÓN AURICULAR**

### **2.9.1.1. RATA Y RATÓN**

Los ratones generalmente no desarrollan FA, a no ser que se les induzca. Aunque existen modelos de ratón de FA espontánea, se requiere de manipulación genética que genere una disfunción cardíaca grave y remodelación auricular, que conlleva a una disminución de la vida útil del animal (125). Por lo tanto, los modelos de ratón para la FA tienen una viabilidad limitada. Aun así, los modelos que se han centrado en los factores de riesgo clínicos y que generalmente producen remodelación auricular e inducen la aparición de FA, han sido valiosos para identificar vías de señalización. Por ejemplo, se sospechaba del papel de la inflamación en la FA y gracias a numerosos modelos de ratón se vio que varios procesos inflamatorios cursaban con esta enfermedad (126). El problema de los modelos en ratón es su facilidad en generarlos y, a veces pueden exagerar un vínculo fisiopatológico con la FA, siendo difícil su posterior interpretación (25). Sin embargo, la aparición de la técnica CRISPR/Cas9 aún ha acelerado más la manipulación genética dirigida y se ha podido poner en contexto el papel, por ejemplo, de *Pitx2* en dicha enfermedad en modelos murinos. Además, esta técnica también ha permitido demostrar que las variantes genéticas en el cromosoma 4q25, región próxima al gen *Pitx2*, se asocian con la aparición de esta enfermedad (127). Por lo tanto, el uso de modelos de ratón nos ha permitido avanzar significativamente en la comprensión del genoma y cómo influye en la aparición de FA.

En caso de las ratas, estas comparten muchas de las ventajas, pero también de las limitaciones que acabamos de comentar en los ratones. Un ejemplo de las ventajas del uso de modelos de rata es que, como consecuencia de la consanguinidad selectiva de ratas hipertensas, espontáneamente éstas desarrollan una hipertensión “hereditaria” que causa una remodelación auricular y una propensión a la FA (128). Aun así, y aunque existen

muchos otros modelos de rata, los modelos de ratón se han superpuesto a los de rata en los estudios relacionados con la FA (25).

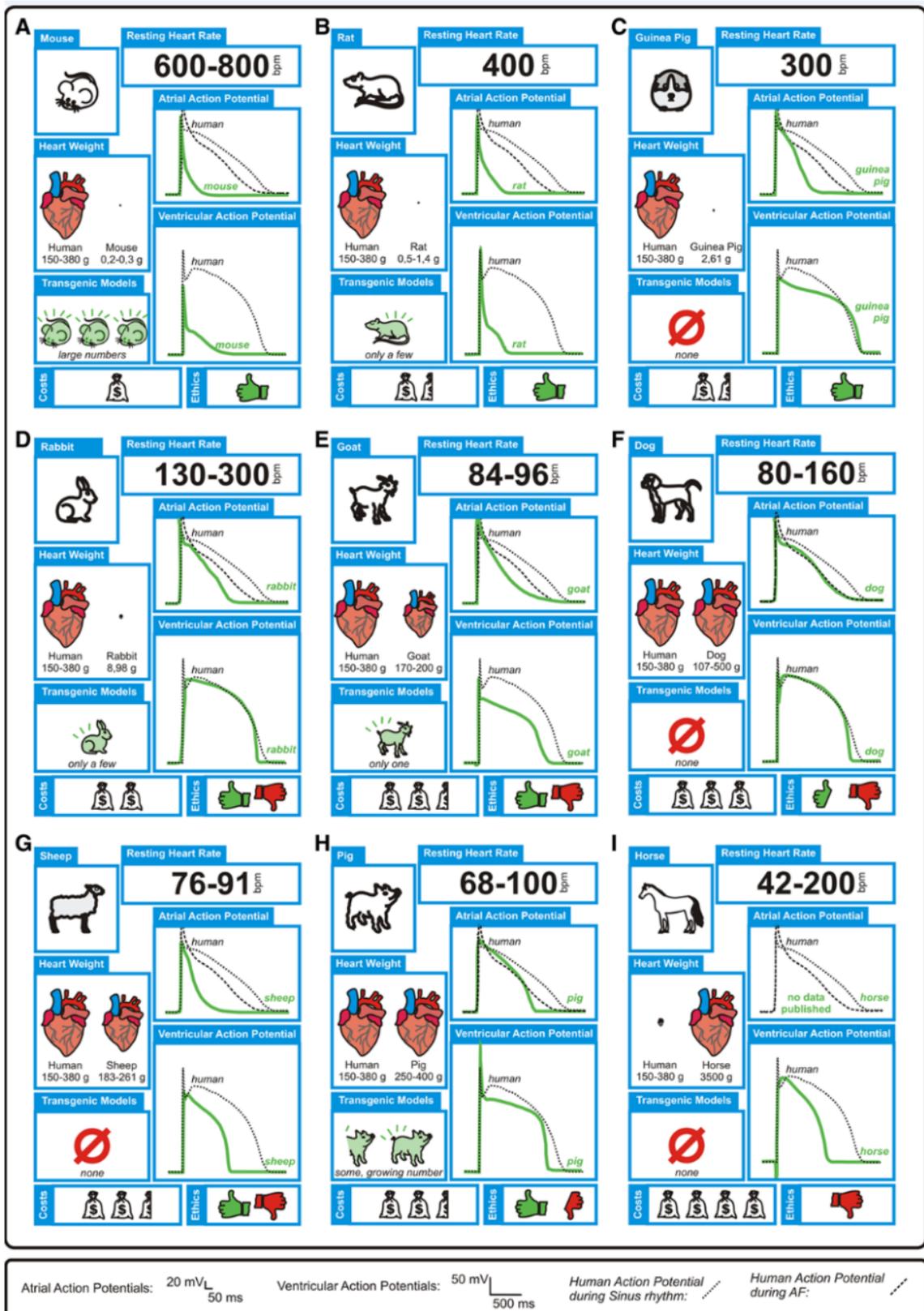
Así, podemos concluir que los roedores se utilizan frecuentemente en el estudio de la FA ya que son muy accesibles y fáciles de generar y manipular. Además, nos permiten responder a preguntas mecanicistas complejas de manera relativamente rápida y económica.

Las desventajas principales de los modelos en roedor se derivan sobre todo en la diferencia sustancial en la escala y en la electrofisiología entre los corazones de los roedores y de los humanos. Por ejemplo, los roedores tienen una frecuencia cardíaca mucho más elevada en reposo, diferente expresión de canales iónicos y de la densidad de corrientes que dan como resultado un PA diferente al de los humanos (129). Además, al ser modelos tan pequeños, es imposible utilizar las herramientas que se usan en la electrofisiología humana como catéteres mutielectrodo, marcapasos, etc. O el uso del mapeo intracardíaco que se usa rutinariamente en los estudios electrofisiológicos y de ablación de arritmias (130).

#### **2.9.1.2. CONEJILLO DE INDIAS Y CONEJO**

A diferencia de los modelos de rata y ratón, la electrofisiología celular de los conejillos de indias y conejos se parece mucho más a la humana. Una de las principales causas de la poca utilización de estas especies es por la dificultad que presentan para su manipulación genética. Aun así, trabajar con estos modelos presenta ventajas a la hora de realizar estudios farmacológicos que se centran en la repolarización, y su mayor tamaño resulta en una manipulación experimental más sencilla (25).

Por lo tanto, la extrapolación de los resultados de estos modelos de FA en pequeños animales debe contextualizarse bien, y en la mayoría de los casos requiere validación en mamíferos más grandes. Aun así, los animales pequeños son muy útiles para demostrar vías de señalización que contribuyen a esta enfermedad en humanos, pero su fisiopatología no está necesariamente bien representada en ellos. Por lo que deben verse como un punto de partida para seguir investigando o como fuente para generar nuevas hipótesis, y no para llegar a resultados definitivos (25).



**Figura 17. Parámetros fisiológicos de diferentes especies animales utilizadas en la investigación de la fibrilación auricular.** Se comparan los parámetros fisiológicos más relevantes que difiere entre las diferentes especies animales utilizadas en la investigación

de la fibrilación auricular. Las características que se muestran son: la frecuencia cardiaca, el potencial de acción (forma y duración) ventricular y auricular, el peso del corazón, si existen modelos transgénicos, el coste del modelo y las consideraciones éticas (figura extraída de Schüttler et al. (2020)) (25).

## **2.9.2. MODELOS ANIMALES GRANDES DE FIBRILACIÓN AURICULAR**

### **2.9.2.1. CABRA**

En 1995, Wijffels et al. establecieron una estrategia para crear un modelo de FA estimulando la aurícula a altas frecuencias con marcapasos. Esta técnica se ha utilizado ampliamente en cabras y otros modelos. Por otro lado, un estudio de Wijffels et al. demostró que el mantenimiento de la FA modifica la electrofisiología de la aurícula, provocando un aumento en la vulnerabilidad a padecer dicha enfermedad, y concluyendo que la misma FA se perpetúa (131). Además, se ha demostrado que las cabras toleran relativamente bien la FA, pudiendo utilizarse para estudios de larga duración (6 meses), y que desarrollan FA de una duración de aproximadamente dos semanas. Es decir, son un modelo muy útil para el estudio de la remodelación estructural y eléctrica en la FA (132–135).

Otra ventaja de la utilización de cabras como modelo de FA es que desarrollan dilatación de la aurícula izquierda (al igual que los humanos), que causa una disfunción contráctil y un mayor riesgo a padecer esta enfermedad. Este modelo se crea con un bloqueo atrioventricular crónico (136).

Por lo tanto, los modelos de FA en cabra nos permiten investigar la remodelación estructural y eléctrica asociada a la FA sostenida en el tiempo, ya que esta enfermedad puede generarse durante varias semanas en esta especie (25).

### **2.9.2.2. PERROS**

Los perros son considerados animales de compañía, por lo que suelen recibir atención médica veterinaria. Gracias a esto, se han reportado casos de FA en la clínica y hoy se conoce que esta especie puede desarrollar dicha enfermedad espontáneamente. La FA en la especie canina se produce como resultado de una cardiopatía estructural. Por ejemplo, la enfermedad mixomatosa de la válvula mitral aparece comúnmente en esta especie, y se ha relacionado con un aumento de la aurícula izquierda e insuficiencia cardíaca en

animales de avanzada edad. A medida que avanza la insuficiencia cardiaca, la FA puede aparecer (comorbilidad) siendo un signo de mal pronóstico, aumentando la mortalidad (137). Hay que añadir que rara vez los perros presentan complicaciones tromboembólicas (138).

Esta especie se ha utilizado ampliamente y se han realizado estudios con modelos de FA inducidos experimentalmente a partir de la estimulación eléctrica rápida de la aurícula (marcapasos). Este modelo se ha usado ampliamente para el estudio de la remodelación eléctrica (25). Además, esta especie también se ha identificado como potencial modelo para los estudios de ablación de la FA en pacientes (139) y como modelo inflamatorio. Por ejemplo, se utilizó el modelo de pericarditis estéril para el estudio de los mecanismos fundamentales de la FA y permitió demostrar que durante la FA postoperatoria se genera una conducción auricular heterogénea que mejora con terapias antiinflamatorias (140). Finalmente, también se han establecido modelos caninos de isquemia auricular, en los cuales se genera una remodelación inducida por el infarto agudo que facilita la reentrada y la FA (24). Además, en este modelo se observó un incremento de liberaciones espontáneas de calcio y de  $I_{NCX}$  (19).

El uso de modelos caninos presenta muchas ventajas entre las que podemos incluir la utilización de instrumentos clínicos, y la similitud que hay con los humanos en la electrofisiología, anatomía cardíaca y hemodinamia. Pero estos modelos tienen la desventaja de que la genética difiere mucho entre razas de perros, lo que hace difícil la comparación entre diferentes estudios. Además, los perros genéticamente modificados no están disponibles, y la sociedad no acepta el uso de esta especie en investigación, de forma que los comités de ética tienden a restringir su uso (25).

### **2.9.2.3. OVEJAS**

Las ovejas son una especie utilizada comúnmente para la investigación de la FA. Aunque no se ha registrado esta enfermedad de manera natural en esta especie, sí se han podido desarrollar modelos experimentales que imitan muchos aspectos de la fisiopatología de la FA humana. Los modelos con marcapasos se utilizan para investigar cambios estructurales, metabólicos y celulares relacionados con la aparición de FA (141). Además, esta especie es útil para generar episodios prolongados de esta patología y en consecuencia para realizar estudios de factores estructurales y remodelación eléctrica. Por ello, se considera un buen modelo para estudios traslacionales que investiguen la

remodelación estructural (142). Este modelo también se puede usar para estudiar nuevas técnicas de mapeo que pueden ser traslacionales en pacientes (143).

Por otro lado, las ovejas también nos permiten estudiar la isquemia y el infarto de la aurícula izquierda y su relación con la FA. Esto es debido a que existe una rama que irriga la aurícula izquierda en su parte posterior y que, al provocar su oclusión, conduce a episodios de FA superiores a dos minutos (144).

El problema de los modelos ovinos es su alto coste en el alojamiento y las diferencias en la fisiología humana en comparación con los cerdos, lo que limita su uso (25).

#### **2.9.2.4. CERDO**

Debido a que el cerdo tiene un tamaño y una electrofisiología del corazón similar al humano, cada vez se usa más para la investigación cardíaca. Además, en este modelo es posible realizar estudios de investigación utilizando herramientas que se usan en la clínica. Hasta la fecha, no hay estudios publicados de FA espontánea en cerdos. Además, debido a las similitudes con los humanos, esta especie es candidata para probar nuevas estrategias de ablación y mapeo (143).

Con frecuencia se ha utilizado el marcapasos para producir FA en cerdos, protocolo con el cual este modelo puede desarrollar la enfermedad en la primera semana des del inicio de la estimulación auricular. Pero este modelo desarrolla fácilmente disfunción sistólica, por lo tanto, la insuficiencia cardíaca congestiva resultante puede contribuir al desarrollo de la FA (145). Para mejorar este modelo, se puede utilizar el bloqueo del nódulo atrioventricular para reducir o prevenir esta disfunción sistólica (146).

Por otro lado, la anatomía coronaria de los cerdos es similar a la de los humanos por lo que se pueden generar infartos que provoquen una miocardiopatía isquémica. Recientemente se han hecho dos estudios donde producían una oclusión en la arteria descendente anterior izquierda durante 90 minutos. Esto aumentó la vulnerabilidad auricular a sufrir episodios breves de FA debido a la remodelación estructural producida por la fibrosis auricular (147,148).

Una de las ventajas del uso de cerdos es que, en la mayoría de los países, la ciudadanía acepta el uso de esta especie en la investigación, en comparación con otros grandes animales (25). Además, como ya se ha comentado anteriormente, los cerdos cuentan con la principal ventaja de que su anatomía cardíaca y coronaria, al igual que su

electrofisiología, son muy similares a la de los humanos. El ECG y los PA también son similares al humano, ya que expresan gran parte de las corrientes humanas exceptuando la corriente  $I_{to}$ . También se ha conseguido modificar genéticamente a esta especie lo que nos permite hacer modelos genéticos (149). Sin embargo, esta especie cuenta con la desventaja de tener un riesgo alto de padecer fibrilación ventricular al tener poca colateralización coronaria, lo que aumenta el número de animales para los experimentos (25).

#### **2.9.2.5. CABALLO**

Se estima que la prevalencia de FA espontánea en caballos es de un 2.3%, y ésta tiene similitudes con la humana. Esta enfermedad puede aparecer tanto en su forma paroxística como persistente, y al igual que en los corredores de largas distancias, los caballos sometidos a altas exigencias físicas son propensos a FA (150). También se ha visto que hay razas de caballos que son más propensas que otras a desarrollar FA, lo que indica que tiene un componente genético (151).

Se ha propuesto el caballo como modelo de FA por sus similitudes a los humanos, sobre todo para estudios de remodelación estructural, eléctrica y estudios farmacológicos (152). Además, experimentalmente se puede inducir esta enfermedad estimulando la aurícula de 2 a 6 segundos, juntamente con la administración de ACh, lo que genera episodios de FA superiores a 15 minutos (153). También se puede inducir esta enfermedad sostenida en el tiempo a partir de marcapasos, lo que permite estudiar la remodelación estructural con un aumento de la fibrosis auricular parecida a la de los humanos (154).

Los caballos son interesantes por su paralelismo con los humanos en la FA, pero son un modelo experimental difícil de utilizar por su complejidad logística (costes altos de estabulación, etc.) (25). Aunque la FA aparezca en esta especie de manera natural, y ésta siga un curso similar a la humana, presenta ciertas desventajas como son una menor frecuencia cardíaca y una diferencia en la duración del PA (155). Además, la sociedad es reticente al uso de esta especie para experimentación animal, al igual que en el caso de los perros (25).

### **2.9.3. ELABORACIÓN DE UN MODELO PROPIO PARA ESTUDIAR LA FIBRILACIÓN AURICULAR**

En resumen, los cerdos son un modelo valioso para el estudio de la FA, ya que su anatomía, hemodinamia y electrofisiología son similares a los humanos. Una de las finalidades de esta tesis es la de generar un nuevo modelo porcino para estudiar la utilidad de fármacos para prevenir la aparición de FA en pacientes sometidos a una oclusión accidental de una rama auricular durante una intervención quirúrgica.

En comparación con el potencial arritmogénico bien documentado de la isquemia miocárdica ventricular aguda, se sabe menos sobre las alteraciones electrofisiológicas inducidas por la isquemia selectiva a nivel miocárdico auricular (156). Está ampliamente aceptado que la aparición de FA en pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST, denota una isquemia miocárdica extensa que afecta a las cavidades auriculares. En el primer estudio prospectivo de las alteraciones electrofisiológicas inducidas por el infarto agudo auricular en humanos (156), se observó que los pacientes que sufrían oclusión de las ramas arteriales coronarias auriculares, durante la angioplastia coronaria transluminal percutánea electiva, presentaban una mayor incidencia de trastornos de la conducción intraauricular, desviación del segmento PR y episodios de taquicardia auricular y FA que los pacientes con vasos auriculares permeables. Así, ese estudio abrió la puerta a nuevas investigaciones, ya que se proponía que el infarto auricular es, *per se*, una causa de arritmias auriculares en los hombres, y la oclusión de la rama coronaria auricular debe considerarse como una posible causa de FA (156). La arritmogénesis de la isquemia miocárdica ventricular se ha estudiado ampliamente, pero faltan modelos de isquemia auricular en humanos. El desarrollo de estos modelos es importante y necesario debido a que la oclusión selectiva de la arteria coronaria auricular se ha asociado con daño isquémico miocárdico, arritmias auriculares y un retraso de la conducción intraauricular, y debido también a que los episodios isquémicos auriculares podrían considerarse una causa potencial de FA (156).

Se ha intentado hacer una caracterización directa del sustrato electrofisiológico isquémico auricular en estudios experimentales en animales sometidos a ligadura selectiva de ramas coronarias auriculares (24,157–159). En estos modelos se mapeó los electrogramas locales en la superficie de la aurícula y se obtuvo como resultado un enlentecimiento de

la conducción local en la zona isquémica. Esto creó un sustrato dónde era más fácil el mantenimiento y la inducción de FA (156).

Por lo tanto, crear un modelo experimental porcino de IA nos permitiría estudiar si fármacos como los bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos pueden prevenir los efectos producidos por un infarto auricular entre los cuales encontraríamos las arritmias auriculares como la FA, mejorando así la comprensión de sus mecanismos fisiopatológicos.

### 3. RESULTADOS

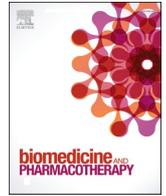
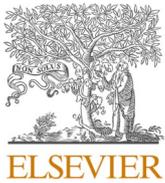
#### 3.1. **Artículo 1:** *Beta-blocker treatment of patents with atrial fibrillation attenuates spontaneous calcium release-induced electrical activity.*

Jiménez-Sábado V, **Casabella-Ramón S**, Llach A, Gich I, Casellas S, Ciruela F, Chen SRW, Guerra JM, Ginel A, Benítez R, Cinca J, Tarifa C, Hove-Madsen L. *Beta-blocker treatment of patents with atrial fibrillation attenuates spontaneous calcium release-induced electrical activity.*

Biomed Pharmacother. 2023 Feb;158:114169.

doi: 10.1016/j.biopha.2022.114169. Epub 2022 Dec 31. PMID: 36592495.

Impact Factor 7,76 Q1



## Beta-blocker treatment of patients with atrial fibrillation attenuates spontaneous calcium release-induced electrical activity

Verónica Jiménez-Sábado<sup>a,b,1</sup>, Sergi Casabella-Ramón<sup>b,c,d,1</sup>, Anna Llach<sup>b</sup>, Ignasi Gich<sup>b,e</sup>, Sandra Casellas<sup>f</sup>, Francisco Ciruela<sup>g,h</sup>, S.R. Wayne Chen<sup>i</sup>, José M. Guerra<sup>a,b,j</sup>, Antonino Ginel<sup>f</sup>, Raúl Benítez<sup>k</sup>, Juan Cinca<sup>j</sup>, Carmen Tarifa<sup>b,c,2</sup>, Leif Hove-Madsen<sup>a,b,c,\*,2</sup>

<sup>a</sup> CIBER Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>b</sup> IIB Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC), Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Department of Cell Biology, Physiology and Immunology and Neuroscience Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>f</sup> Servicio de Cirugía Cardíaca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>g</sup> Pharmacology Unit, Dept. Pathology and Experimental Therapeutics, School of Medicine and Health Sciences, Institute of Neurosciences, University of Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>h</sup> Neuropharmacology and Pain Group, Neuroscience Program, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>i</sup> Department of Physiology and Pharmacology, The Libin Cardiovascular Institute, University of Calgary, Canada

<sup>j</sup> Servicio de Cardiología and Univ. Autònoma de Barcelona, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>k</sup> Dept. d'Enginyeria de Sistemes, Automàtica i Informàtica Industrial, Univ. Politècnica de Catalunya, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

β-blocker treatment  
Human atrial myocyte  
Sarcoplasmic reticulum  
Calcium currents  
Calcium sparks  
Arrhythmia

### ABSTRACT

**Aims:** Atrial fibrillation (AF) has been associated with excessive spontaneous calcium release, linked to cyclic AMP (cAMP)-dependent phosphorylation of calcium regulatory proteins. Because β-blockers are expected to attenuate cAMP-dependent signaling, we aimed to examine whether the treatment of patients with β-blockers affected the incidence of spontaneous calcium release events or transient inward currents ( $I_{T1}$ ).

**Methods:** The impact of treatment with commonly used β-blockers was analyzed in human atrial myocytes from 371 patients using patch-clamp technique, confocal calcium imaging or immunofluorescent labeling. Data were analyzed using multivariate regression analysis taking into account potentially confounding effects of relevant clinical factors

**Results:** The L-type calcium current ( $I_{Ca}$ ) density was diminished significantly in patients with chronic but not paroxysmal AF and the treatment of patients with β-blockers did not affect  $I_{Ca}$  density in any group. By contrast, the  $I_{T1}$  frequency was elevated in patients with either paroxysmal or chronic AF that did not receive treatment, and β-blocker treatment reduced the frequency to levels observed in patients without AF. Confocal calcium imaging showed that β-blocker treatment also reduced the calcium spark frequency in patients with AF to levels observed in those without AF. Furthermore, phosphorylation of the ryanodine receptor (RyR2) at Ser-2808 and phospholamban at Ser-16 was significantly lower in patients with AF that received β-blockers.

**Conclusion:** Together, our findings demonstrate that β-blocker treatment may be of therapeutic utility to prevent spontaneous calcium release-induced atrial electrical activity; especially in patients with a history of paroxysmal AF displaying preserved  $I_{Ca}$  density.

\* Correspondence to: Cardiac Rhythm and Contraction Group, Biomedical Research Institute Barcelona, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, St Antoni M<sup>e</sup> Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.

E-mail address: [leif.hove@iibb.csic.es](mailto:leif.hove@iibb.csic.es) (L. Hove-Madsen).

<sup>1</sup> Authors contributed equally

<sup>2</sup> Co-senior authors.

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2022.114169>

Received 6 October 2022; Received in revised form 21 December 2022; Accepted 28 December 2022

Available online 31 December 2022

0753-3322/© 2022 Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) has been associated with structural, molecular and electrophysiological abnormalities [1,2]. Moreover, the autonomic nervous system has been reported to play an important role in the initiation and maintenance of AF [3–5] and an increase in sympathetic nerve density has been observed in atrial samples from patients with AF [6,7]. This increase in sympathetic activity is mainly produced by the activation of G-protein coupled β-adrenergic receptors [3,8] that stimulate adenylyl cyclase, which increases cyclic AMP (cAMP) levels and activates protein kinase A (PKA) [3,8,9] that then phosphorylates calcium regulatory proteins such as phospholamban (PLB) and the cardiac ryanodine receptor (RyR2) [10,11]. Several studies have shown that hyperphosphorylation of the RyR2 increases spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum (SR) and this has been proposed to contribute to the induction of atrial arrhythmias [3,12–15].

Interestingly, β-adrenergic receptor blockers (β-blockers) are commonly used for the treatment of patients with atrial arrhythmias [8, 16], although mostly intended for rate control management [8,17]. Among the different β-blockers used in clinical practice, carvedilol also modifies RyR2 gating directly [18], and some studies have shown that carvedilol is effective in suppressing spontaneous RyR2-mediated calcium waves and preventing calcium release-induced triggered ventricular arrhythmias in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) or heart failure (HF) [18,19].

These findings suggest that β-blocker treatment might prevent excessive spontaneous calcium release reported to induce after-depolarizations in patients with AF [20]. Because studies of human atrial myocytes almost exclusively have been focusing on the effects of acute pharmacological treatments of isolated myocytes, the present study aimed to assess how β-blocker treatment of patients affects spontaneous calcium release and currents in atrial myocytes from these patients, in

order to determine the net impact of this treatment on intracellular calcium homeostasis by taking into account potentially confounding effects of concurrent disease and other relevant clinical factors.

### 2. Methods

#### 2.1. Study population

We analyzed 371 consecutive patients undergoing cardiac surgery in our institution. All patients gave written consent to obtain the right atrial tissue samples that would otherwise have been discarded during the surgical intervention. The study protocol was approved by the Ethics Committee at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Spain). Patients were divided into four groups with or without reported episodes of AF that did or did not receive treatment with β-blockers. Clinical characteristics, echocardiographic data, and treatment of the four patient groups are summarized in Table 1.

#### 2.2. Study protocol

Right atrial myocardial samples were collected from these patients, processed for cell isolation by enzymatic digestion as previously described [21], and subjected to one or several of the experimental protocols described below, depending on the yield of the myocyte isolation (see Supplementary Figure 1).

#### 2.3. Patch-clamp technique

Electrophysiological recordings (using a HEKA EPC-10 amplifier) were performed using the amphotericin (250 μg/ml) perforated voltage-clamp configuration at room temperature as previously described [22]. Briefly, the L-type calcium current (I<sub>Ca</sub>) was measured using a 50 ms

**Table 1**

Clinical characteristics of the study population. The chronic AF group includes patients with persistent and permanent AF. Categorical values are given as number of patients with the condition and % of patients in parenthesis. Continuous values are given as mean ± standard error. The statistical significance of differences among the four patient groups is given on the right for each factor and was evaluated using Chi-Square test for categorical data or using one-way ANOVA for continuous values. Smoking was divided into three groups (No-, Ex- and smokers). ACE inhibitor, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; AVR, aortic valve replacement; CABG, coronary artery bypass graft; LAD index, left atrial diameter index; LVEF, left ventricular ejection fraction. \*Factors included as confounders in the linear regression analysis.

	NoAF, Untreated (n = 170)	NoAF, β-blockers (n = 97)	AF, Untreated (n = 60)	AF, β-blockers (n = 44)	p-value
<b>Chronic AF</b>	-	-	36	31	
<b>Paroxysmal AF</b>	-	-	24	13	
*Age, years	65.36 ± 1.02	66.94 ± 1.07	69.87 ± 1.44	67.82 ± 1.31	0.078
*Sex					< 0.05
<b>Female</b>	60 (35.3%)	24 (24.7%)	28 (46.7%)	21 (47.7%)	
<b>Male</b>	110 (64.7%)	73 (75.3%)	32 (53.3%)	23 (52.3%)	
<b>Echocardiographic characteristics</b>					
<b>LAD index</b>	2.30 ± 0.04	2.34 ± 0.05	2.98 ± 0.09	2.66 ± 0.09	< 0.001
<b>LVEF, %</b>	58.14 ± 1.08	56.33 ± 1.46	60.34 ± 1.84	58.95 ± 2.04	0.361
<b>Cardiovascular risk factors</b>					
<b>Smoking</b>	24 (14.1%)	14 (14.4%)	3 (5.0%)	8 (18.2%)	0.052
<b>Ex-smoking</b>	60 (35.3%)	41 (42.3%)	21 (35.0%)	8 (18.2%)	
*Arterial hypertension	95 (55.9%)	63 (64.9%)	35 (58.3%)	26 (59.1%)	0.549
*Diabetes	39 (22.9%)	41 (42.3%)	8 (13.3%)	14 (31.8%)	< 0.001
<b>Dyslipidemia</b>	92 (54.1%)	48 (49.5%)	22 (36.7%)	22 (50.0%)	0.144
<b>Surgical treatment</b>					
*AVR	105 (61.8%)	32 (33%)	40 (66.7%)	20 (45.5%)	< 0.001
*MVR	20 (11.8%)	9 (9.3%)	31 (51.7%)	19 (43.2%)	< 0.001
<b>CABG</b>	88 (51.8%)	71 (73.2%)	16 (26.7%)	18 (40.9%)	< 0.001
<b>Pharmacological treatment</b>					
*ACE-inhibitor	50 (29.4%)	36 (37.1%)	29 (48.3%)	16 (36.4%)	0.066
*ARB	28 (16.5%)	15 (15.5%)	9 (15.0%)	4 (9.1%)	0.682
<b>Calcium antagonists</b>	35 (20.6%)	10 (10.3%)	7 (11.7%)	4 (9.1%)	0.057
*Dicoumarin	7 (4.1%)	4 (4.1%)	33 (55.0%)	31 (70.5%)	< 0.001
<b>Digoxin</b>	2 (1.2%)	1 (1.0%)	28 (46.7%)	9 (20.5%)	< 0.001
<b>Acetyl salicylic acid</b>	66 (38.8%)	59 (60.8%)	9 (15.0%)	9 (20.5%)	< 0.001
<b>Statins</b>	82 (48.2%)	71 (73.2%)	20 (33.3%)	19 (43.2%)	< 0.001

prepulse from  $-80$  to  $-45$  mV (to inactivate  $I_{Na}$ ), followed by a 200 ms depolarization to 0 mV. Transient inward currents ( $I_{TI}$ ) activated by spontaneous calcium waves were recorded at  $-80$  mV. The caffeine releasable SR calcium content was estimated from the time-integral of the transient inward current elicited by rapid exposure to 10 mM caffeine at rest. The current-voltage relationship for the L-type calcium current ( $I_{Ca}$ ) was obtained using test potentials between  $-40$  and  $+50$  mV.

#### 2.4. Confocal calcium imaging

Myocytes were loaded with 2  $\mu$ M CAL-520 AM for 20 min at room temperature, followed by wash and de-esterification for at least 30 min. Confocal images ( $512 \times 140$  pixels) were recorded at a sampling frequency of 90 Hz, using a resonance-scanning confocal microscope (Leica SP5 AOBs, Wetzlar, Germany) with a 63x glycerol-immersion objective. CAL-520 was excited at 488 nm and fluorescence emission was measured between 500 and 650 nm with a Leica Hybrid Detector. Laser power was set to 20% of 100 mW and attenuated to 4%. Calcium sparks were recorded at room temperature and detected using custom-made algorithms developed with MATLAB (Mathworks Inc., Boston, MA) as previously described [23].

#### 2.5. Immunofluorescent labeling

Human atrial myocytes were plated onto laminin coated FluoroDish™ (World Precision Instruments) and fixed with 5% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Subsequently, cells were first incubated with PBS / Glycine 0.1 M during 10 min and then with PBS / 0.2% Triton X-100 for 15 min to permeabilize the cells. To block the non-specific sites, the cells were incubated with PBS / 0.2% Tween 20, and 10% Horse serum, for at least 30 min. Total and Ser-2808 phosphorylated RyR2 were labeled using the primary antibodies mouse anti-RyR2 (1:1200; C3-33 NR07, Calbiochem) and rabbit anti-Ser-2808 P (1:1200; A010-30, Badrilla). Antibodies AlexaFluor 488 anti-mouse (1:2000; A21200, Molecular Probes) and AlexaFluor 594 anti-rabbit (1:1500; A11012, Molecular Probes) were used to stain total RyR2 green, and Ser-2808 phosphorylated RyR2 red. Images were acquired with a confocal microscope (Leica AOBs SP5, Wetzlar, Germany) and a 63x glycerol immersion objective.

#### 2.6. Western blot

Right atrial samples were pulverized in liquid nitrogen and homogenized in ice-cold lysis buffer containing (in mM): 50 HEPES, 100 NaCl, 2.5 EGTA, 10 glycerol-2-phosphate 1 DTT, protease inhibitors (Roche), 0.1% (v/v) Tween 20%, and 10% (v/v) glycerol at pH= 7.4. Proteins were separated by SDS-PAGE (10% acrylamide:bisacrylamide) and electrotransferred onto Immobilon polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Membranes were incubated with primary antibodies against total phospholamban (PLB) (A010-14, Badrilla), PLB phosphorylation at ser-16 (A010-12AP, Badrilla) and PLB phosphorylation at thr-17 (A010-13AP, Badrilla). Detection was performed with horseradish peroxidase-labeled IgG and Supersignal™ detection system (Supersignal West Dura™, Pierce). Molecular-mass standards (Biolin) were used to estimate protein size and alpha-actinin was used as a loading control. Immunoblots were digitized (GS-800 Calibrated Densitometer; Bio-Rad) and analyzed with the Quantity One 4.6.3 software (Bio-Rad).

#### 2.7. Data analysis

**Data collection and analysis.** Analyses of biological experiments were performed without knowledge about clinical data and, unless otherwise stated, values for quantitative variables were averaged for each patient and given as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Medical records

were analyzed by clinicians that had no knowledge about the experimental results.

**Statistical analysis.** To assess the influence of clinical factors on calcium currents, patch-clamp recordings were performed in human atrial myocytes from 371 consecutive patients and data are represented with violin plots to reflect the distribution of the experimental data. For calcium spark analysis, patients without AF but with diabetes and/or mitral valve disease were excluded from the study population in order to 1) avoid confounding effects of these factors and 2) limit the size of the two groups without AF and avoid excessive weight of these groups in the statistical analysis of calcium spark frequency and properties. For this data and subsequent analyses, results are represented in bar graphs with individual data points. Statistical significance for categorical data was evaluated using Chi-Square test. For normally distributed quantitative variables, statistical significance was evaluated using analysis of variance (ANOVA) or a multiple linear regression model taking into account confounding factors indicated in Table 1 with an asterisk. For variables with clear asymmetry, statistical significance was evaluated using a Kruskal-Wallis test, ANOVA test with Welch correction or a general linear model with negative binomial distribution, taking into account confounding factors indicated in Table 1 with an asterisk. The specific statistical test is indicated in text or figure legends. Analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows (V26.0) or R Studio 1.4.1717.

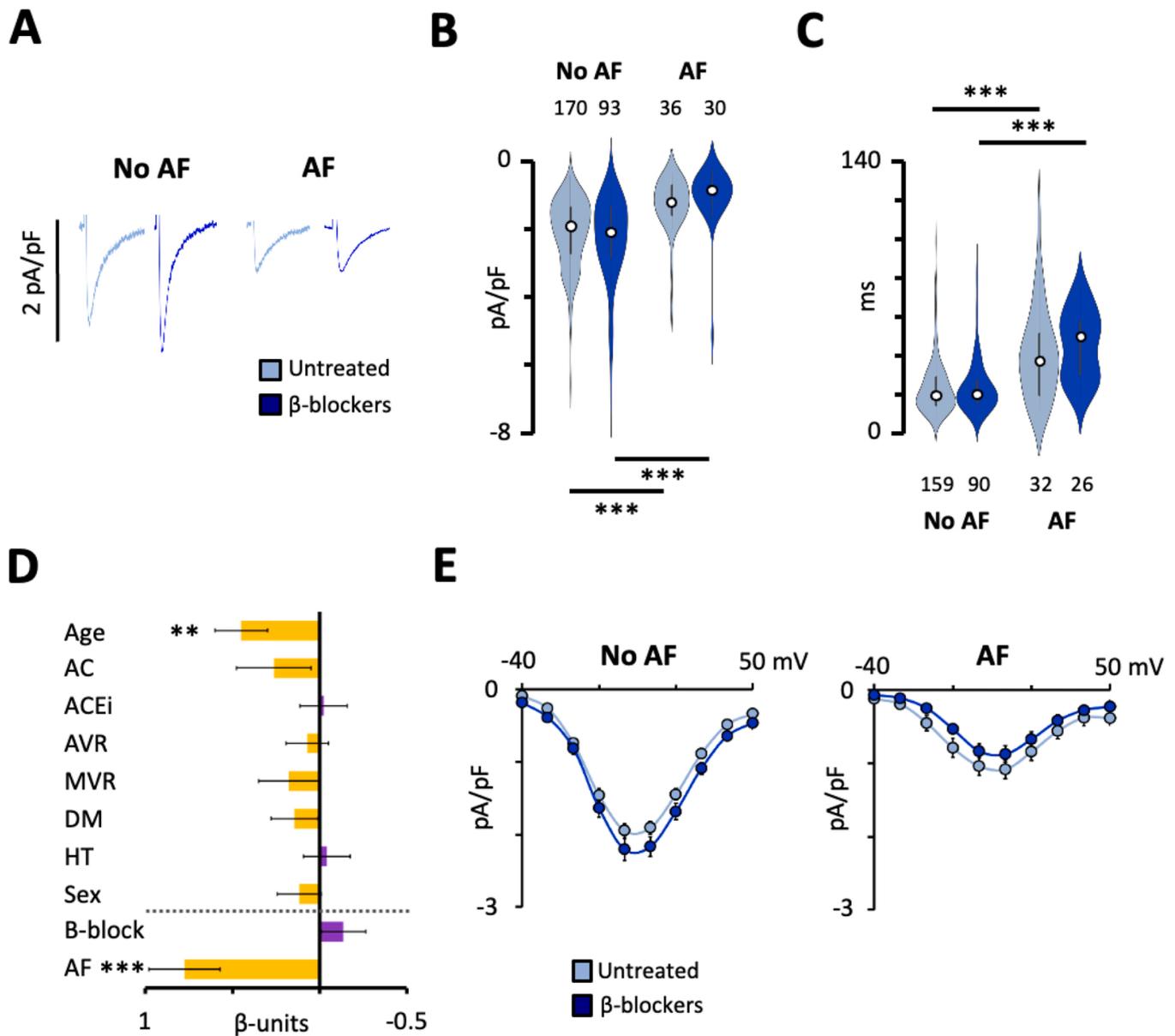
### 3. Results

#### 3.1. $\beta$ -blocker treatment does not modify the L-type calcium current

Classification of myocytes according to the atrial rhythm and the treatment with  $\beta$ -blockers revealed that in patients with chronic AF (long-standing persistent or permanent AF) the  $I_{Ca}$  amplitude was significantly smaller (Fig. 1A-B) and decayed more slowly (Fig. 1C). The treatment with  $\beta$ -blockers did not modify the amplitude or decay of  $I_{Ca}$  in patients with or without AF. Statistical analysis of the data using a linear regression model, taking into account potentially confounding effects of multiple clinical factors showed that only age ( $p = 0.003$ ) affected the L-type calcium current amplitude. Fig. 1D shows the influence of the confounding factors on the  $I_{Ca}$  amplitude. Furthermore,  $\beta$ -blocker treatment did not affect the shape of the current-voltage relationship (Fig. 1E) or the voltage-dependent inactivation of  $I_{Ca}$  (Supplementary Figure 2). Patients with paroxysmal AF were not included in the  $I_{Ca}$  analysis because comparison of these patients and those with chronic AF revealed that only chronic AF affected the  $I_{Ca}$  amplitude.

#### 3.2. $\beta$ -blocker treatment reduces the incidence of $I_{TI}$ s in atrial fibrillation

$\beta$ -blocker treatment did not affect the  $I_{TI}$  frequency in patients without AF. However, the high incidence of  $I_{TI}$ s in patients with AF was significantly reduced in those receiving  $\beta$ -blocker treatment, to levels observed in patients without the arrhythmia (Fig. 2A-B). A linear regression analysis taking into account potentially confounding effects of multiple clinical factors and assuming a negative binomial distribution of the  $I_{TI}$  frequency, confirmed the capacity of  $\beta$ -blocker treatment to independently restore the elevated  $I_{TI}$  frequency observed in AF patients ( $p < 0.001$ ) to that observed in those without AF ( $p < 0.001$ ). Fig. 2C summarizes the influence on the  $I_{TI}$  frequency of the clinical factors included as confounders in the linear regression model. Supplementary Figure 3 shows that the  $I_{TI}$  amplitude was not modified by  $\beta$ -blocker treatment, suggesting that the treatment does not modify the spontaneously released calcium that is extruded by electrogenic  $Na^+Ca^{2+}$  exchange (NCX) during the  $I_{TI}$ . Moreover, we found no significant effect of  $\beta$ -blocker treatment on the caffeine releasable SR calcium content (Fig. 2D-E). Fig. 2F summarizes the influence on the SR calcium load of clinical factors included as confounders in the linear regression



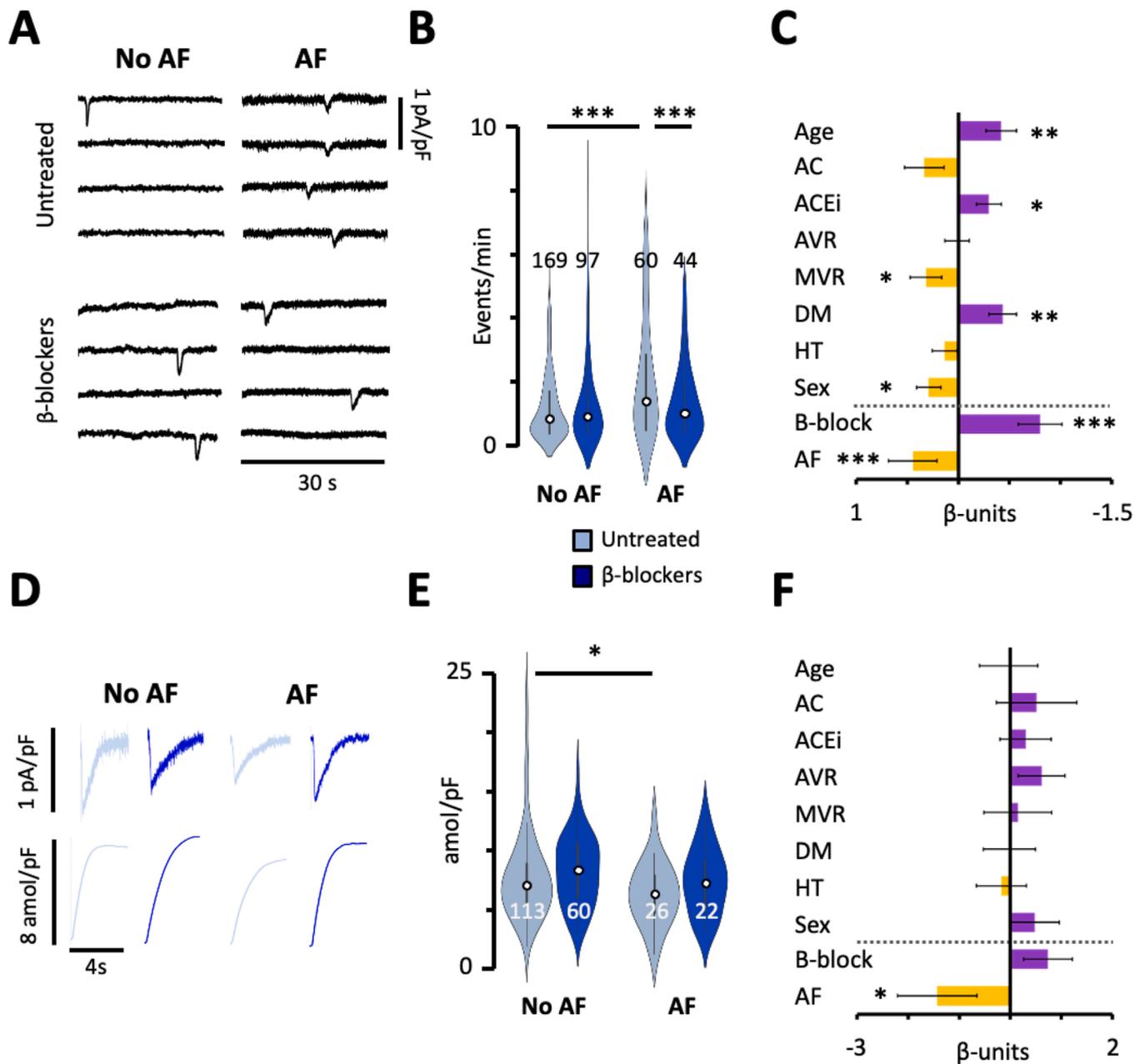
**Fig. 1.** Effect of  $\beta$ -blocker treatment on L-type calcium current. A. Representative  $I_{Ca}$  recordings from patients without AF (left traces) and patients with AF (right traces), untreated (light blue traces) and treated with  $\beta$ -blockers (dark blue traces). B.  $I_{Ca}$  densities in the four patient groups. C. Time constants for fast  $I_{Ca}$  inactivation. Statistical significance in B-C was determined using a linear regression model. D. Beta-values for the impact of confounding factors on the  $I_{Ca}$  density. The effects of  $\beta$ -block and AF are shown for comparison. Pathological effects are yellow and protective effects purple. AC, anticoagulants; ACEi, angiotensin converting enzyme inhibitor; AVR, aortic valve replacement; MVR, mitral valve replacement; DM, diabetes mellitus; HT, hypertension; AF, atrial fibrillation. E. Current-voltage relationship for myocytes from panel B. Statistically significant effects are indicated with \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\* :  $p < 0.001$ . Number of patients is given above or below each group.

model.

Comparison of patients with paroxysmal and chronic AF showed that the  $I_{Tl}$  frequency was similar for the two types of AF and that  $\beta$ -blocker treatment reduced the  $I_{Tl}$  frequency to levels observed in patients without AF (Fig. 3A). Interestingly, the opposite was true for the  $I_{Ca}$  density, which was unaffected by  $\beta$ -blocker treatment but significantly higher in the patients with paroxysmal than permanent AF (Fig. 3B). Furthermore, division of the electrophysiological experiments performed in patients with AF, according to the type of  $\beta$ -blocker they were being treated with, showed that treatment with the most commonly used  $\beta$ -blockers reduced the  $I_{Tl}$  frequency ( $p = 0.04$ ), with significant effects in those treated with bisoprolol or carvedilol (Fig. 3C-D).

### 3.3. $\beta$ -blocker treatment attenuates spontaneous calcium release in atrial fibrillation

Confocal calcium imaging analysis showed that  $\beta$ -blocker treatment also reduced the higher incidence of calcium sparks in patients with AF (Fig. 4A-B). Linear regression analysis confirmed a significant interaction between spark frequency and  $\beta$ -blocker treatment ( $p = 0.001$ ) or atrial rhythm combined with  $\beta$ -blocker treatment ( $p = 0.003$ ). Analysis of individual spark sites revealed that the reduction of spark density was due to a reduction of the number of sparks per site rather than the density of spark sites (Fig. 4C-D). Thus, linear regression analysis showed no significant interaction between spark site density and  $\beta$ -blocker treatment ( $p = 0.97$ ) or atrial rhythm combined with  $\beta$ -blocker treatment ( $p = 0.53$ ) while there was a significant interaction

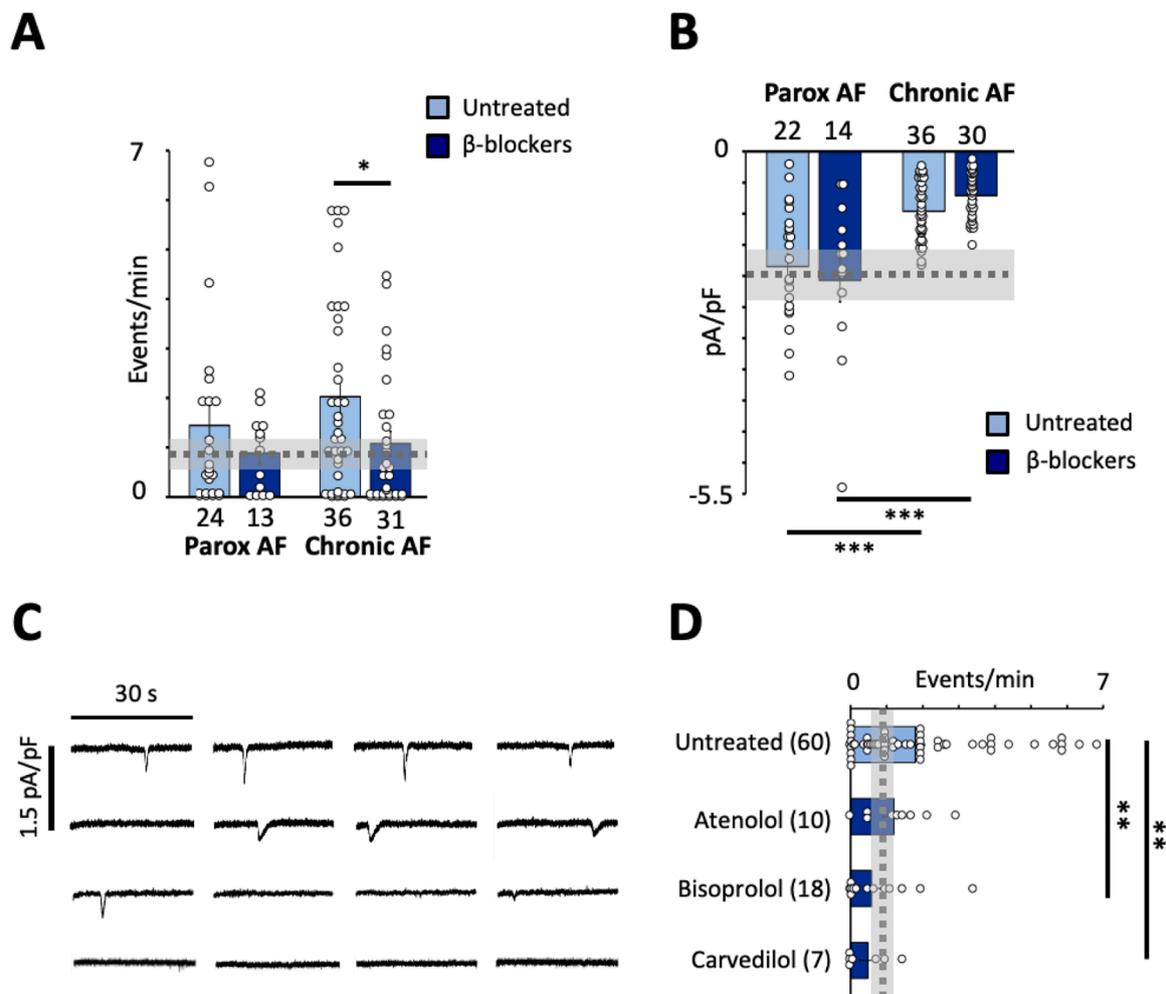


**Fig. 2.** Effect of  $\beta$ -blocker treatment on  $I_{T1}$  frequency and SR calcium load. **A.** Recordings of  $I_{T1}$  currents from patients without AF (left traces) and patients with AF (right traces), untreated and treated with  $\beta$ -blockers. **B.** Mean  $I_{T1}$  frequencies. Statistical significance was determined using a linear regression model with negative binomial distribution. **C.** Beta-values for the impact of confounding factors on the  $I_{T1}$  frequency. **D.** Recordings of caffeine induced NCCX-currents (top) and the corresponding time integrals (bottom) corresponding to the SR calcium load released by caffeine. **E.** Mean SR calcium load for patients with AF and without (No AF). **F.** Beta-values for the impact of confounding factors on SR calcium load. The effects of  $\beta$ -block and AF are shown for comparison. Pathological effects are yellow and protective effects purple. AC, anticoagulants; ACEi, angiotensin converting enzyme inhibitor; AVR, aortic valve replacement; MVR, mitral valve replacement; DM, diabetes mellitus; HT, hypertension; AF, atrial fibrillation. Statistical significance was determined using a linear regression model. Statistically significant effects are indicated with \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . Number of patients is given above or below each group.

between sparks per site and  $\beta$ -blocker treatment ( $p = 0.04$ ). Analysis of the spark kinetics revealed that  $\beta$ -blocker treatment did not affect any spark property in patients without AF, while  $\beta$ -blocker treatment reversed the impact of AF on spark amplitude (Fig. 4E), duration (Fig. 4F) and decay (Fig. 4G) to values observed in patients without AF.

To determine if the observed effects of  $\beta$ -blocker treatment on SR calcium homeostasis were caused by alterations in the phosphorylation of calcium regulatory proteins, we measured phosphorylation of RyR2 clusters at Ser-2808 as well as PLB phosphorylation at Ser-16 and Thr-17. Supplementary Figure 4 shows that the treatment with  $\beta$ -blockers did not affect the RyR2 density and Fig. 5A-B shows that RyR2

phosphorylation at the Ser-2808 residue was not different among patients without AF that did or did not receive  $\beta$ -blockers. However, Ser-2808 phosphorylation was significantly higher in patients with AF that did not receive treatment with  $\beta$ -blockers than in AF patients treated with  $\beta$ -blockers. Accordingly, two-way ANOVA analysis showed significant effects of atrial rhythm ( $p = 0.004$ ),  $\beta$ -blocker treatment ( $p = 0.008$ ) and  $\beta$ -blocker treatment combined with atrial rhythm ( $p = 0.01$ ) on Ser-2808 phosphorylation. In line with these findings, analysis of PLB phosphorylation at Ser-16 showed a significant ( $p = 0.03$ ) interaction with  $\beta$ -blocker treatment (Fig. 5C) whereas PLB phosphorylation at Thr-17 was not affected by atrial rhythm or  $\beta$ -blocker



**Fig. 3.** Effect of the  $\beta$ -blocker and AF-type on  $I_{Ca}$  density and  $I_{T1}$  frequency. A. Comparison of the impact of  $\beta$ -blocker treatment on the  $I_{T1}$  frequency in patients with paroxysmal (Parox) and chronic AF. B. Comparison of the impact of  $\beta$ -blocker treatment on the  $I_{Ca}$  density in patients with paroxysmal and chronic AF. Statistical significance in panel A and B were evaluated using two-way ANOVA followed by Bonferroni adjusted multiple pairwise comparisons. C. Recordings of  $I_{T1}$  currents in myocytes from patients with AF receiving different  $\beta$ -blocker treatments. D. Mean  $I_{T1}$  frequency for each treatment. Statistical significance in panel D was evaluated using ANOVA test with Welch correction followed by Bonferroni adjusted multiple comparisons. Dotted lines and shaded areas indicate mean values and 95% confidence intervals for patients without AF and no  $\beta$ -blocker treatment. The number of patients is given next to each bar. Statistically significant effects are indicated with \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

treatment (Fig. 5D).

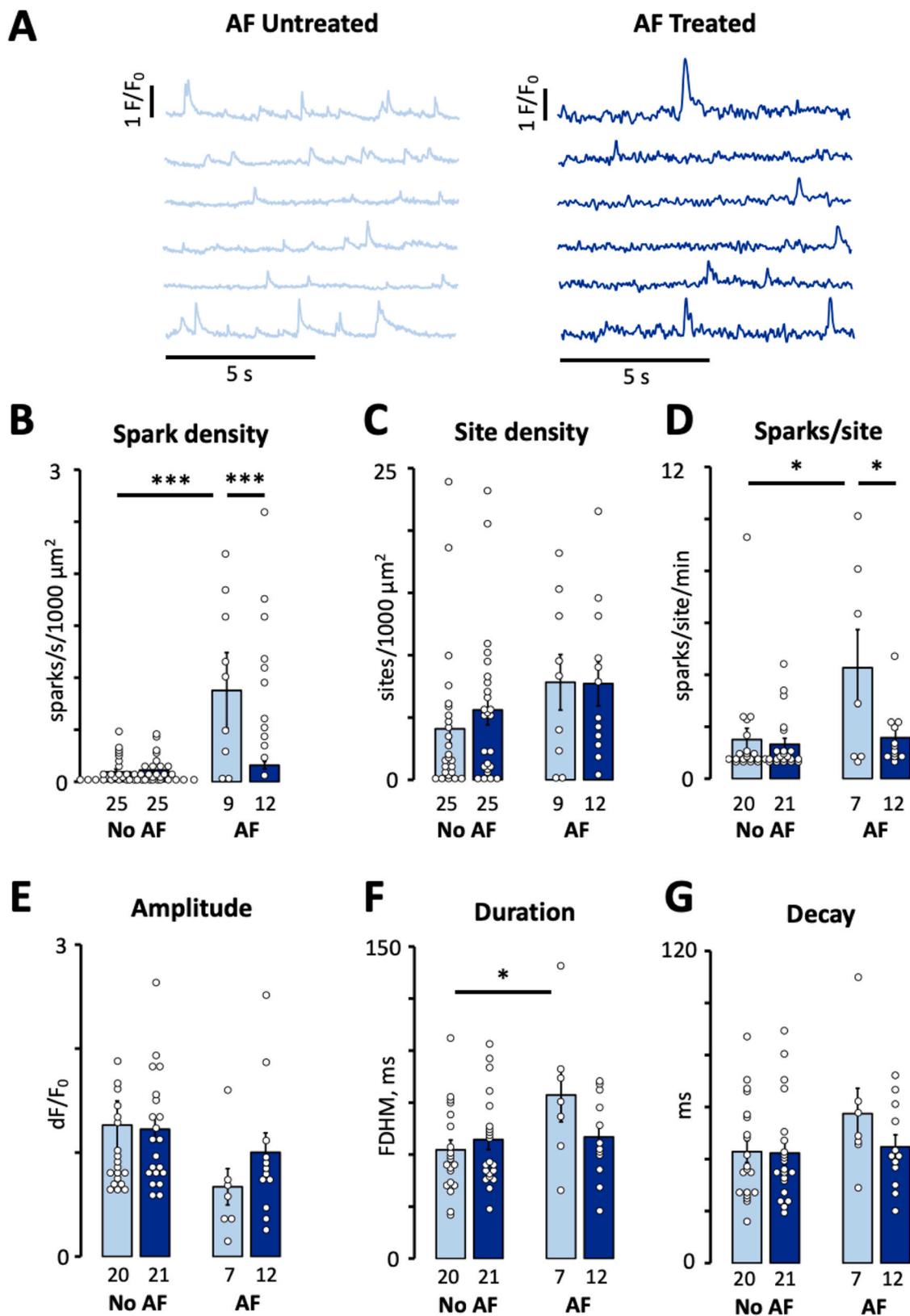
## 4. Discussion

### 4.1. Main findings

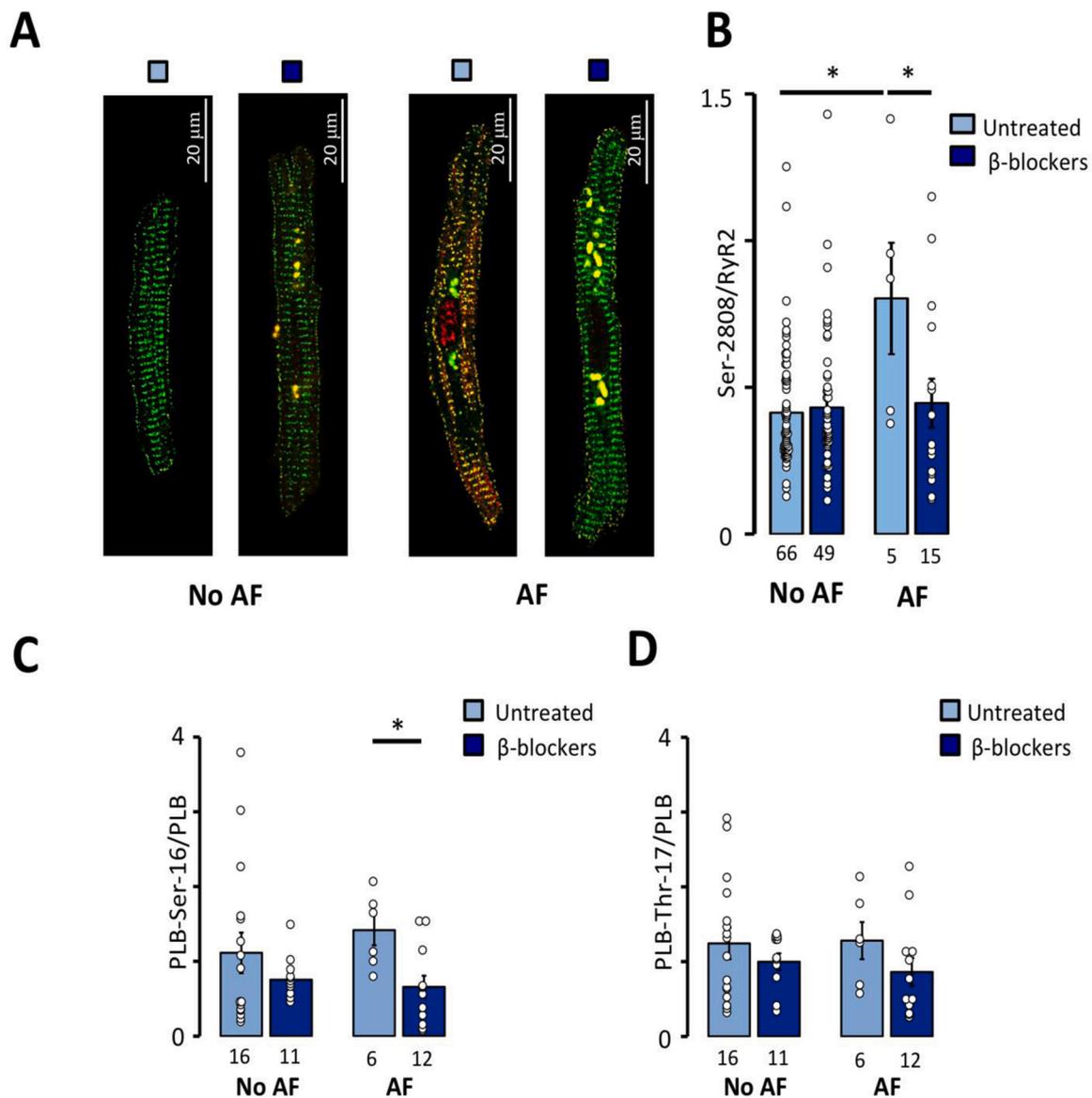
This study demonstrates that ambulatory treatment with  $\beta$ -blockers has a distinctive impact on intracellular calcium homeostasis in atrial myocytes from patients with and without reported episodes of AF. Thus, in patients with AF,  $\beta$ -blocker treatment has little impact on the L-type calcium current but reduces RyR2 phosphorylation at Ser-2808, and concurrently, lowers the incidence of calcium sparks and  $I_{T1}$ s to levels observed in patients without AF. This effect was most prominent in patients treated with bisoprolol or carvedilol. As outlined in Fig. 6, these results suggest that  $\beta$ -blockers may be of therapeutic utility to prevent spontaneous calcium release-induced atrial electrical activity; especially in patients with a history of paroxysmal AF that do not display the reduction in  $I_{Ca}$  density observed in patients with chronic AF.

### 4.2. Multivariate regression analysis of the impact of beta-blocker treatment on L-type calcium current

By triggering calcium release from the sarcoplasmic reticulum through calcium induced calcium release, the L-type calcium channels plays a crucial role in the regulation of the calcium available for the activation of contraction and  $\beta$ -adrenergic receptors, in turn, modulate the L-type calcium current amplitude via cAMP-dependent signaling [24]. Since AF has been associated with increased sympathetic nerve density [6,7], this would be expected to increase both spontaneous calcium release from SR and the  $I_{Ca}$  density. The latter is not easy to reconcile with a reduction in L-type calcium current shown in Fig. 1 and previously reported in patients with AF [25,26]. However the higher spark frequency in AF will increase baseline calcium and cause calcium-dependent inactivation of  $I_{Ca}$ . This effect may be very prominent in AF, where the spark density is 40-fold higher at the sarcolemma [27]. Multivariate linear regression analysis of the current data, taking into account the confounding effects of key clinical factors, confirms a reduction of the  $I_{Ca}$  density in patients with chronic but not paroxysmal AF. This analysis also revealed that atrial rhythm and age are the key factors contributing to a reduction in  $I_{Ca}$  in the study population. The latter is in line with a previous study showing that age reduces the  $I_{Ca}$



**Fig. 4.** Effect of  $\beta$ -blocker treatment on calcium spark frequency and properties. A. Calcium spark recordings in a patient with AF that did not receive  $\beta$ -blocker treatment (AF Untreated) or that did receive treatment (AF treated). B. Mean spark densities. C. Mean spark site density. D. Mean number of sparks per site. Statistical significance in B-D was determined using a general linear model with negative binomial distribution. E. Mean spark amplitude. F. Mean spark duration. G. Mean spark decay constant. Statistical significance in E-G was determined using a linear regression model. Statistically significant effects are indicated with \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . Number of patients is given below each bar.



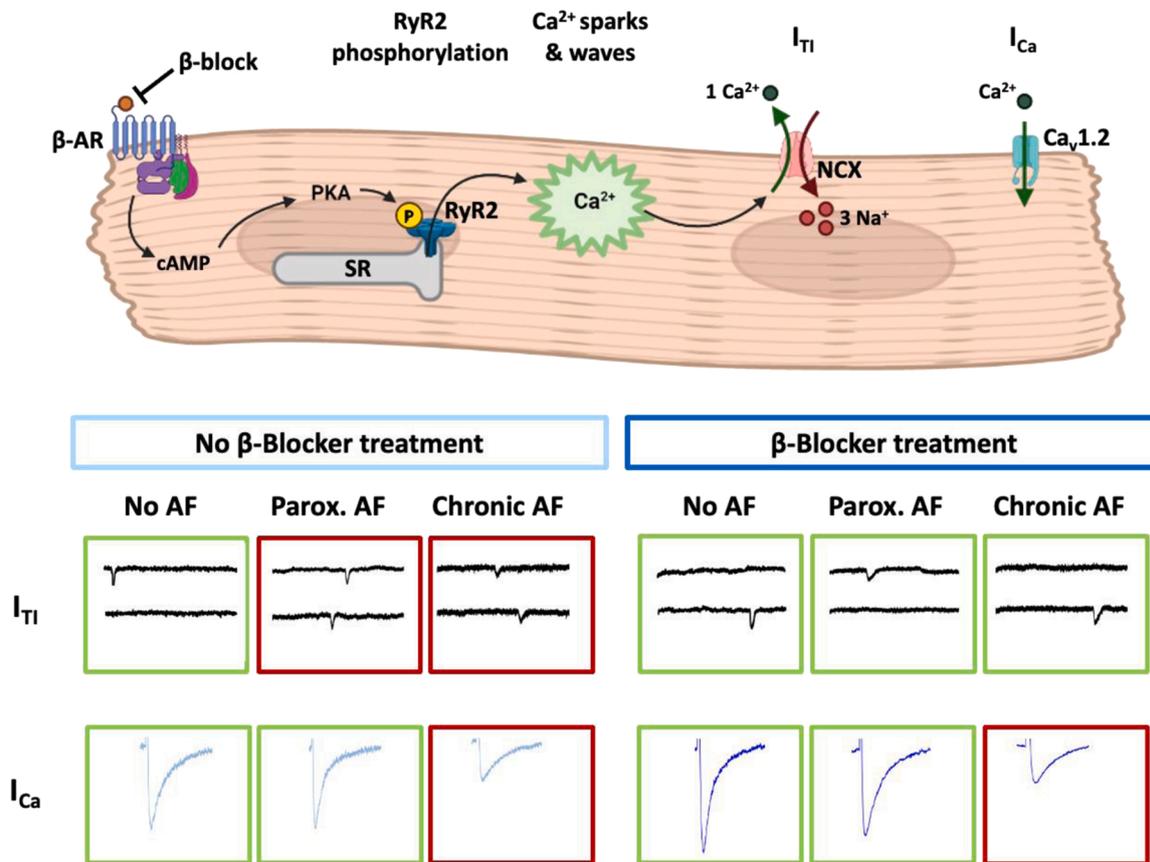
**Fig. 5.** Effect of  $\beta$ -blocker treatment on RyR2 and PLB phosphorylation. A. Overlay of total RyR2 (in green) and Ser-2808 phosphorylated RyR2 (in red) for patients without AF (left) and patients with AF (right) untreated (light blue square) and treated with  $\beta$ -blockers (dark blue square). B. Mean Ser-2808 phosphorylated RyR2 measured as the fluorescence intensity ratio (Ser-2808/RyR2) for all RyR2 clusters. C. Serine-16 (Ser-16) phosphorylated PLB levels normalized to total PLB expression in patients without and with AF. D. Threonine-17 (Thr-17) phosphorylated PLB levels normalized to total PLB expression in patients without and with AF. Statistical significance in panels B to D were determined using a two-way ANOVA followed by Bonferroni adjusted multiple pairwise comparisons. Statistical differences between pairs of bars are indicated with \*:  $p < 0.05$ . Number of patients is given below each bar.

density in patients without a record of AF [22]. On the other hand, the regression analysis showed no significant impact of  $\beta$ -blocker treatment on the  $I_{Ca}$  density, suggesting that even though the treatment with  $\beta$ -blockers would be expected to prevent the impact of an increased sympathetic activity in AF, other factors such as age or oxidative stress [28–30] underlie a smaller  $I_{Ca}$  density in AF. Hence,  $\beta$ -blocker treatment is not suitable to prevent AF caused by reduction in  $I_{Ca}$ , but it might be suitable in those with AF that do not display reduced  $I_{Ca}$  density if it can reduce the elevated incidence of  $I_{T1}$ s observed in these patients.

#### 4.3. Multivariate regression analysis of the impact of beta-blocker treatment on sarcoplasmic reticulum calcium homeostasis

Multivariate analysis of the impact of AF and  $\beta$ -blocker treatment on the  $I_{T1}$  frequency in human atrial myocytes confirmed previous findings that were performed without taking into account potentially confounding factors [20,21,31], showing that both paroxysmal and chronic

AF independently increase the  $I_{T1}$  frequency. This analysis also confirmed that age and sex affect the  $I_{T1}$  frequency [22,23] and showed that other factors like diabetes and ACE inhibitors also affect it significantly. Moreover, the treatment with  $\beta$ -blockers significantly reduced the incidence of  $I_{T1}$ s in patients with AF to levels observed in patients without the arrhythmia. In accordance with previous studies, suggesting that carvedilol is the only  $\beta$ -blocker that can also modify RyR2 opening [18,19], we found differences in the ability of distinct  $\beta$ -blocker treatments to attenuate the incidence of spontaneous  $I_{T1}$ s. Thus, carvedilol and bisoprolol reduced the  $I_{T1}$  frequency significantly to levels observed in patients without AF while atenolol had no significant effect. While the effect of carvedilol on  $I_{T1}$  frequency might be explained by the ability the R-carvedilol enantiomer to directly modify RyR2 activity in human atrial myocytes [32]; the differences between the three  $\beta$ -blockers is possibly explained by their ability to block the stimulatory effect of (–)-isoprenaline, which is ten-fold lower for atenolol than for both bisoprolol and carvedilol [33].



**Fig. 6.** Impact of  $\beta$ -blocker treatment on calcium homeostasis in human atrial myocytes. The top panel shows how  $\beta$ -blocker treatment modifies cyclic AMP (cAMP)-dependent modulation of SR calcium homeostasis and the incidence of transient inward currents ( $I_{T1}$ ) but not the L-type calcium current ( $I_{Ca}$ ). Consequently,  $\beta$ -blocker treatment normalizes SR calcium homeostasis in patients with paroxysmal AF (Parox. AF) without depression of the  $I_{Ca}$ , but not in patients with chronic AF where the  $I_{Ca}$  density remains depressed.

From a mechanistic point of view,  $\beta$ -adrenergic receptors have been reported to be located in macromolecular clusters with a spatial distribution that is different for the  $\beta$ -receptors associated with the RyR2 and those associated with PLB and SERCA2a [34,35], suggesting that  $\beta$ -blockers might affect RyR2 and PLB phosphorylation differently. However, our findings show that  $\beta$ -blocker treatment of patients with AF reduced both the phosphorylation of PLB at Ser-16 and RyR2 at Ser-2808 to levels observed in patients without AF. Accordingly, the decay of calcium sparks, which is expected to depend on PLB phosphorylation, and the spark frequency that is modulated by RyR2 phosphorylation were both reduced in AF patients treated with  $\beta$ -blockers to levels observed in patients without AF.

Considering that the treatment with  $\beta$ -blockers diminished both calcium spark and  $I_{T1}$  frequencies without affecting the SR calcium load, it is conceivable that  $\beta$ -blockers diminishes calcium loss from the SR by reducing RyR2 opening and counteracts the PLB-Ser-16 mediated reduction of SERCA2a activity, which is expected to diminish SR calcium loading. In support of this notion, we have recently shown that the spark frequency is proportional to RyR2 phosphorylation and that RyR2 clusters with the highest spark activity have the lowest caffeine releasable SR calcium content [36].

Finally, we found only marginal differences in calcium currents, spontaneous calcium release events and phosphorylation of calcium regulatory proteins among patients without AF that received  $\beta$ -blockers and those that did not, suggesting that calcium homeostasis in resting myocytes is affected minimally by the  $\beta$ -adrenergic tone in normal physiological conditions.

#### 4.4. Limitations

Phosphorylation of the RyR2 at Ser-2808, Ser-2814 or Ser-2030 have all been associated with increased RyR2 opening or a higher incidence of spontaneous calcium release events. In the present study, we did not measure RyR2 phosphorylation at Ser-2814 because previous studies from ours and other laboratories did not find a significant elevation of RyR2 phosphorylation at Ser-2814 in resting myocytes [37,38]. Similarly, we were unable to detect RyR2 phosphorylation at Ser-2030 in human atrial myocytes with commercially available antibodies. Thus, we cannot rule out that RyR2 phosphorylation at Ser-2030 could also contribute to the observed increase in spontaneous calcium release in resting myocytes.

We have recently shown that myocytes from patients with AF display sex-dependent differences in L-type calcium current density and especially the incidence of spontaneous calcium release-induced electrical activity [23]. The present study confirms the latter finding, and consequently the impact of  $\beta$ -blockers on RyR2 phosphorylation at Ser-2808 and calcium spark frequency is presumably more pronounced in females. However, determination of the interactions between sex,  $\beta$ -blocker treatment and AF, and their impact on RyR2 phosphorylation and activity will require a study dimensioned specifically to address this issue.

Because left atrial tissue samples from patients without left atrial dilation or structural alterations are sparse, the current study has been conducted in right atrial myocytes to achieve a large sample size. Therefore, we cannot rule out that some of the findings in the present study may be more prominent in the right atrium.

#### 4.5. Conclusions and clinical translation

Our findings point to  $\beta$ -blocker treatment as an efficient therapeutic approach to reduce spontaneous calcium-release induced electrical activity in patients with AF and the results afford a physiological foundation for testing the ability of  $\beta$ -blockers to prevent ectopic and triggered activity in patients with history of AF. In support of this notion, we have recently shown that activation of  $G_s$ -protein coupled receptors may contribute to a higher incidence of spontaneous calcium release at the sarcolemma and potentiate spontaneous membrane depolarizations in myocytes from patients with atrial fibrillation [27]. Our findings also underscore the importance of separating patients prone to present spontaneous calcium release-induced electrical activity from those suffering from reduction in L-type calcium current or other electrophysiological alterations that favor electrical re-entry. In this regard, patients with paroxysmal AF might be especially responsive to  $\beta$ -blocker treatment since they have elevated  $I_{T1}$  frequency but preserved  $I_{Ca}$  density. Basic clinical factors such as age and sex also display differential effects on  $I_{Ca}$  amplitude and  $I_{T1}$  frequency [22,23] and we have recently documented that myocytes from patients that carry a risk variant on chromosome 4q25 associated with risk of AF display higher Ser-2808 phosphorylation, spark,  $I_{T1}$  and DAD frequency [38]. Thus, combining clinical factors affecting calcium homeostasis with genetic screening for risk SNPs located in regions expected to modify  $\beta$ -adrenergic signaling, RyR2 activity or the resting membrane potential might provide a means to identify patient groups expected to be highly responsive or unresponsive to  $\beta$ -blocker treatment.

#### Funding

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation and Universities co-funded by FEDER (SAF2017-88019-C3-1-R) and (PID2020-116927RB-C21) to LH-M; (SAF2017-88019-C3-3-R) and (PID2020-116927RB-C22) to RB; from the Spanish Ministry of Health, Consume and Social Welfare co-funded by FEDER, CIBERCV (CB16/11/00276) to JMG; from Generalitat de Catalunya (SGR2017-1769) to LH-M and (PERIS SALUT-16) to AL; and grants from Fundació Marató TV3 (Marato2015-20-30) to LH-M and (Marato2015-20-31) to FC, and from the Canadian Institutes of Health Research (PJT-155940), the Heart and Stroke Foundation of Canada (G-22-0032243), and the Heart and Stroke Foundation Chair in Cardiovascular Research (END611955) to SRWC.

#### CRedit authorship contribution statement

**Verónica Jiménez-Sábado:** Designed Research; Performed Research; Analyzed Data; Wrote draft. **Sergi Casabella-Ramón:** Performed Research; Analyzed Data. **Anna Llach:** Performed Research, Analyzed Data; Acquired Funding. **Ignasi Gich:** Analyzed Data. **Sandra Casellas:** Analyzed Data. **Francisco Ciruela:** Designed Research, Analyzed Data; Acquired Funding. **S.R. Wayne Chen:** Acquired Funding; Edited & Revised Draft. **José M. Guerra:** Acquired Funding; Edited & Revised Draft. **Antonino Ginel:** Analyzed Data. **Raúl Benítez:** Designed Research; Analyzed Data; Acquired Funding. **Juan Cinca:** Acquired funding; Edited & Revised Draft. **Carmen Tarifa:** Designed Research; Performed Research; Analyzed Data; Edited & Revised Draft. **Leif Hove-Madsen:** Designed Research; Analyzed Data; Wrote Draft; Acquired Funding; Edited & Revised Draft.

#### Conflict of interest statement

None declared.

#### Data Availability

The data that support the findings of this study are available from the

corresponding author upon reasonable request. Some data may not be made available because of privacy or ethical restrictions.

#### Acknowledgments

The collaboration of the Cardiac Surgery Team at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau is greatly appreciated.

#### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.biopha.2022.114169.

#### References

- [1] M.C. Wijffels, C.J. Kirchhof, R. Dorland, M.A. Allesie, Atrial Fibrillation Begets Atrial Fibrillation. A Study in Awake Chronically Instrumented Goats, *Circulation* 92 (1995) 1954–1968, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.7.1954>.
- [2] M. Allesie, J. Ausma, U. Schotten, Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation, *Cardiovasc Res* 54 (2002) 230–246, [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00258-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00258-4).
- [3] P.S. Chen, L.S. Chen, M.C. Fishbein, S.F. Lin, S. Nattel, Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy, *Circ. Res.* 114 (2014) 1500–1515, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303772>.
- [4] M.J. Shen, E.K. Choi, A.Y. Tan, S.F. Lin, M.C. Fishbein, L.S. Chen, P.S. Chen, Neural mechanisms of atrial arrhythmias, *Nat. Rev. Cardiol.* 9 (2012) 30–39, <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.139>.
- [5] R. Arora, Recent insights into the role of the autonomic nervous system in the creation of substrate for atrial fibrillation- Implications for therapies targeting the atrial autonomic nervous system, *Circ. Arrhythmia Electro* 5 (2012) 850–859, <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.112.972273>.
- [6] B.L. Nguyen, M.C. Fishbein, L.S. Chen, P.S. Chen, S. Masroor, Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans, *Hear. Rhythm.* 6 (2009) 454–460, <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.01.010>.
- [7] P.A. Gould, M. Yui, C. Mclean, S. Finch, T. Marshall, G.W. Lambert, D.M. Kaye, Evidence for increased atrial sympathetic innervation in persistent human atrial fibrillation, *PACE - Pacing Clin. Electrophysiol.* 29 (2006) 821–829, <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.2006.00447.x>.
- [8] A. Pfenniger, R. Arora, Beyond beta-blockers: targeting the sympathetic nervous system for the prevention and treatment of atrial fibrillation, *Cardiovasc. Res.* 115 (2019) 1940–1942, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz254>.
- [9] S. Reiken, X.H.T. Wehrens, J.A. Vest, A. Barbone, S. Klotz, D. Mancini, D. Burkhoff, A.R. Marks, B-Blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure, *Circulation* 107 (2003) 2459–2466, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000068316.53218.49>.
- [10] S. Nattel, D. Dobrev, The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation pathophysiology: Mechanistic insights and therapeutic opportunities, *Eur. Heart J.* 33 (2012) 1870–1877, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs079>.
- [11] R. Wakili, N. Voigt, S. Kääh, D. Dobrev, S. Nattel, Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation, *J. Clin. Investig.* 121 (2011) 2955–2968, <https://doi.org/10.1172/JCI46315.cells>.
- [12] J.A. Vest, X.H. Wehrens, S.R. Reiken, S.E. Lehnart, D. Dobrev, P. Chandra, P. Danilo, U. Ravens, M.R. Rosen, A.R. Marks, Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation, *Circulation* 111 (2005) 2025–2032.
- [13] S. Neef, N. Dybkova, S. Sossalla, K.R. Ort, N. Fluschnik, K. Neumann, R. Seipelt, F. A. Schönndube, G. Hasenfuss, L.S. Maier, CaMKII-Dependent diastolic SR Ca2+ leak and elevated diastolic Ca2+ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation, *Circ. Res.* 106 (2010) 1134–1144, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.203836>.
- [14] D. Dobrev, N. Voigt, X.H.T. Wehrens, The ryanodine receptor channel as a molecular motif in atrial fibrillation: pathophysiological and therapeutic implications, *Cardiovasc. Res.* 89 (2011) 734–743, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq324>.
- [15] A. Llach, C.E. Molina, C. Prat-Vidal, J. Fernandes, V. Casado, F. Ciruela, C. Lluis, R. Franco, J. Cinca, L. Hove-Madsen, Abnormal calcium handling in atrial fibrillation is linked to up-regulation of adenosine A2A receptors, *Eur. Heart J.* 32 (2011), <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq464>.
- [16] A. Bessissow, J. Khan, P.J. Devereaux, J. Alvarez-Garcia, P. Alonso-Coello, Postoperative atrial fibrillation in non-cardiac and cardiac surgery: an overview, *J. Thromb. Haemost.* 13 (2015) S304–S312, <https://doi.org/10.1111/jth.12974>.
- [17] E.N. Prystowsky, B.J. Padanilam, R.I. Fogel, Treatment of atrial fibrillation, *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 314 (2015) 278–288, <https://doi.org/10.1001/jama.2015.7505>.
- [18] Q. Zhou, J. Xiao, D. Jiang, R. Wang, K. Vembaiyan, A. Wang, C.D. Smith, C. Xie, W. Chen, J. Zhang, X. Tian, P.P. Jones, X. Zhong, A. Guo, H. Chen, L. Zhang, W. Zhu, D. Yang, X. Li, J. Chen, A.M. Gillis, H.J. Duff, H. Cheng, A.M. Feldman, L. S. Song, M. Fill, T.G. Back, S.R.W. Chen, Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca2+ release, *Nat. Med.* 17 (2011) 1003–1009, <https://doi.org/10.1038/nm.2406>.
- [19] C.D. Smith, A. Wang, K. Vembaiyan, J. Zhang, C. Xie, Q. Zhou, G. Wu, S.R.W. Chen, T.G. Back, Novel carvedilol analogs that suppress store overload induced Ca2+

- release, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 8626–8655, <https://doi.org/10.1021/jm401090a>.
- [20] N. Voigt, N. Li, Q. Wang, W. Wang, A.W. Trafford, I. Abu-Taha, Q. Sun, T. Wieland, U. Ravens, S. Nattel, X.H. Wehrens, D. Dobrev, Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-leak and increased Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation, *Circulation* 125 (2012) 2059–2070, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067306>. Enhanced.
- [21] L. Hove-Madsen, A. Llach, A. Bayes-Genís, S. Roura, E.R. Font, A. Arís, J. Cinca, Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes, *Circulation* 110 (2004) 1358–1363, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000141296.59876.87>.
- [22] A. Herraiz-Martínez, J. Álvarez-García, A. Llach, C.E. Molina, J. Fernandes, A. Ferrero-Gregori, C. Rodríguez, A. Vallmitjana, R. Benítez, J.M. Padró, J. Martínez-González, J. Cinca, L. Hove-Madsen, Ageing is associated with deterioration of calcium homeostasis in isolated human right atrial myocytes, *Cardiovasc. Res.* 106 (2015) 76–86, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv046>.
- [23] A. Herraiz-Martínez, C. Tarifa, V. Jiménez-Sábado, A. Llach, H. Godoy-Marín, H. Colino, C. Nolla-Colomer, S. Casabella, P. Izquierdo-Castro, I. Benítez, R. Benítez, E. Roselló-Díez, E. Rodríguez-Font, X. Viñolas, F. Ciruela, J. Cinca, L. Hove-Madsen, Influence of sex on intracellular calcium homeostasis in patients with atrial fibrillation, *Cardiovasc. Res.* 118 (2021) 1033–1045, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab127>.
- [24] L. Hove-Madsen, P.-F. Méry, J. Jureviecius, A.V. Skeberdis, R. Fischmeister, Regulation of myocardial calcium channels by cyclic AMP metabolism, *Basic Res. Cardiol.* 91 (1996) 1–8.
- [25] D.R. Van Wagoner, A.L. Pond, M. Lamorgese, S.S. Rossie, P.M. McCarthy, J. M. Nerbonne, Atrial L-type Ca<sup>2+</sup> currents and human atrial fibrillation, *Circ. Res.* 85 (1999) 428–436.
- [26] S. Cañón, R. Caballero, A. Herraiz-Martínez, M. Pérez-Hernández, B. López, F. Atienza, J. Jalife, L. Hove-Madsen, E. Delpón, A. Bernad, miR-208b upregulation interferes with calcium handling in HL-1 atrial myocytes: implications in human chronic atrial fibrillation, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 99 (2016) 162–173, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.08.012>.
- [27] C. Tarifa, A. Vallmitjana, V. Jiménez-Sábado, M. Marchena, A. Llach, A. Herraiz-Martínez, H. Godoy-Marín, C. Nolla-Colomer, A. Ginel, X. Viñolas, J. Montiel, F. Ciruela, B. Echebarria, R. Benítez, J. Cinca, L. Hove-Madsen, The spatial distribution of calcium sparks determines their ability to induce afterdepolarizations in human atrial myocytes, *JACC Basic Transl. Sci.* (2022), <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2022.07.013>.
- [28] C.A. Carnes, P.M.L. Janssen, M.L. Ruehr, H. Nakayama, T. Nakayama, H. Haase, J. A. Bauer, M.K. Chung, I.M. Fearon, A.M. Gillinov, R.L. Hamlin, D.R. Van Wagoner, Atrial glutathione content, calcium current, and contractility, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 28063–28073, <https://doi.org/10.1074/jbc.M704893200>.
- [29] Y.M. Kim, T.J. Guzik, Y.H. Zhang, M.H. Zhang, H. Kattach, C. Ratnatunga, R. Pillai, K.M. Channon, B. Casadei, A myocardial Nox2 containing NAD (P) H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation, *Circ. Res.* 97 (2005) 629–636, <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000183735.09871.61>.
- [30] M. Chen, J. Zhong, Z. Wang, H. Xu, H. Chen, X. Sun, Y. Lu, L. Chen, X. Xie, L. Zheng, Fibroblast growth factor 21 protects against atrial remodeling via reducing oxidative stress, *Front. Cardiovasc. Med* 8 (2021) 1–15, <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.720581>.
- [31] N. Li, D.Y. Chiang, S. Wang, Q. Wang, L. Sun, N. Voigt, J.L. Respress, S. Ather, D. G. Skapura, V.K. Jordan, F.T. Horrigan, W. Schmitz, F.U. Müller, M. Valderrabano, S. Nattel, D. Dobrev, X.H.T. Wehrens, Ryanodine receptor-mediated calcium leak drives progressive development of an atrial fibrillation substrate in a transgenic mouse model, *Circulation* 129 (2014) 1276–1285, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006611>.
- [32] S. Casabella-Ramón, V. Jiménez-Sábado, C. Tarifa, S. Casellas, T.T. Lu, P. Izquierdo-Castro, I. Gich, M. Jiménez, A. Ginel, J.M. Guerra, S.R.W. Chen, R. Benítez, L. Hove-Madsen, Impact of R-Carvedilol on  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor-Mediated spontaneous calcium release in human atrial myocytes, *Biomedicines* 10 (2022) 1759, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071759>.
- [33] M.D. Lowe, J.A. Lynham, A.A. Grace, A.J. Kaumann, Comparison of the affinity of  $\beta$ -blockers for two states of the  $\beta_1$ -adrenoceptor in ferret ventricular myocardium, *Br. J. Pharm.* 135 (2002) 451–461, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704450>.
- [34] Y. Wang, Q. Shi, M. Li, M. Zhao, R. Reddy Gopireddy, J.P. Teoh, B. Xu, C. Zhu, K. E. Ireton, S. Srinivasan, S. Chen, P.J. Gasser, J. Bossuyt, J.W. Hell, D.M. Bers, Y. K. Xiang, Intracellular  $\beta$ 1-Adrenergic receptors and organic cation transporter 3 mediate phospholamban phosphorylation to enhance cardiac contractility, *Circ. Res.* (2021) 246–261, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317452>.
- [35] S.R. Agarwal, R.T. Sherpa, K.S. Moshal, R.D. Harvey, Compartmentalized cAMP signaling in cardiac ventricular myocytes, *Cell. Signal.* 89 (2022), 110172, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110172>.
- [36] C. Nolla-Colomer, S. Casabella-Ramon, V. Jimenez-Sabado, A. Vallmitjana, C. Tarifa, A. Herraiz-Martínez, A. Llach, M. Tauron, J. Montiel, J. Cinca, S.R. W. Chen, R. Benítez, L. Hove-Madsen,  $\beta$ 2-adrenergic stimulation potentiates spontaneous calcium release by increasing signal mass and co-activation of ryanodine receptor clusters, *Acta Physiol.* (2021), <https://doi.org/10.1111/apha.13736>.
- [37] M.G. Chelu, S. Sarma, S. Sood, S. Wang, R.J. van Oort, D.G. Skapura, N. Li, M. Santonastasi, F.U. Muller, W. Schmitz, U. Schotten, M.E. Anderson, M. Valderrabano, D. Dobrev, X.H. Wehrens, Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak promotes atrial fibrillation in mice, *J. Clin. Invest* 119 (2009) 1940–1951.
- [38] A. Herraiz-Martínez, A. Llach, C. Tarifa, J. Gandía, V. Jiménez-Sabado, E. Lozano-Velasco, S.A. Serra, A. Vallmitjana, E. Vázquez Ruiz De Castroviejo, R. Benítez, A. Aranega, C. Muñoz-Guijosa, D. Franco, J. Cinca, L. Hove-Madsen, The 4q25 variant rs13143308T links risk of atrial fibrillation to defective calcium homeostasis, *Cardiovasc. Res.* 115 (2019) 578–589, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy215>.

**3.2. Artículo 2:** *Impact of R-Carvedilol on  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor-Mediated Spontaneous Calcium Release in Human Atrial Myocytes.*

**Casabella-Ramón S**, Jiménez-Sábado V, Tarifa C, Casellas S, Lu TT, Izquierdo-Castro P, Gich I, Jiménez M, Ginel A, Guerra JM, Chen SRW, Benítez R, Hove-Madsen L. *Impact of R-Carvedilol on  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor-Mediated Spontaneous Calcium Release in Human Atrial Myocytes.*

Biomedicines. 2022 Jul 21;10(7):1759.

doi: 10.3390/biomedicines10071759. PMID: 35885069; PMCID: PMC9313410.

Impact Factor 6,081 Q1



Article

# Impact of R-Carvedilol on $\beta$ 2-Adrenergic Receptor-Mediated Spontaneous Calcium Release in Human Atrial Myocytes

Sergi Casabella-Ramón <sup>1,2,3,†</sup>, Verónica Jiménez-Sábado <sup>2,4,†</sup>, Carmen Tarifa <sup>1,2</sup> , Sandra Casellas <sup>5</sup>, Tien Tina Lu <sup>6</sup>, Paloma Izquierdo-Castro <sup>1,2</sup>, Ignasi Gich <sup>2,7</sup>, Marcel Jiménez <sup>3,8</sup>, Antonino Ginel <sup>5</sup> , José M. Guerra <sup>2,4,9</sup> , S. R. Wayne Chen <sup>10</sup>, Raul Benítez <sup>11</sup> and Leif Hove-Madsen <sup>1,2,4,\*</sup>

- <sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC, 08036 Barcelona, Spain; scasabella@santpau.cat (S.C.-R.); carmen.tarifa@cnic.es (C.T.); paloma.izquierdo@iibb.csic.es (P.I.-C.)
- <sup>2</sup> IIB Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; vjimenezs@santpau.cat (V.J.-S.); igich@santpau.cat (I.G.); jguerra@santpau.cat (J.M.G.)
- <sup>3</sup> Department of Cell Biology, Physiology and Immunology and Neuroscience Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain; mjimenez@uab.cat
- <sup>4</sup> CIBER Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- <sup>5</sup> Servicio de Cirugía Cardíaca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain; scasellas@santpau.cat (S.C.); aginel@santpau.cat (A.G.)
- <sup>6</sup> Faculty of Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada; tina7lu@gmail.com
- <sup>7</sup> CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- <sup>8</sup> CIBER Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- <sup>9</sup> Servicio de Cardiología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, 08025 Barcelona, Spain
- <sup>10</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Libin Cardiovascular Institute of Alberta, University of Calgary, Calgary, AB T2N 2T9, Canada; swchen@ucalgary.ca
- <sup>11</sup> Departament d'Enginyeria de Sistemes, Automàtica i Informàtica Industrial, Universitat Politècnica de Catalunya, 08034 Barcelona, Spain; raul.benitez@upc.edu
- \* Correspondence: leif.hove@iibb.csic.es; Tel.: +34-935565620
- † These authors contributed equally to this article.



**Citation:** Casabella-Ramón, S.; Jiménez-Sábado, V.; Tarifa, C.; Casellas, S.; Lu, T.T.; Izquierdo-Castro, P.; Gich, I.; Jiménez, M.; Ginel, A.; Guerra, J.M.; et al. Impact of R-Carvedilol on  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor-Mediated Spontaneous Calcium Release in Human Atrial Myocytes. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1759. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071759>

Academic Editor:  
Federica Barbagallo

Received: 2 June 2022  
Accepted: 17 July 2022  
Published: 21 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** A hallmark of atrial fibrillation is an excess of spontaneous calcium release events, which can be mimicked by  $\beta$ 1- or  $\beta$ 2-adrenergic stimulation. Because  $\beta$ 1-adrenergic receptor blockers ( $\beta$ 1-blockers) are primarily used in clinical practice, we here examined the impact of  $\beta$ 2-adrenergic stimulation on spontaneous calcium release and assessed whether the R- and S-enantiomers of the non-selective  $\beta$ -blocker carvedilol could reverse these effects. For this purpose, human atrial myocytes were isolated from patients undergoing cardiovascular surgery and subjected to confocal calcium imaging or immunofluorescent labeling of the ryanodine receptor (RyR2). Interestingly, the  $\beta$ 2-adrenergic agonist fenoterol increased the incidence of calcium sparks and waves to levels observed with the non-specific  $\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol. Moreover, fenoterol increased both the amplitude and duration of the sparks, facilitating their fusion into calcium waves. Subsequent application of the non  $\beta$ -blocking R-Carvedilol enantiomer reversed these effects of fenoterol in a dose-dependent manner. R-Carvedilol also reversed the fenoterol-induced phosphorylation of the RyR2 at Ser-2808 dose-dependently, and 1  $\mu$ M of either R- or S-Carvedilol fully reversed the effect of fenoterol. Together, these findings demonstrate that  $\beta$ 2-adrenergic stimulation alone stimulates RyR2 phosphorylation at Ser-2808 and spontaneous calcium release maximally, and points to carvedilol as a tool to attenuate the pathological activation of  $\beta$ 2-receptors.

**Keywords:**  $\beta$ -adrenergic receptor blocker; human atrial myocyte; sarcoplasmic reticulum; calcium spark; arrhythmia; carvedilol

## 1. Introduction

Increased sympathetic nerve density has been observed in atrial samples from patients with atrial fibrillation (AF) [1,2]. The sympathetic activity in the atrium is mainly the

result of the activation of G-protein-coupled  $\beta$ -adrenergic receptors [3,4]. This initiates an intracellular signaling cascade that involves the activation of adenylyl cyclase and leads to increased cyclic AMP (cAMP) levels and protein kinase A (PKA) activation [3–5]. This, in turn, induces phosphorylation of a number of calcium regulatory proteins, including the cardiac ryanodine receptor (RyR2) [6,7], that favors spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum (SR) and the induction of atrial arrhythmias [3,8–11].

The functional impact of  $\beta$ -adrenergic stimulation has been extensively studied in both atrial and ventricular myocytes, but most functional studies have addressed the overall response to non-selective  $\beta$ -adrenergic agonists such as isoproterenol (Iso). Recently, we have shown that  $\beta$ 2-adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes mimics the alterations in intracellular calcium homeostasis observed in patients with atrial fibrillation [12]. In clinical practice, a variety of  $\beta$ -adrenergic receptor blockers ( $\beta$ -blockers) are used, among others, to prevent cardiac arrhythmia. Among these, carvedilol stands out because it inhibits  $\beta$ 2-adrenergic receptors more strongly than  $\beta$ 1-adrenergic receptors [13], and also because it modifies RyR2 gating directly [14]. Some studies have shown that carvedilol suppresses RyR2-mediated calcium waves and prevents calcium release-induced triggered ventricular arrhythmias in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) or heart failure (HF) [14,15]. Unfortunately, the carvedilol concentration necessary to modify RyR2 gating may also produce adverse effects caused by excessive  $\beta$ -blockade, such as bradycardia and hypotension [16,17]. However, carvedilol is currently used as a racemic mixture of the R- and S-enantiomers [18–20] that have differential effects on  $\beta$ -receptors and RyR2 activity. Thus, the R-Carvedilol (R-Carv) enantiomer does not appear to have  $\beta$ -blocking activity [18,20], but Zhang et al. [21] demonstrated that it suppresses ventricular tachycardia in mice with the CPVT-causing RyR2 mutation (R4496C) by directly modifying RyR2 gating without lowering the heart rate or blood pressure.

Because atrial fibrillation has been associated with an elevated incidence of spontaneous calcium release events that concur with increased RyR2 phosphorylation, and  $\beta$ 2-adrenergic stimulation mimics these effects [12], the present study aims to determine the impact of  $\beta$ 2-adrenergic stimulation on calcium homeostasis in human atrial myocytes and compare it to stimulation with a non-selective agonist such as Iso. Furthermore, the study aims to compare the ability of the R- and S-Carvedilol (S-Carv) enantiomers to reverse the effects of  $\beta$ 2-adrenergic stimulation on spontaneous calcium release.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Population

We analyzed 37 consecutive patients undergoing cardiac surgery in our institution. All patients gave written consent to obtain the right atrial tissue samples that would otherwise have been discarded during the surgical intervention. The study protocol was approved by the Ethics Committee at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Spain). Clinical characteristics, echocardiographic data, and pharmacologic treatments of the patients are summarized in Table 1.

**Table 1.** Clinical Characteristics of the Study Population.

		(37 Patients)
	Age, Years	67.0 [65.0; 69.0]
	Sex (Female/Male)	16/21 (43.2%/56.8%)
Echocardiography	LAD index	2.35 [2.27; 2.43]
	LVEF, %	55.0 [53.0; 57.0]
Cardiovascular Risk Factors	No Smoking	16 (43.2%)
	Smoking	9 (24.3%)
	Ex smoking	11 (29.7%)
	Hypertension	21 (56.8%)
	Diabetes	8 (21.6%)
	Dyslipidemia	24 (64.9%)

**Table 1.** *Cont.*

		(37 Patients)
Surgical Treatment	AVR	16 (43.2%)
	MVR	3 (8.1%)
	CABG	26 (70.3%)
Pharmacological Treatment	ACE inhibitor	14 (37.8%)
	ARB	6 (16.2%)
	Calcium antagonists	9 (24.3%)
	$\beta$ -blockers	19 (51.4%)
	Acetylsalicylic acid	21 (56.8%)
	Statins	26 (70.3%)
	More than one treatment	27 (73.0%)

Categorical values are given as number of patients with the condition and % of patients in parenthesis. Continuous values are given as mean  $\pm$  standard error. Smoking was divided into three groups (Non-, Ex- and smokers). LAD index, left atrial diameter index; LVEF, left ventricular ejection fraction; ACE inhibitor, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; AVR, aortic valve replacement; MVR, mitral valve replacement; CABG, coronary artery bypass graft.

## 2.2. Study Protocol

Right atrial myocardial samples were obtained prior to the cannulation of the right atrial appendage in surgery requiring extracorporeal circulation. Excised tissue samples were immediately stored in cold oxygenated calcium-free Tyrode solution containing 30 mM butenodione monoxime. Once in the laboratory, the tissue was snap-frozen or used for myocyte isolation within 5–10 min after excision. For myocyte isolation, the tissue was cleaned and cut into small pieces (1 mm  $\times$  1 mm) that were digested in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode solution with 1.4 mg/mL collagenase (Worthington Type 4, 275 units/mg), 0.2 mg/mL proteinase (Sigma type XXIV, 11 u/mg solid), and 2 mg/mL bovine fatty acid-free serum albumin (BSA) and incubated at 37 °C for 30 min. After 30 min, cells were dissociated from the tissue fragments using a Pasteur pipette, and suspended in  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode solution with 10 mg/mL BSA. The remaining tissue was digested in fresh enzyme solution containing 0.8 mg/mL collagenase and 2 mg/mL BSA at 37 °C for 15 min. This process was repeated 3 or 4 times. Subsequently,  $\text{Ca}^{2+}$  was gradually increased to 600  $\mu\text{M}$  in the  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution containing the isolated cells. Only elongated cells with clear cross striations and without abnormal granulation were used for experiments. Depending on the yield of the myocyte isolation, cells were used for one or several experimental protocols, and, therefore, the total number of patients was larger than the number of patients in a specific experimental protocol. Usually, calcium imaging experiments were performed in 2–4 cells per patient and immunofluorescent labeling experiments in 3–5 cells per patient. The number of cells and patients are given in the figure legends as (number of cells/number of patients).

## 2.3. In Vitro Drug Testing

Isolated myocytes were exposed to R-Carv or S-Carv to explore the effects of the two enantiomers on RyR2 phosphorylation, calcium sparks, and calcium waves induced by  $\beta$ 2-adrenergic stimulation with the  $\beta$ 2-agonist Fenol (3  $\mu\text{M}$ ).

## 2.4. Immunofluorescent Labeling

Isolated myocytes were subjected to immunofluorescent labeling as previously described [22]. Briefly, myocytes were fixed with 5% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Subsequently, cells were incubated with PBS/Glycine 0.1 M during 10 min and thereafter with PBS/0.2% Triton X-100 for 15 min to permeabilize the cells. To block the non-specific sites, the cells were incubated with PBS/0.2% Tween 20, and 10% horse serum, for at least 30 min. Total and Ser-2808 phosphorylated RyR2 were labeled using the primary antibodies mouse anti-RyR2 (1:1200; C3-33 NR07, Calbiochem, San Diego, CA, USA) and rabbit anti-Ser-2808P (1:1200; A010-30, Badrilla, Leeds, UK). Antibodies AlexaFluor 488 anti-mouse (1:2000; A21200, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and AlexaFluor 594 anti-rabbit (1:1500; A11012, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were used

to stain total RyR2 green and Ser-2808 phosphorylated RyR2 red. Images were acquired with a confocal microscope (Leica AOBS SP5, Wetzlar, Germany) and a 63× glycerol immersion objective. To determine the ability of R-Carv to attenuate fenoterol (Feno)-induced RyR2 phosphorylation, data were fit with a Hill equation in order to obtain the R-Carv concentration required to achieve a half-maximal reduction in the response to Feno.

### 2.5. Confocal Calcium Imaging

To visualize changes in the intracellular calcium concentration, myocytes were loaded with 2 μM CAL-520 AM for 20 min at room temperature, followed by washing and de-esterification for at least 30 min. Confocal calcium images (512 × 140 pixels) were recorded at 90 Hz using a resonance-scanning confocal microscope (Leica SP5 AOBS, Wetzlar, Germany) with a 63x glycerol immersion objective in the frame-scanning mode. CAL-520 was excited at 488 nm and emission was measured between 500 and 650 nm with a Leica Hybrid Detector. Laser power was set to 20% of 100mW and then attenuated to 4%. Experiments were performed at room temperature and calcium sparks were detected using custom-made algorithms implemented using MATLAB (Mathworks Inc., Boston, MA, USA) as previously described [23].

### 2.6. Data Analysis

Electrophysiological and molecular biological analyses were performed without knowledge about clinical data and, unless otherwise stated, values for quantitative variables were averaged for each patient and given as mean ± s.e.m. Clinicians analyzing the medical records had no access to the experimental results.

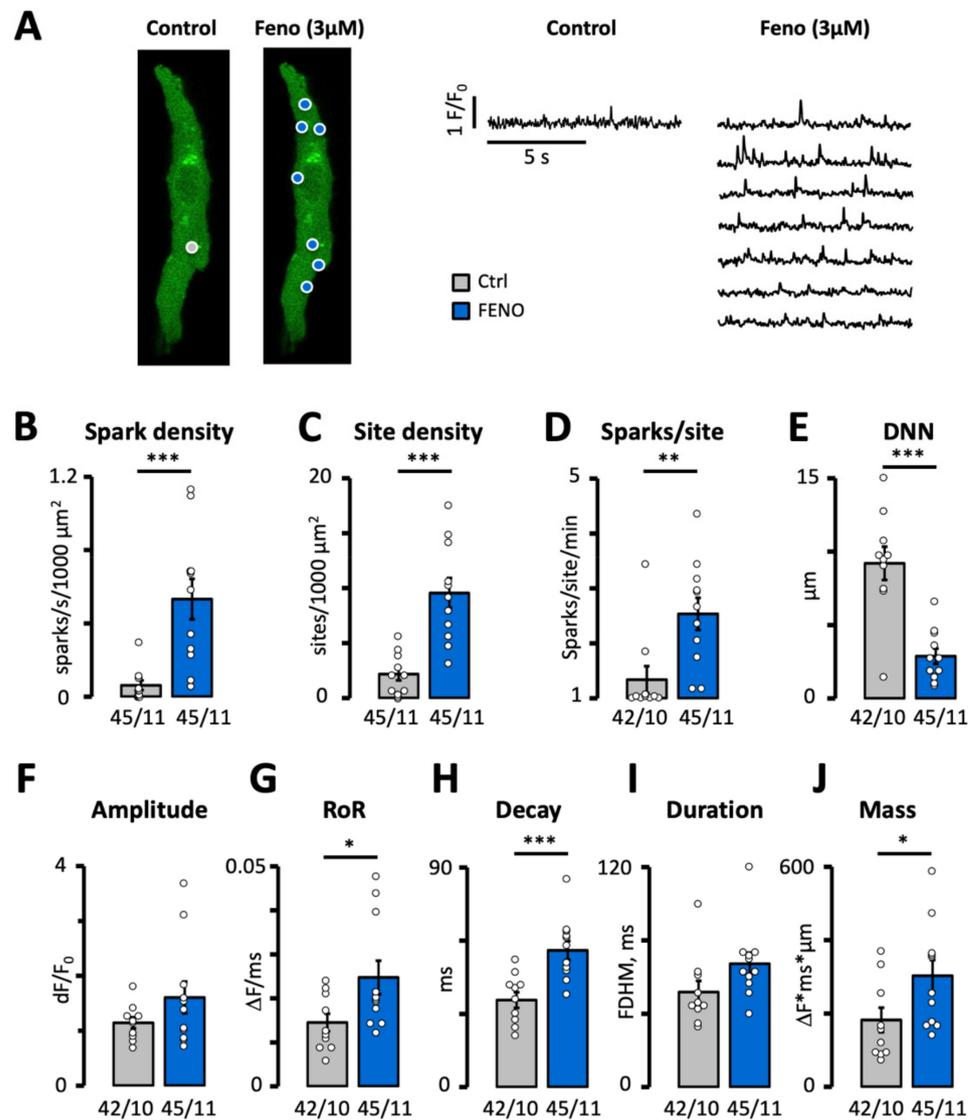
### 2.7. Statistical Analysis

For calcium spark analysis, results are represented in bar graphs with mean ± s.e.m. and individual data points. For normally distributed quantitative variables, statistical significance was evaluated using *t*-test (for pairs) or analysis of variance (ANOVA). For variables with clear asymmetry, statistical significance was evaluated using Wilcoxon's rank sum test (for pairs), Kruskal–Wallis test or ANOVA test with Welch correction. The specific statistical test is indicated in text or figure legends. Analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows (V26.0) or RStudio 1.4.1717. Statistically significant effects are indicated with *p*-values or \*: *p* < 0.05, \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.001.

## 3. Results

### 3.1. Impact of β2-Adrenergic Stimulation on Intracellular Calcium Homeostasis in Human Atrial Myocytes

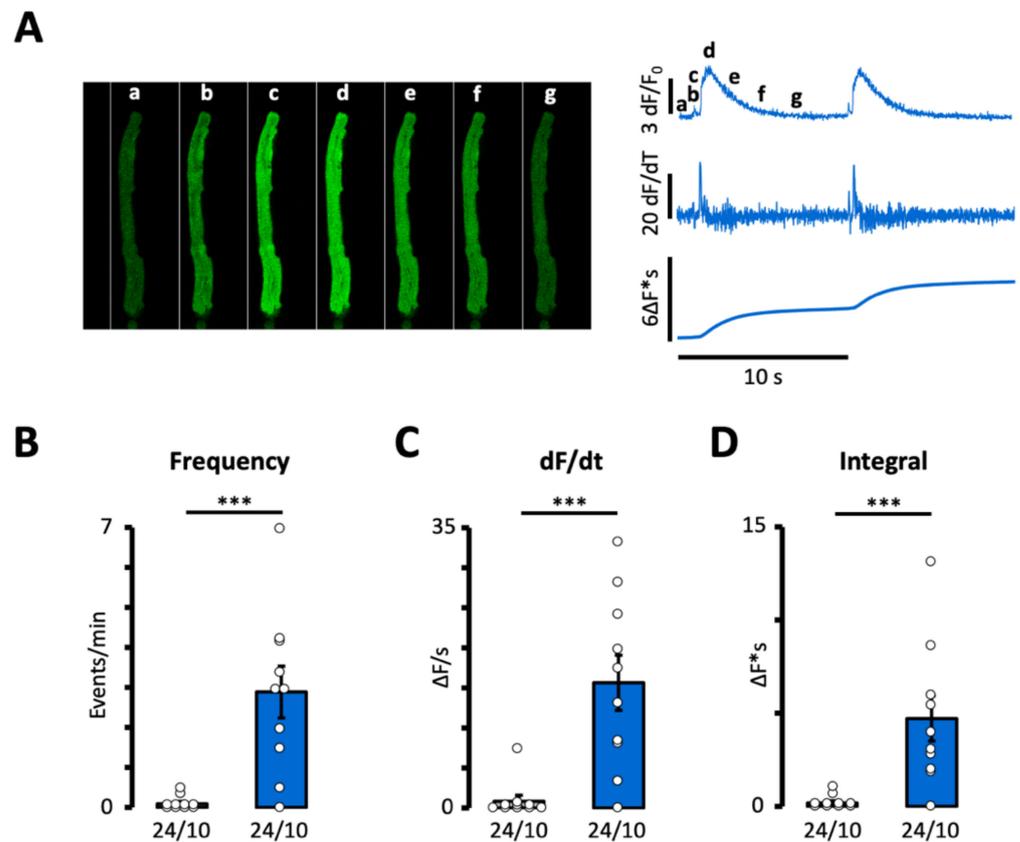
Since the vast majority of β-blockers used in clinical practice selectively target β1-receptors, we wanted to determine the impact of β2-receptor activation on spontaneous calcium release events in human atrial myocytes in order to assess their potential contribution to pathological alterations in the intracellular calcium homeostasis. For this purpose, we exposed myocytes to a saturating dose (3 μM) of the selective β2-receptor agonist Feno, a drug that has been associated with an increased mortality rate in asthma patients medicated with it [24,25]. As shown in Figure 1A,B, Feno increased the density of calcium sparks 8-fold. This increase was due to an increase in both the density of sparks sites (Figure 1A,C) and the frequency of sparks per site (Figure 1A,D). Consequently, the distance from a spark to its nearest neighbor also decreased (Figure 1E). As shown in Figure 1F–H, Feno did not affect the amplitude, but increased the rate of rise (RoR) and decay (tau) of the sparks. As a result, the spark mass increased 1.7-fold (Figure 1J). This, combined with the higher density and shorter distance between sparks is expected to facilitate their fusion into calcium waves or trigger spontaneous calcium transients.



**Figure 1.** Effect of fenoterol on calcium spark frequency and properties. (A) Calcium spark recordings in a patient before and after exposure to 3 μM Feno. Spark sites are marked with circles and the signal for each site is shown on the right. Impact of Feno on (B) spark density, (C) spark site density, (D) spark frequency per site. *p*-values in (B–D) were obtained using Wilcoxon rank sum exact test. (E) Distance to nearest neighbor (DNN). (F) Spark amplitude. (G) Rate of rise (RoR). (H) Decay time constant. (I) Full duration at half maximum (FDHM). (J) Spark mass. *p*-values in (E–J) were obtained using Student’s *t*-test. Statistically significant differences between pairs of bars are indicated with \*: *p* < 0.05, \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.001. Circles in (B–J) correspond with the values of individual data points. Number of cells/number of patients is given below bars.

Accordingly, Figure 2A,B demonstrates that Feno increased the frequency of the calcium waves or spontaneous calcium transients 30-fold. In addition, Feno also dramatically increased both the rate of rise of the calcium signal (Figure 2C) and the time integral of the calcium wave or transient (Figure 2D), which, in turn, is expected to increase the amplitude of the resulting membrane depolarization.

In order to address the impact of β<sub>2</sub>-adrenergic stimulation relative to the activation of both β<sub>1</sub>- and β<sub>2</sub>-receptors, we compared the response to 3 μM Feno with the response to a saturating dose (100 nM) of Iso, a non-selective β-agonist. As shown in Table 2, the effect of Feno (measured in 45 cells from 11 patients) on the incidence and properties of calcium sparks and waves was similar to that of Iso (measured in 30 cells from 9 patients).



**Figure 2.** Effect of fenoterol on calcium wave frequency. (A) Recordings of a spontaneous calcium transient or wave before and after exposure to 3  $\mu\text{M}$  Fenoterol. Impact of Fenoterol on (B) event frequency, (C) rate of rise of the calcium signal, (D) time integral of the calcium signal.  $p$ -values were obtained using Wilcoxon's rank sum test. Statistically significant differences between pairs of bars are indicated with \*\*\*:  $p < 0.001$ . Circles in (B–D) correspond with the values of individual data points. Number of cells/number of patients is given below bars.

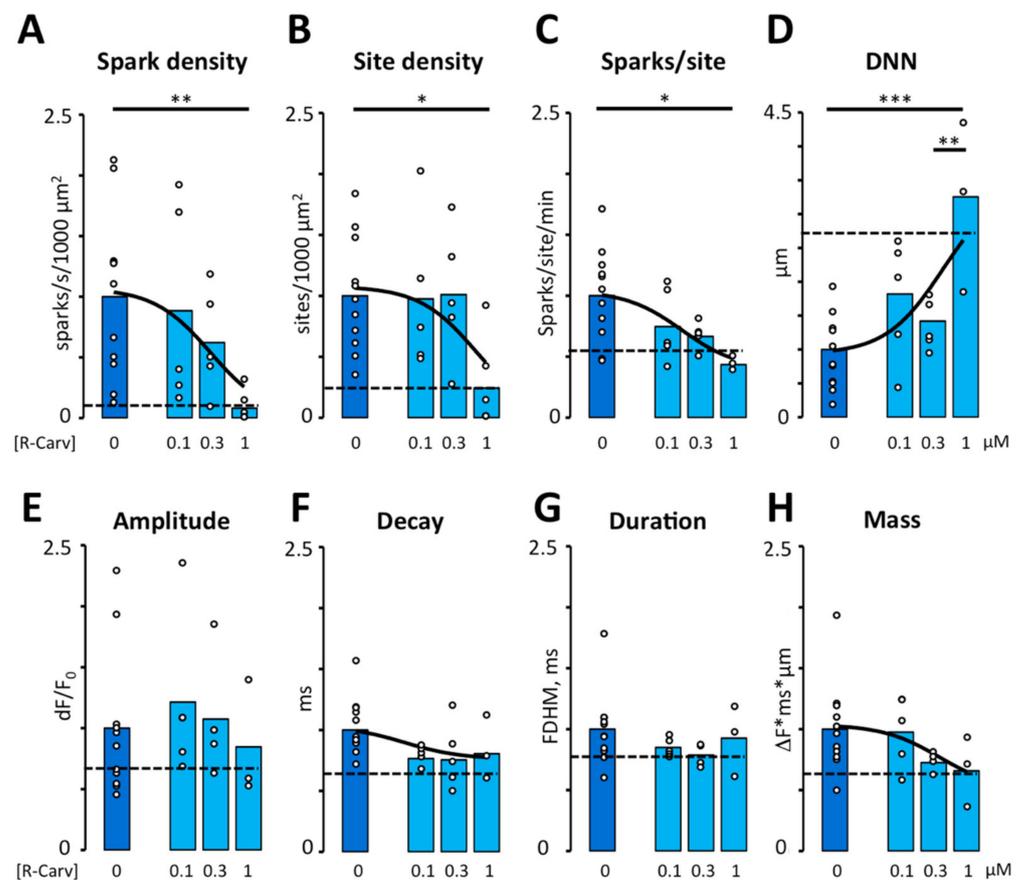
**Table 2.** Comparison of the Response to 3  $\mu\text{M}$  Fenoterol and 100 nM Isoproterenol.

Properties	Fenoterol	Isoproterenol
CALCIUM SPARKS (cells/patients)	(45/11)	(30/9)
Density (events/s/1000 $\mu\text{m}^2$ )	$0.52 \pm 0.11$	$0.53 \pm 0.12$
Site density (sites/1000 $\mu\text{m}^2$ )	$9.55 \pm 1.36$	$11.5 \pm 1.1$
Sparks/site (events/s)	$0.042 \pm 0.005$	$0.039 \pm 0.011$
Distance to nearest neighbor ( $\mu\text{m}$ )	$2.39 \pm 0.39$	$3.66 \pm 0.64$
Amplitude ( $\Delta F/F_0$ )	$1.48 \pm 0.21$	$1.23 \pm 0.16$
Rate of Rise ( $\Delta F/F_0/s$ )	$0.025 \pm 0.004$	$0.028 \pm 0.003$
Tau (ms)	$55.4 \pm 3.8$	$43.3 \pm 3.6^*$
FDHM (ms) <sup>1</sup>	$65.7 \pm 5.4$	$56.9 \pm 2.8$
FWHM ( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>	$3.06 \pm 0.16$	$2.44 \pm 0.19^*$
Mass ( $\Delta F \times \text{ms} \times \mu\text{m}$ )	$289 \pm 43$	$182 \pm 27^*$
CALCIUM WAVES <sup>3</sup>		
Frequency (events/min)	$2.89 \pm 0.65$	$1.98 \pm 0.94$

<sup>1</sup> Full duration at half maximum. <sup>2</sup> Full width at half maximum. <sup>3</sup> Includes both calcium waves and spontaneous calcium transients. \* Statistical significance for differences between Fenoterol and Iso is indicated with \*  $p < 0.05$ .

### 3.2. R-Carvedilol Dose-Dependently Reverses $\beta$ 2-Adrenergic Stimulation of Spontaneous $Ca^{2+}$ Release

Because R-Carv has been reported to selectively inhibit RyR2 activity without affecting  $\beta$ -adrenergic receptors [21], we explored the potential of R-Carv as a specific inhibitor of RyR2 activity. For this purpose, we first determined its ability to reverse the effects of  $\beta$ 2-adrenergic stimulation with 3  $\mu$ M Feno. As shown in Figure 3A,C, R-Carv reversed the stimulatory effects of Feno on calcium spark density and the numbers of sparks per site in a dose-dependent manner with IC<sub>50</sub> values of 0.3 and 0.17  $\mu$ M, respectively, reaching control levels at 1  $\mu$ M R-Carv. The spark site density decreased abruptly at 1  $\mu$ M. (Figure 3B). R-Carv also reversed the effects of Feno on the distance to the nearest spark (Figure 3D), spark amplitude, decay, and mass (Figure 3E,F,H) while spark duration was not significantly altered by Feno or R-Carv (Figure 3G). The IC<sub>50</sub> values for the impact on calcium spark frequency and properties are summarized in Table 3.



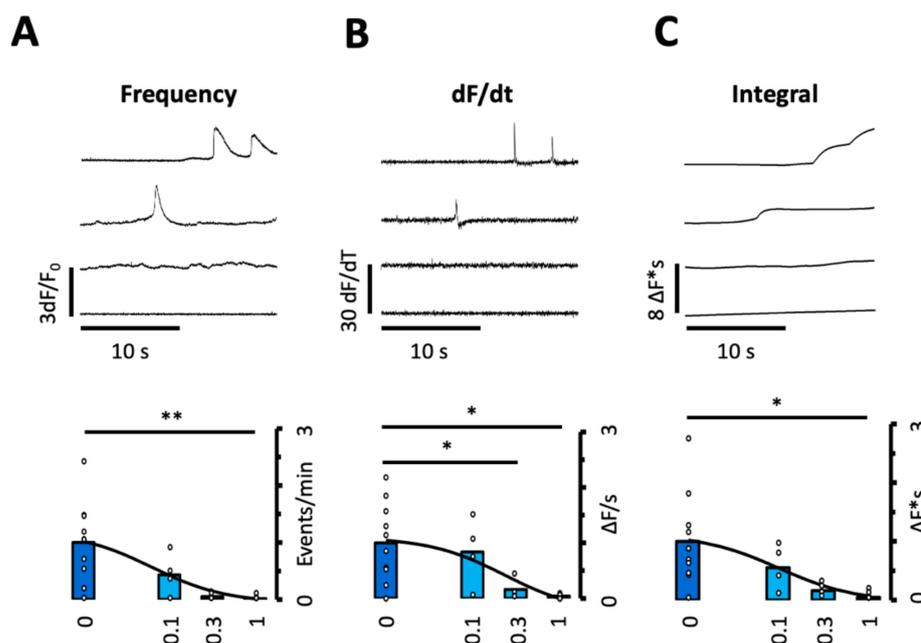
**Figure 3.** Effect of R-Carvedilol on calcium spark frequency and properties. Calcium spark frequency and properties were recorded in myocytes after addition of Feno and increasing doses of R-Carv (given below bars). (A) Spark density. (B) Spark site density. (C) Spark frequency per site. *p*-values in (A–C) were obtained using Kruskal–Wallis test followed by Bonferroni-adjusted multiple comparisons. (D) Distance to nearest neighbor (DNN). (E) Spark amplitude. (F) Decay time constant. (G) Full duration at half maximum (FDHM). (H) Spark mass. Data are from 45 cells/11 patients. *p*-values in (D–H) were obtained using ANOVA test followed by Tukey’s multiple comparisons test. Statistically significant differences between pairs of bars are indicated with \*: *p* < 0.05, \*\*: *p* < 0.01; \*\*\*: *p* < 0.001. Solid lines represent fitting using a Hill equation. Dashed lines represent mean values recorded in control conditions before exposure to Feno. Circles in (A–H) correspond with the values of individual data points.

**Table 3.** Dose-Dependent Effects of R-Carvedilol on Intracellular Calcium Homeostasis.

Properties	Maximum	Minimum	IC-50 <sup>1</sup>
Spark density	1.06 ± 0.21	0 ± 0.67	0.30 ± 0.60
Site density	1.07 ± 0.16	0 ± 1.35	0.70 ± 1.95
Sparks/site (events/s)	1.03 ± 0.12	0.38 ± 0.29	0.17 ± 0.25
Distance to nearest neighbor (μm)	3.5 ± 1.62	0.99 ± 0.26	0.48 ± 0.71
Tau (ms)	1.0 ± 0.18	0.73 ± 0.14	0.06 ± 0.17
Mass (ΔF × ms × μm)	1.03 ± 0.11	0.49 ± 0.52	0.37 ± 0.91
Wave frequency <sup>2</sup>	1.18 ± 0.31	−0.09 ± 0.26	0.06 ± 0.08
dF/dt	1.08 ± 0.20	−0.25 ± 0.49	0.23 ± 0.31
Wave area	1.11 ± 0.27	−0.08 ± 0.34	0.10 ± 0.15
Ser-2808/RyR total	1.03 ± 0.06	0.54 ± 0.15	0.36 ± 0.41

<sup>1</sup> Data were normalized to values recorded in the presence of Feno before addition of R-Carv, and fitted with a Hill equation using a rate of 1. Values are given as mean ± standard deviation. <sup>2</sup> Includes both calcium waves and spontaneous calcium transients.

By reducing the number of sparks per site as well as their mass, R-Carv reduced the probability of large sparks coinciding in space and time and hence their propagation to neighboring clusters. Accordingly, R-Carv also reduced the frequency of spontaneous calcium transients and waves (Figure 4A) as well as the rate of rise and the time integral of these events (Figure 4B,C).



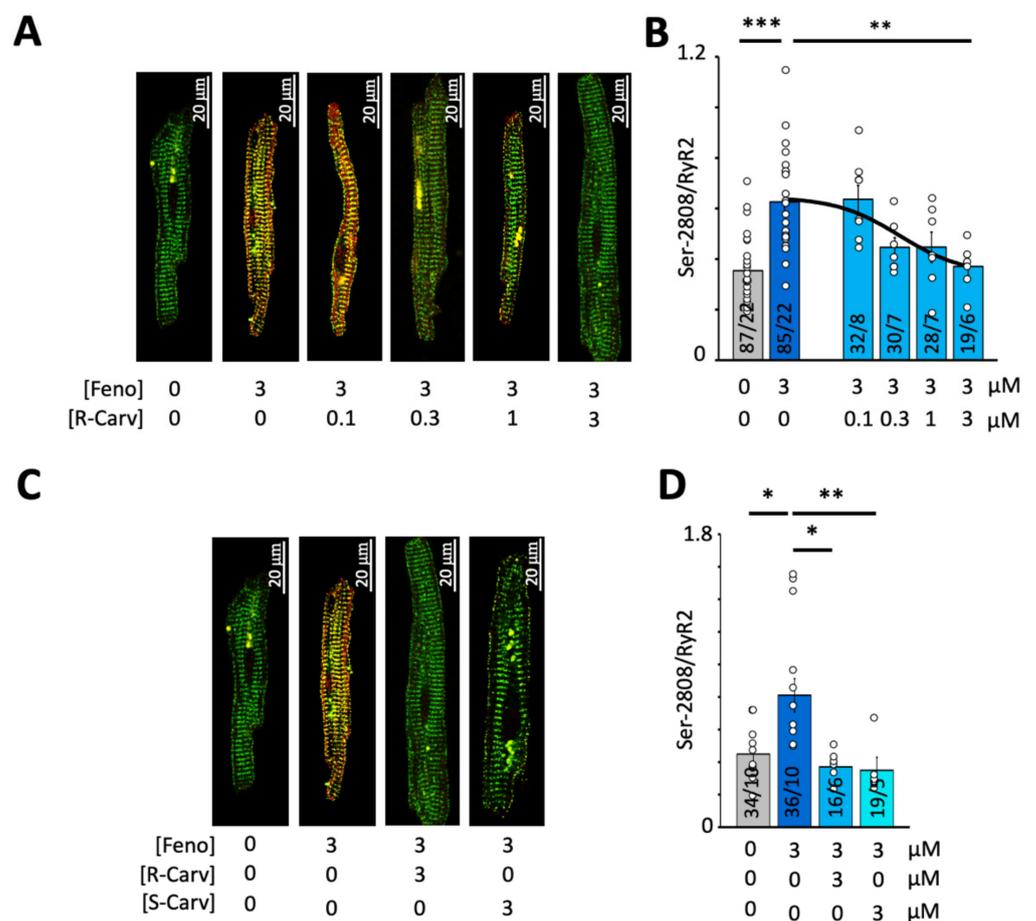
**Figure 4.** Effect of R-Carvedilol on calcium wave frequency and properties. The frequency and properties of spontaneous calcium transients or waves were recorded in myocytes after addition of Feno and increasing doses of R-Carv (given below bars). (A) Event frequency. (B) Rate of rise of the calcium signal. (C) Time integral of the calcium signal. Data are from 40 cells/10 patients. *p*-values were obtained using ANOVA test with Welch correction followed by Bonferroni-adjusted multiple comparisons. Statistically significant differences between pairs of bars are indicated with \*: *p* < 0.05, \*\*: *p* < 0.01. Solid lines represent fitting using a Hill equation. Circles in (A–C) correspond with the values of individual data points.

This suggests that R-Carv not only reduces the frequency of spontaneous calcium waves or transients but also the rate of calcium release and the amount of calcium released per event, which, in turn, is expected to diminish both the frequency and amplitude of the

resulting membrane depolarizations. The IC50 for the inhibition of spontaneous calcium waves, their area, and rate of release are shown in Table 3.

### 3.3. Impact of R- and S-Carvedilol Enantiomers on $\beta$ 2-Adrenergic Stimulation of RyR Phosphorylation at Ser-2808

Because R-Carv has been reported to selectively inhibit RyR2 activity without affecting  $\beta$ -adrenergic receptors [21], we analyzed its ability to reverse the RyR2 phosphorylation induced by  $\beta$ -adrenergic stimulation with 3  $\mu$ M Fen. Figure 5A shows immunofluorescent labeling of total RyR2 and Ser-2808-phosphorylated RyR2 in control conditions, upon exposure to Fen and the subsequent exposure to different R-Carv concentrations. As shown in Figure 5B, R-Carv significantly and dose-dependently reduced Fen-induced RyR2 phosphorylation at Ser-2808 with an IC50 of 0.36  $\mu$ M (see also Table 3). Moreover, comparison of the R- and S-Carv enantiomers showed that 1  $\mu$ M of either of these abolished the stimulatory effect of 3  $\mu$ M Fen on Ser-2808 phosphorylation (Figure 5C,D).



**Figure 5.** Effect of R- or S-Carvedilol on RyR2 phosphorylation at Ser-2808. (A) Overlay of total RyR2 (green) and Ser-2808-phosphorylated RyR2 (red) for different R-Carv concentrations (given below images). (B) Mean RyR2 phosphorylation at Ser-2808 determined as the fluorescence intensity ratio (Ser-2808/RyR2). (C) Overlay of total RyR2 (green) and Ser-2808-phosphorylated RyR2 (red) for 3  $\mu$ M R- and S-Carv. (D) Mean RyR2 phosphorylation at Ser-2808 determined as the fluorescence intensity ratio (Ser-2808/RyR2). The number of cells/number of patients is given for each bar. Statistical significance was determined using a one-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison test. Statistically significant differences between pairs of bars are indicated with \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . Circles in (B,D) correspond with the values of individual data points. Number of patients is given for each bar.

## 4. Discussion

### 4.1. Impact of $\beta$ 2-Adrenergic Stimulation on Intracellular Calcium Homeostasis in Human Atrial Myocytes

$\beta$ -adrenergic receptor blockers are, among others, used in clinical practice to treat patients with cardiac arrhythmia such as atrial fibrillation [26] and CPVT [27]. Among the  $\beta$ -adrenergic receptors,  $\beta$ 1-receptors are reported as the predominantly expressed receptor accounting for 70%, while  $\beta$ 2-receptors account for 30% [28,29]. Aligned with this finding,  $\beta$ -blockers commonly used in clinical practice, such as atenolol, bisoprolol, metoprolol, nebivolol, and betaxolol, selectively inhibit  $\beta$ 1-receptors [30]. However, the activation of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-receptors also depends on the concentration of circulating catecholamines and their binding constant to each receptor. Thus, noradrenaline and adrenaline binds stronger to  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-receptors, respectively [31]. Furthermore,  $\beta$ -adrenergic receptors are located in macromolecular clusters with a spatial distribution that is different for the  $\beta$ -receptors associated with the RyR2 and those associated with PLB and SERCA2a [32,33]. Together, this suggests that the relative contribution of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-receptors may vary according to specific physiological and pathophysiological conditions. Indeed, the present findings demonstrate that selective activation of  $\beta$ 2-receptors promotes both local (sparks) and global calcium release events (spontaneous calcium transients and waves) with an incidence that is comparable to that recorded when myocytes are activated with the non-selective  $\beta$ -agonist Iso. Moreover, Feno induced a significantly larger increase in the spark mass (estimated as the product of the spark amplitude, width, and duration) than Iso (see Table 2), facilitating the fusion of neighboring sparks and increasing the local membrane depolarization resulting from the extrusion of the released calcium by the Na-Ca exchanger. Thus, our finding suggests that non-selective or  $\beta$ 2-selective  $\beta$ -blockers might be suitable to attenuate potentially arrhythmogenic spontaneous calcium release events under pathophysiological conditions that favor the activation of  $\beta$ 2-adrenergic receptors.

### 4.2. Ability of R- and S-Carvedilol Enantiomers to Reverse the Effects of $\beta$ 2-Adrenergic Stimulation on $Ca^{2+}$ Homeostasis

Since carvedilol is a non-selective  $\beta$ -blocker and the R-Carv enantiomer has been proposed to modify RyR2 opening without compromising  $\beta$ -adrenergic activity [18,20,21], we tested the ability of R-Carv to attenuate RyR2 phosphorylation at Ser-2808 and spontaneous calcium release in human atrial myocytes stimulated with 3  $\mu$ M Feno. Under these conditions, we observed that R-Carv induced a dose-dependent reduction in calcium spark or wave frequency and also in RyR2 phosphorylation. Moreover, the IC<sub>50</sub> for the inhibition of calcium sparks and waves was comparable to the IC<sub>50</sub> for the inhibition of RyR2 phosphorylation, suggesting that the inhibitory effects of carvedilol could be due to reduced RyR2 phosphorylation caused by inhibition of the  $\beta$ -adrenergic receptors. In this regard, the K<sub>d</sub> for R-Carv binding to  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-receptors is around 25 and 15 nM, respectively [13]. Thus, R-Carv at concentrations used in the present study would be expected to bind to a sizeable fraction of the  $\beta$ -receptors, inducing a dose-dependent reversal of the response to Feno that has a K<sub>d</sub> for binding to  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-receptors near 9.1 and 0.93  $\mu$ M, respectively [31]. Theoretically, the observed reduction in Ser-2808 phosphorylation could also be due to a direct inhibition of the RyR2 by R-Carv, which in turn could reduce CaMKII-dependent phosphorylation at Ser-2808. However, higher doses of R-Carv or non  $\beta$ -blocking carvedilol analogues are typically required to inhibit spontaneous calcium oscillations [14,34].

While we show here that both R- and S-Carv (3  $\mu$ M) are able to fully reverse Feno-induced RyR2 phosphorylation at Ser-2808, we cannot rule out that S-Carv, which is expected to inhibit  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-receptors with a higher affinity, may be more efficient than R-Carv at lower concentrations. Functionally, this would reduce the IC<sub>50</sub> for the racemic mixture of carvedilol with respect to the observed IC<sub>50</sub> of 0.36  $\mu$ M for R-Carv.

Interestingly, a high concentration of R-Carv (1  $\mu$ M) induced an abrupt reduction in the spark site density and a rebound in spark duration, suggesting that carvedilol at this concentration might affect multiple mechanisms simultaneously. In this regard,  $\beta$ -adrenergic receptors are located in macromolecular clusters where the spatial distribution

of those associated with the RyR2 is different from the distribution of those associated with PLB and SERCA2a [32,33]. Thus, R-Carv at concentrations lower than 1  $\mu$ M might primarily regulate RyR2 gating but affect both RyR2 gating, PLB phosphorylation, SERCA activity, and SR calcium content at concentrations of 1  $\mu$ M or higher.

Together, the present findings therefore suggest that carvedilol or R-Carv may be more suitable to treat cardiac arrhythmia than commonly used selective  $\beta$ 1-blockers when physiological or pathophysiological conditions favor a differential activation of  $\beta$ 2-receptors. In this regard, it is interesting to notice that a recent study has shown that treatment with  $\beta$ 1-selective  $\beta$ -blockers are associated with a significantly higher risk for arrhythmic events in symptomatic children with CPVT than those treated with non-selective  $\beta$ -blockers. They therefore concluded that nadolol or other non-selective  $\beta$ -blockers should be preferred for treating symptomatic children with CPVT [35].

## 5. Conclusions

In summary,  $\beta$ 2-adrenergic stimulation increases the incidence of calcium sparks and waves to levels observed with the non-specific  $\beta$ -adrenergic agonists, underscoring the relevance of  $\beta$ 2-adrenergic receptors to the promotion of spontaneous calcium release in human atrial myocytes. Moreover, the non  $\beta$ -blocking R-Carv enantiomer can reverse these effects of Feno in a dose-dependent manner, settling a physiological basis for testing the ability of R-Carv to reverse arrhythmogenic calcium release in patients with atrial fibrillation or other cardiac arrhythmias associated with  $\beta$ 2-adrenergic receptor activation.

**Author Contributions:** Designed research: S.C.-R., V.J.-S., R.B. and L.H.-M. performed research: S.C.-R., V.J.-S., C.T., T.T.L. and P.I.-C. analyzed data: S.C.-R., V.J.-S., C.T., S.C., T.T.L., P.I.-C., I.G., M.J., A.G., R.B. and L.H.-M. wrote manuscript: V.J.-S., J.M.G., S.R.W.C. and L.H.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation and Universities [SAF2017-88019-C3-1-R] and [PID2020-116927RB-C21] to L.H.-M.; [SAF2017-88019-C3-3-R] and [PID2020-116927RB-C22] to R.B.; from the Spanish Ministry of Health, Consume and Social Welfare, CIBERCV [CB16/11/00276] to J.M.G.; from Generalitat de Catalunya [SGR2017-1769] to L.H.-M.; and grants from Fundació Marató TV3 [Marato2015-20-30] to L.H.-M. and [Marato2015-20-31] to S.C., and from the Canadian Institutes of Health Research (PJT-155940), the Heart and Stroke Foundation of Canada (G-19-0026444), and the Heart and Stroke Foundation Chair in Cardiovascular Research (END611955) to S.R.W.C.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain (protocol code AZAR-AF\_2015, approved 30 November 2015).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Some data may not be made available because of privacy or ethical restrictions.

**Acknowledgments:** The collaboration of the Cardiac Surgery Team at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and the assistance of Sören M. Almendros with calcium image analysis is greatly appreciated.

**Conflicts of Interest:** The authors have no conflict of interests.

## References

1. Gould, P.A.; Yui, M.; Mclean, C.; Finch, S.; Marshall, T.; Lambert, G.W.; Kaye, D.M. Evidence for Increased Atrial Sympathetic Innervation in Persistent Human Atrial Fibrillation. *Pacing Clin. Electrophysiol.* **2006**, *29*, 821–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nguyen, B.L.; Fishbein, M.C.; Chen, L.S.; Chen, P.S.; Masroor, S. Histopathological Substrate for Chronic Atrial Fibrillation in Humans. *Hear. Rhythm* **2009**, *6*, 454–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chen, P.S.; Chen, L.S.; Fishbein, M.C.; Lin, S.F.; Nattel, S. Role of the Autonomic Nervous System in Atrial Fibrillation: Pathophysiology and Therapy. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 1500–1515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pfenniger, A.; Arora, R. Beyond Beta-Blockers: Targeting the Sympathetic Nervous System for the Prevention and Treatment of Atrial Fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **2019**, *115*, 1940–1942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Reiken, S.; Wehrens, X.H.T.; Vest, J.A.; Barbone, A.; Klotz, S.; Mancini, D.; Burkhoff, D.; Marks, A.R. B-Blockers Restore Calcium Release Channel Function and Improve Cardiac Muscle Performance in Human Heart Failure. *Circulation* **2003**, *107*, 2459–2466. [[CrossRef](#)]
6. Nattel, S.; Dobrev, D. The Multidimensional Role of Calcium in Atrial Fibrillation Pathophysiology: Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities. *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 1870–1877. [[CrossRef](#)]
7. Wakili, R.; Voigt, N.; Kääh, S.; Dobrev, D.; Nattel, S. Recent Advances in the Molecular Pathophysiology of Atrial Fibrillation. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 2955–2968. [[CrossRef](#)]
8. Dobrev, D.; Voigt, N.; Wehrens, X.H.T. The Ryanodine Receptor Channel as a Molecular Motif in Atrial Fibrillation: Pathophysiological and Therapeutic Implications. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *89*, 734–743. [[CrossRef](#)]
9. Neef, S.; Dybkova, N.; Sossalla, S.; Ort, K.R.; Fluschnik, N.; Neumann, K.; Seipelt, R.; Schöndube, F.A.; Hasenfuss, G.; Maier, L.S. CaMKII-Dependent Diastolic SR Ca<sup>2+</sup> Leak and Elevated Diastolic Ca<sup>2+</sup> Levels in Right Atrial Myocardium of Patients with Atrial Fibrillation. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 1134–1144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Vest, J.A.; Wehrens, X.H.T.; Reiken, S.R.; Lehnart, S.E.; Dobrev, D.; Chandra, P.; Danilo, P.; Ravens, U.; Rosen, M.R.; Marks, A.R. Defective Cardiac Ryanodine Receptor Regulation during Atrial Fibrillation. *Circulation* **2005**, *111*, 2025–2032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Llach, A.; Molina, C.E.; Prat-Vidal, C.; Fernandes, J.; Casadó, V.; Ciruela, F.; Lluís, C.; Franco, R.; Cinca, J.; Hove-Madsen, L. Abnormal Calcium Handling in Atrial Fibrillation Is Linked to Up-Regulation of Adenosine A<sub>2A</sub> Receptors. *Eur. Heart J.* **2011**, *32*, 721–729. [[CrossRef](#)]
12. Nolla-Colomer, C.; Casabella-Ramon, S.; Jimenez-Sabado, V.; Vallmitjana, A.; Tarifa, C.; Herraiz-Martínez, A.; Llach, A.; Tauron, M.; Montiel, J.; Cinca, J.; et al. B<sub>2</sub>-Adrenergic Stimulation Potentiates Spontaneous Calcium Release By Increasing Signal Mass and Co-Activation of Ryanodine Receptor Clusters. *Acta Physiol.* **2022**, *234*, e13736. [[CrossRef](#)]
13. Yoshikawa, T.; Port, J.D.; Asano, K.; Chidiak, P.; Bouvier, M.; Dutcher, D.; Roden, R.L.; Minobe, W.; Tremmel, K.D.; Bristow, M.R. Cardiac Adrenergic Receptor Effects of Carvedilol. *Eur. Heart J.* **1996**, *17*, 8–16. [[CrossRef](#)]
14. Zhou, Q.; Xiao, J.; Jiang, D.; Wang, R.; Vembaiyan, K.; Wang, A.; Smith, C.D.; Xie, C.; Chen, W.; Zhang, J.; et al. Carvedilol and Its New Analogs Suppress Arrhythmogenic Store Overload-Induced Ca<sup>2+</sup> Release. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1003–1009. [[CrossRef](#)]
15. Smith, C.D.; Wang, A.; Vembaiyan, K.; Zhang, J.; Xie, C.; Zhou, Q.; Wu, G.; Chen, S.R.W.; Back, T.G. Novel Carvedilol Analogs That Suppress Store Overload Induced Ca<sup>2+</sup> Release. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8626–8655. [[CrossRef](#)]
16. Bristow, M.R.; Gilbert, E.M.; Abraham, W.T.; Adams, K.F.; Fowler, M.B.; Hershberger, R.E.; Kubo, S.H.; Narahara, K.A.; Ingersoll, H.; Krueger, S.; et al. Carvedilol Produces Dose-Related Improvements in Left Ventricular Function and Survival in Subjects with Chronic Heart Failure. *Circulation* **1996**, *94*, 2807–2816. [[CrossRef](#)]
17. Ko, D.T.; Herbert, P.R.; Coffey, C.S.; Curtis, J.P.; Foody, J.M.; Sedrakyan, A.; Krumholz, H.M. Adverse Effects of Beta-Blocker Therapy for Patients with Heart Failure. A Quantitative Overview of Randomized Trials. *Arch. Intern. Med.* **2004**, *164*, 1389–1394. [[CrossRef](#)]
18. Bartsch, W.; Spöner, G.; Strein, K.; Müller-Beckmann, B.; Kling, L.; Böhm, E.; Martin, U.; Borbe, H.O. Pharmacological Characteristics of the Stereoisomers of Carvedilol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1990**, *38*, 104–107. [[CrossRef](#)]
19. Frishman, W.H. Carvedilol. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 1759–1765. [[CrossRef](#)]
20. Stoschitzky, K.; Koshucharova, G.; Lercher, P.; Maier, R.; Sakotnik, A.; Klein, W.; Liebmann, P.M.; Lindner, W. Stereoselective Effects of (R)- and (S)-Carvedilol in Humans. *Chirality* **2001**, *13*, 342–346. [[CrossRef](#)]
21. Zhang, J.; Zhou, Q.; Smith, C.D.; Chen, H.; Tan, Z.; Chen, B.; Nani, A.; Wu, G.; Song, L.-S.; Fill, M.; et al. Non-β-Blocking R-Carvedilol Enantiomer Suppresses Ca<sup>2+</sup> Waves and Stress-Induced Ventricular Tachyarrhythmia without Lowering Heart Rate or Blood Pressure. *Biochem. J.* **2015**, *470*, 233–242. [[CrossRef](#)]
22. Herraiz-Martínez, A.; Llach, A.; Tarifa, C.; Gandía, J.; Jiménez-Sabado, V.; Lozano-Velasco, E.; Serra, S.A.; Vallmitjana, A.; Vázquez Ruiz De Castroviejo, E.; Benítez, R.; et al. The 4q25 Variant Rs13143308T Links Risk of Atrial Fibrillation to Defective Calcium Homeostasis. *Cardiovasc. Res.* **2019**, *115*, 578–589. [[CrossRef](#)]
23. Herraiz-Martínez, A.; Tarifa, C.; Jiménez-Sabado, V.; Llach, A.; Godoy-Marín, H.; Colino, H.; Nolla-Colomer, C.; Casabella, S.; Izquierdo-Castro, P.; Benítez, I.; et al. Influence of Sex on Intracellular Calcium Homeostasis in Patients with Atrial Fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **2021**, *118*, 1033–1045. [[CrossRef](#)]
24. Beasley, R.; Pearce, N.; Crane, J.; Burgess, C. β-Agonists: What Is the Evidence That Their Use Increases the Risk of Asthma Morbidity and Mortality? *J. Allergy Clin. Immunol.* **1999**, *104*, 18–30. [[CrossRef](#)]
25. Beasley, R.; Nishima, S.; Pearce, N.; Crane, J. Beta-Agonist Therapy and Asthma Mortality in Japan. *Lancet* **1998**, *351*, 1406–1407. [[CrossRef](#)]
26. Workman, A.J.; Pau, D.; Redpath, C.J.; Marshall, G.E.; Russell, J.A.; Kane, K.A.; Norrie, J.; Rankin, A.C. Post-Operative Atrial Fibrillation Is Influenced by Beta-Blocker Therapy but Not by Pre-Operative Atrial Cellular Electrophysiology. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **2006**, *17*, 1230–1238. [[CrossRef](#)]
27. Baltogiannis, G.G.; Lysitsas, D.N.; di Giovanni, G.; Ciconte, G.; Sieira, J.; Conte, G.; Kolettis, T.M.; Chierchia, G.; De Asmundis, C.; Brugada, P. CPVT: Arrhythmogenesis, Therapeutic Management, and Future Perspectives. A Brief Review of the Literature. *Front. Cardiovasc. Med.* **2019**, *6*, 92. [[CrossRef](#)]
28. Triposkiadis, F.; Karayannis, G.; Giamouzis, G.; Skoularigis, J.; Louridas, G.; Butler, J. The Sympathetic Nervous System in Heart Failure. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2009**, *54*, 1747–1762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Bylund, D.B.; Eikenberg, D.C.; Hieble, J.P.; Langer, S.Z.; Lefkowitz, R.J.; Minneman, K.P.; Molinoff, P.B.; Ruffolo, R.R.; Trendelenburg, U. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* **1994**, *46*, 121–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Smith, C.; Teitler, M. Beta-Blocker Selectivity at Cloned Human Beta 1- and Beta 2- Adrenergic Receptors. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **1999**, *13*, 123–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Baker, J.G. The Selectivity of  $\beta$ -Adrenoceptor Agonists at Human  $\beta$  1-,  $\beta$  2- and  $\beta$  3- Adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 1048–1061. [[CrossRef](#)]
32. Agarwal, S.R.; Sherpa, R.T.; Moshal, K.S.; Harvey, R.D. Compartmentalized cAMP Signaling in Cardiac Ventricular Myocytes. *Cell. Signal.* **2022**, *89*, 110172. [[CrossRef](#)]
33. Wang, Y.; Shi, Q.; Li, M.; Zhao, M.; Reddy Gopireddy, R.; Teoh, J.P.; Xu, B.; Zhu, C.; Ireton, K.E.; Srinivasan, S.; et al. Intracellular  $\beta$ 1-Adrenergic Receptors and Organic Cation Transporter 3 Mediate Phospholamban Phosphorylation to Enhance Cardiac Contractility. *Circ. Res.* **2021**, *128*, 246–261. [[CrossRef](#)]
34. Maruyama, M.; Xiao, J.; Zhou, Q.; Vembaiyan, K.; Chua, S.-K.; Rubart-von der Lohe, M.; Lin, S.-F.; Back, T.G.; Wayne Chen, S.; Chen, P.-S. Carvedilol Analogue Inhibits Triggered Activities Evoked by Both Early and Delayed Afterdepolarizations. *Heart Rhythm* **2013**, *10*, 101–107. [[CrossRef](#)]
35. Peltenburg, P.J.; Kallas, D.; Bos, J.M.; Lieve, K.V.V.; Franciosi, S.; Roston, T.M.; Denjoy, I.; Sorensen, K.B.; Ohno, S.; Roses-Noguer, F.; et al. An International Multicenter Cohort Study on  $\beta$ -Blockers for the Treatment of Symptomatic Children With Catecholaminergic Polymorphic. *Circulation* **2022**, *145*, 333–344. [[CrossRef](#)]

### **3.3. Artículo 3:** *Changes in Local Atrial Electrograms and Surface ECG Induced by Acute Atrial Myocardial Infarction.*

Amorós-Figueras G, Roselló-Diez E, Sanchez-Quintana D, **Casabella-Ramon S**, Jorge E, Nevado-Medina J, Arzamendi D, Millán X, Alonso-Marín C, Guerra JM, Cinca J. *Changes in Local Atrial Electrograms and Surface ECG Induced by Acute Atrial Myocardial Infarction.*

Front Physiol. 2020

Apr 17;11:264.

doi: 10.3389/fphys.2020.00264. PMID: 32362831; PMCID: PMC7180211.

Impact factor 4,755 Q1



# Changes in Local Atrial Electrograms and Surface ECG Induced by Acute Atrial Myocardial Infarction

Gerard Amorós-Figueras<sup>1</sup>, Elena Roselló-Diez<sup>2</sup>, Damian Sanchez-Quintana<sup>3</sup>, Sergi Casabella-Ramon<sup>1</sup>, Esther Jorge<sup>1</sup>, Jorge Nevado-Medina<sup>3</sup>, Dabit Arzamendi<sup>1</sup>, Xavier Millán<sup>1</sup>, Concepción Alonso-Martin<sup>1</sup>, Jose M. Guerra<sup>1</sup> and Juan Cinca<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Cardiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institute of Biomedical Research IIB Sant Pau, CIBERCV, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>2</sup> Department of Cardiac Surgery, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institute of Biomedical Research IIB Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>3</sup> Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Extremadura, Badajoz, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Veronique Meijborg,  
Amsterdam University Medical Center  
(UMC), Netherlands

### Reviewed by:

Sander Verheule,  
Maastricht University, Netherlands  
Elena Grossini,  
University of Eastern Piedmont, Italy

### \*Correspondence:

Juan Cinca  
jcinca@santpau.cat

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cardiac Electrophysiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

**Received:** 05 November 2019

**Accepted:** 09 March 2020

**Published:** 17 April 2020

### Citation:

Amorós-Figueras G, Roselló-Diez E, Sanchez-Quintana D, Casabella-Ramon S, Jorge E, Nevado-Medina J, Arzamendi D, Millán X, Alonso-Martin C, Guerra JM and Cinca J (2020) Changes in Local Atrial Electrograms and Surface ECG Induced by Acute Atrial Myocardial Infarction. *Front. Physiol.* 11:264. doi: 10.3389/fphys.2020.00264

**Background:** Atrial coronary branch occlusion is a hardly recognizable clinical entity that can promote atrial fibrillation. The low diagnostic accuracy of the ECG could deal with the characteristics of the ischemia-induced changes in local atrial electrograms, but these have not been described.

**Objectives:** We analyzed the effects of selective acute atrial branch occlusion on local myocardial structure, atrial electrograms, and surface ECG in an experimental model close to human cardiac anatomy and electrophysiology.

**Methods:** Six anesthetized open-chest anesthetized pigs underwent surgical occlusion of an atrial coronary branch arising from the right coronary artery during 4 h. Atrial electrograms and ECG were simultaneously recorded. One additional pig acted as sham control. In all cases, the hearts were processed for anatomopathological analysis.

**Results:** Atrial branch occlusion induced patchy atrial necrosis with sharp border zone. During the first 30 min of occlusion, atrial electrograms showed progressive R wave enlargement ( $1.8 \pm 0.6$  mV vs.  $2.5 \pm 1.1$  mV,  $p < 0.01$ ), delayed local activation times ( $28.5 \pm 8.9$  ms vs.  $36.1 \pm 16.4$  ms,  $p < 0.01$ ), ST segment elevation ( $-0.3 \pm 0.3$  mV vs.  $1.0 \pm 1.0$  mV,  $p < 0.01$ ), and presence of monophasic potentials. Atrial ST segment elevation decreased after 2 h of occlusion. The electrical border zone was  $\sim 1$  mm and expanded over time. After 2 h of occlusion, the ECG showed a decrease in P wave amplitude (from  $0.09 \pm 0.04$  mV to  $0.05 \pm 0.04$  mV after 165 min occlusion,  $p < 0.05$ ) and duration ( $64.4 \pm 8.0$  ms vs.  $80.9 \pm 12.6$  ms,  $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** Selective atrial branch occlusion induces patchy atrial infarction and characteristic changes in atrial activation, R/S wave, and ST segment that are not discernible at the ECG. Only indirect changes in P wave amplitude and duration were appreciated in advanced stages of acute coronary occlusion.

**Keywords:** atrium, ischemia, ECG, electrophysiology mapping, histopathology

## INTRODUCTION

Atrial myocardial infarction is a potentially harmful disease that can provoke atrial mechanical depression, systemic embolization, atrial arrhythmias, and cardiac rupture (Lazar et al., 1988). It is caused by occlusion of the atrial coronary branches ordinarily emerging from the proximal segments of the right (RCA) or the left circumflex (LCX) coronary arteries (Baroldi et al., 1956; James and Burch, 1958). The diagnosis is often established at autopsy in association with ventricular myocardial infarction. In a series of 182 necropsy cases of myocardial infarction, the incidence of atrial infarction was 17% (Cushing et al., 1942).

Selective occlusion of an atrial coronary branch may result from a rupture of a local atherosclerotic plaque or, accidentally, during percutaneous coronary interventions (Álvarez-García et al., 2013, 2016). This condition predisposes to arrhythmia reentry as evidenced in the canine model (Sinno et al., 2003; Nishida et al., 2011) but is hardly recognized at the surface ECG. The diagnostic paucity of the ECG could be due to intrinsic characteristics of the conventional recording systems or to a weak impact of atrial branch occlusion on local myocardial structure and electrophysiology.

In the clinical practice, the ECG features that allow suspecting atrial myocardial ischemia are changes in P wave morphology and PR-segment deviation (Lazar et al., 1988; Lu et al., 2016; Yıldız et al., 2018) although these are inconstant and can require a reference ECG to be reliably discerned. Changes in the QRS complex and ST segment of local electrograms are specific markers of acute myocardial ischemia in the ventricles (Janse et al., 1979), and theoretically, similar electrical changes should be found in the atrial electrograms during atrial branch occlusion, but it has not yet been proven.

Therefore, this study aimed to analyze the effects of selective occlusion of an atrial coronary branch on atrial electrograms and surface ECG in a model close to human cardiac coronary distribution and electrophysiology.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population

This study involved seven anesthetized domestic swine (Landrace-Large White cross) weighing  $40 \pm 5$  kg (six successful animals submitted to 4 h ischemia and one sham animal). The animals were premedicated with midazolam (0.6 mg/kg) and ketamine (12 mg/kg) intramuscularly. General anesthesia was induced with intravenous propofol (2–4 mg/kg) and was maintained with a mixture of oxygen and sevoflurane inhalation (2.5–3.5%). After endotracheal intubation, they were mechanically ventilated. Analgesia was maintained during the entire procedure with intravenous fentanyl (2.5  $\mu$ g/kg). The study protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of our institution and fully conformed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition (National Research Council, 2010).

## Experimental Procedures

### Atrial Coronary Branch Occlusion

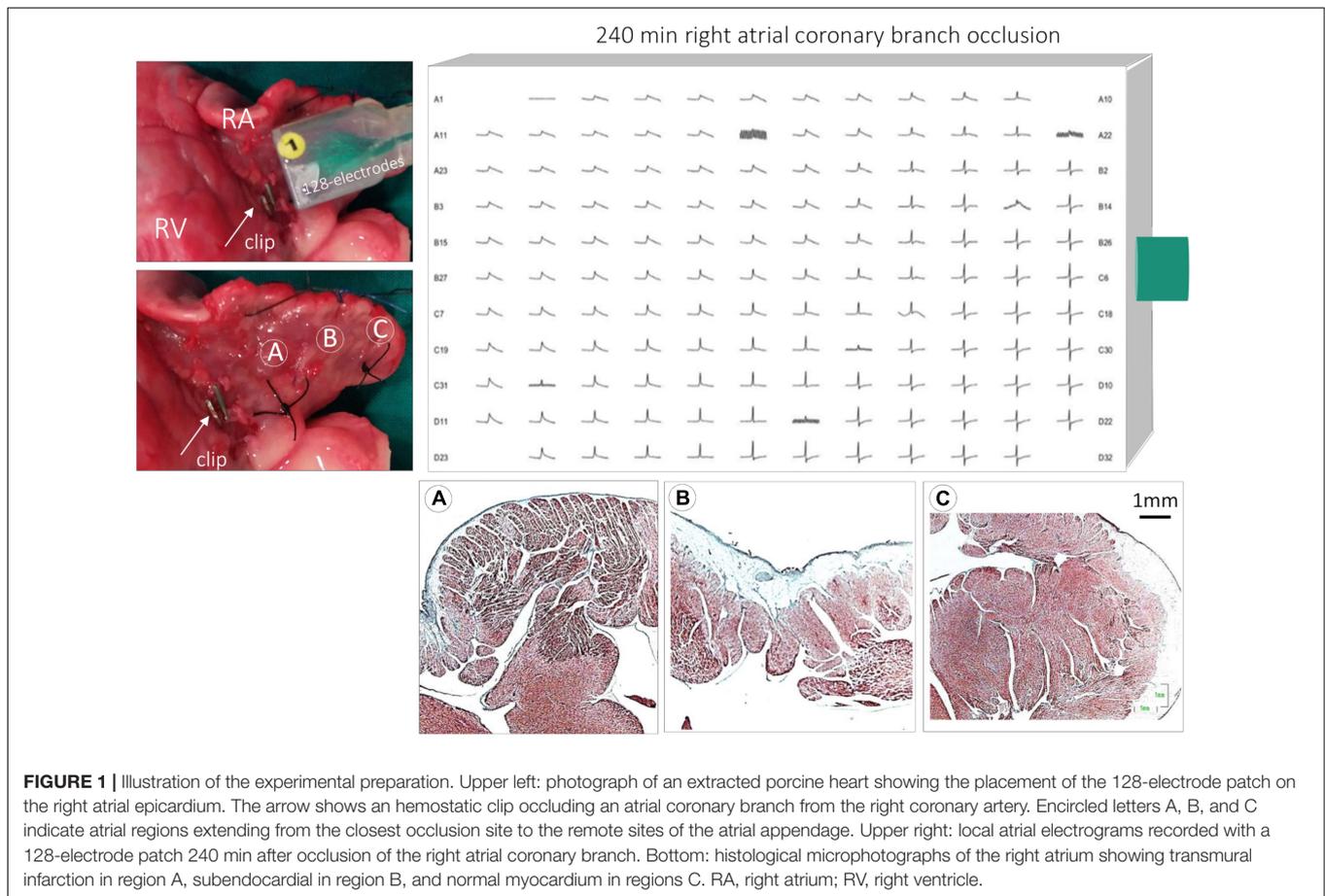
A median sternotomy was performed, and the pericardium was opened to expose the heart in a pericardial cradle. Atrial coronary branches arising from the right coronary artery were identified by fine direct dissection and separated from the surrounding fat tissue. In all cases, the atrial coronary branches originated at the proximal segment of the right coronary artery. Then, the atrial coronary branch was selectively occluded with hemostatic clips (Peters Surgical, France) (**Figure 1**) during 4 h in six pigs. One additional pig was submitted to the same experimental procedures, but the atrial coronary branches were not occluded (sham experiment). The thorax was maintained opened during the 4 h of atrial branch occlusion.

### Atrial Epicardial Mapping

The epicardial unipolar atrial electrograms (**Figure 1**) were recorded with 128 electrodes spaced 1 mm mounted on a patch of 17 mm  $\times$  12.5 mm. This probe was gently sutured with Prolene 3/0 snare (Ethicon) to the atrial epicardium in a region close to the isolated atrial coronary branch. The reference electrode was placed at the upper mediastinal region close to the thymus and to the upper border of the sternotomy. Within this discrete anatomical region, we chose the site that provided well voltage and stable atrial electrograms. Then, the position of the reference electrode remained unaltered during the experiment. The local electrical potentials were recorded with a BioSemi acquisition system (BioSemi, Netherlands). Recordings were obtained at a sampling rate of 2 kHz and stored continuously during the first 60 min of atrial coronary occlusion and, thereafter, every 15 min until completing the 4-h occlusion. An offline analysis of the atrial electrograms was done with a custom-made Matlab script (MathWorks, United States), and the following parameters were measured: R/S wave amplitude, local activation time, measured between the start of increment of the R wave and at the highest downstroke slope after the R wave peak, and ST segment deviation from the J point. To have a quantitative appreciation of the changes in these parameters, we selected a group of six neighboring electrodes with an appropriate signal/noise ratio that have shown monophasic potentials. We defined as monophasic potentials all electrograms showing increased R wave amplitude together with loss of S wave and appearance of ST segment elevation.

### Surface Electrocardiogram

The ECG was continuously recorded using a CardioSoft system (GE Healthcare, Germany), as previously reported (Noriega et al., 2013). The ECG was recorded at baseline and continuously during atrial coronary artery occlusion at a sampling rate of 200 Hz. All ECG recordings analyzed in this study were obtained in the open chest condition. Changes in the amplitude and duration of the P wave, QRS-complex duration, and ST segment at the J point were measured with Matlab scripts at ECG lead II using signal averaging in a window time of 1 min. We selected lead II because, in clinical practice, it is commonly used to evaluate the P wave characteristics, and moreover, the signal voltage of the lead was less affected after the median sternotomy.



## Anatomopathological Examination

After 4 h of atrial coronary occlusion, pigs were euthanized by electrically inducing ventricular fibrillation. The heart was explanted with the 128 electrodes sutured in its initial position. Then, the position of the 128-electrode patch was marked with fine Prolene snares sutured at each electrode corner (**Supplementary Figure S1**). This procedure was done to evaluate a potential correspondence between the electrical electrograms and the underlying anatomical substrate. The heart was then cleaned from blood and fixed in buffered formalin. The atria were separated from the ventricles and embedded in a paraffin block for histological analysis. Sections of 12  $\mu\text{m}$  were mounted and stained with Masson's trichrome. A morphometry study was performed in six infarcted pigs to evaluate the average extent of myocyte degeneration (myolysis). As described previously (Climent et al., 2004), digital images were taken of the sections stained with Masson's using a Nikon SMZ 1500 microscope (Nikon, United States). Morphometry was performed at least in four fields per atrial sample, in the regions of maximum extent of infarcted area, using a grid covering an area of  $\sim 4 \text{ mm}^2$  of atrial sample. The areas of myolysis were expressed as a percentage of the entire limits of the grid. Blood vessels, perivascular interstitial tissue, and intertrabecular spaces between the pectinate muscles were excluded from the morphometric analysis. The identification of the areas of myolysis was done by

direct visualization of the histological preparation by an expert anatomopathologist at proper magnification.

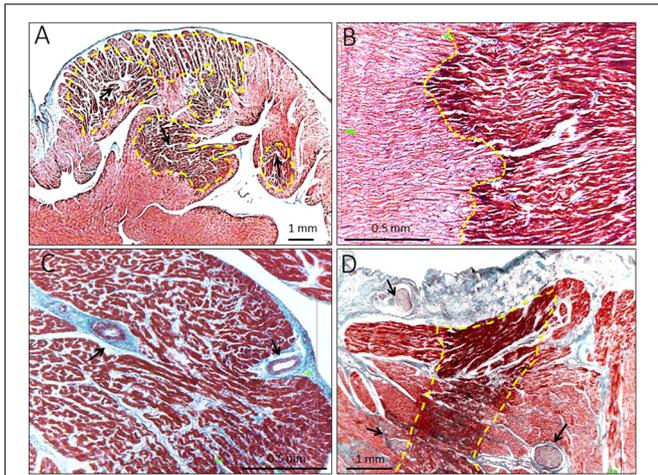
## Data Analysis

Quantitative data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). The ordinary two-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparison correction was used to evaluate the significance of the changes from baseline to selected occlusion times in the atrial R/S waves, local activation time, and ST segment. The ANOVA test was also used to assess the significance of the evolving changes in P wave morphology, QRS duration, and ST segment displacement in the ECG. The paired *t*-test was used to assess the significance of the changes in the number of electrodes showing ischemic changes. A  $p < 0.05$  was considered significant. All analyses were performed using SPSS v.22.0 (IBM-SPSS, United States).

## RESULTS

### Anatomopathological Findings

As illustrated in **Figure 2A**, occlusion of an atrial coronary branch induced degeneration and coagulative necrosis of groups of cardiomyocytes. The necrosis depicted a "patchy" distribution and showed myocardial fiber disarray with cellular infiltration.



**FIGURE 2 |** Histological findings in pigs submitted to 4-h of atrial coronary branch occlusion. **(A)** Microphotograph showing areas of “patchy” necrosis with myocardial fiber disarray (arrows) and sharp border zone (yellow marks). **(B)** Detailed amplification of the ischemic border zone showing a sharp band of interdigitating ischemic and normal cells (yellow marks). **(C)** Subendocardial infarction involving a pectinate muscle and small arterioles (arrows). **(D)** Necrotic foci (yellow marks) in the vicinity local atrial epicardial neural fibers (arrows).

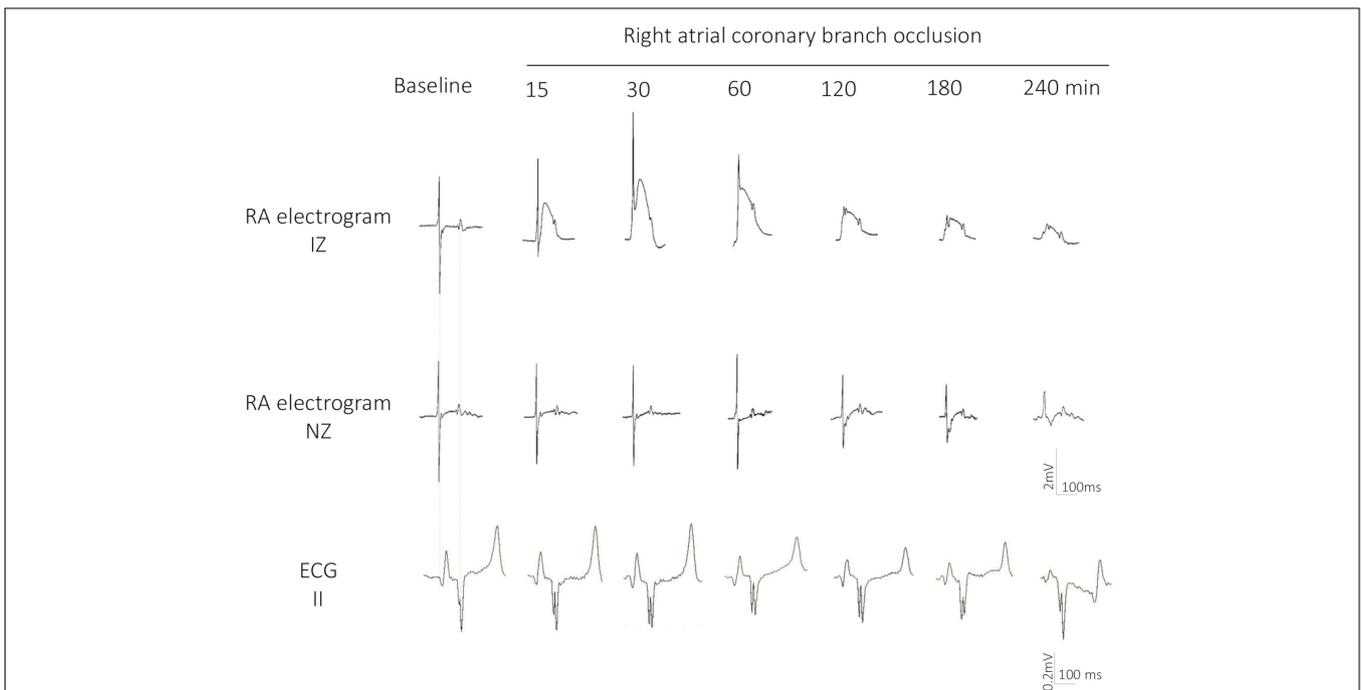
The transitional ischemic border zone was abrupt and was composed of an interdigitating band of normal and ischemic cells (**Figure 2B**). The infarction affected subendocardial regions

of the pectinate muscles and encompassed small arterioles (**Figure 2C**). In some instances, the necrotic foci appeared near local atrial epicardial or intramyocardial neural fibers (**Figure 2D**). The morphometric analysis in the sections showing the greatest infarct extent revealed that the mean area of myolysis in the six pigs was ~54% (range, 37.7–77.8%) of the entire examination field. **Supplementary Figure S2** illustrates representative examples of the measured areas of myolysis. The atria of the sham-operated pig were free of myocardial necrosis.

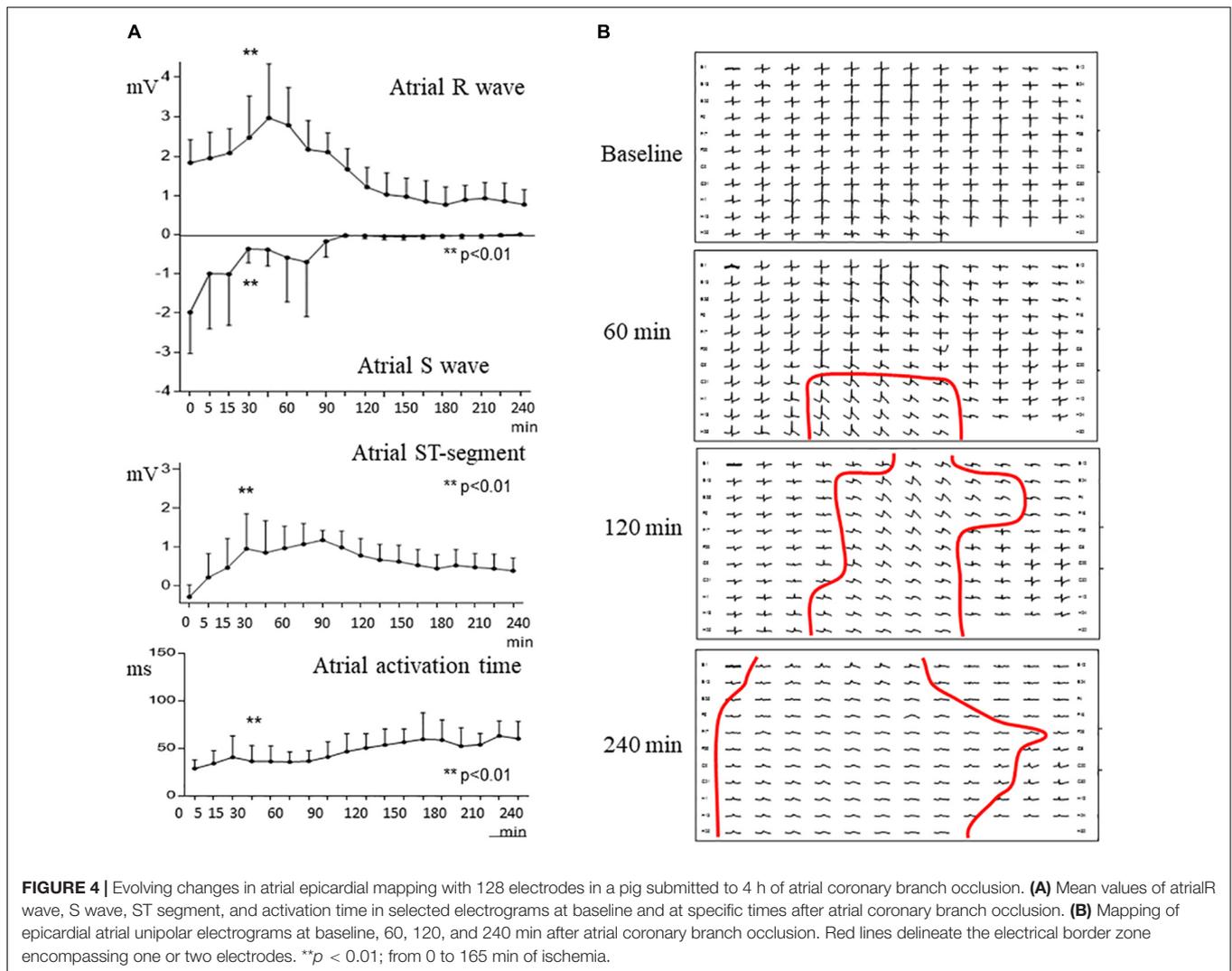
### Atrial Epicardial Mapping

At baseline conditions, the atrial electrograms showed an R/S complex (**Figure 3**) with a duration of  $48.6 \pm 10.2$  ms, closely followed by isoelectric ST segment. **Figure 3** also illustrates the time correspondence between the local atrial signals and the surface ECG: the atrial R/S complex coincided with the surface P wave and the atrial ST segment with the PR segment of the ECG.

During the first 30 min of atrial branch occlusion (**Figures 3, 4**), the atrial epicardial electrodes overlying the ischemic area showed the following: (a) progressive increase in the R wave amplitude (from  $1.8 \pm 0.6$  mV at baseline to  $2.5 \pm 1.1$  mV at 30 min occlusion,  $p < 0.01$ ), (b) disappearance of the S wave (from  $-2.0 \pm 1.1$  mV to  $-0.4 \pm 0.4$  mV,  $p < 0.01$ ), (c) prolongation of local activation time (from  $28.5 \pm 8.9$  ms to  $36.1 \pm 16.4$  ms,  $p < 0.01$ ), and (d) gradual elevation of the ST segment leading to monophasic potentials (from  $-0.3 \pm 0.3$  mV to  $1.0 \pm 1.0$  mV,  $p < 0.01$ ). After 30–40 min of occlusion, the affected atrial electrograms depicted



**FIGURE 3 |** Evolving changes in epicardial atrial electrograms and surface ECG lead II in a pig submitted to 4 h of atrial coronary branch occlusion. Local electrograms in an ischemic (IZ) and normal zone (NZ) recorded at baseline and after 15, 30, 60, 120, 180, and 240 min of right atrial coronary branch occlusion showing increase in R wave amplitude, disappearance of the S wave, ST segment elevation, and monophasic potentials.

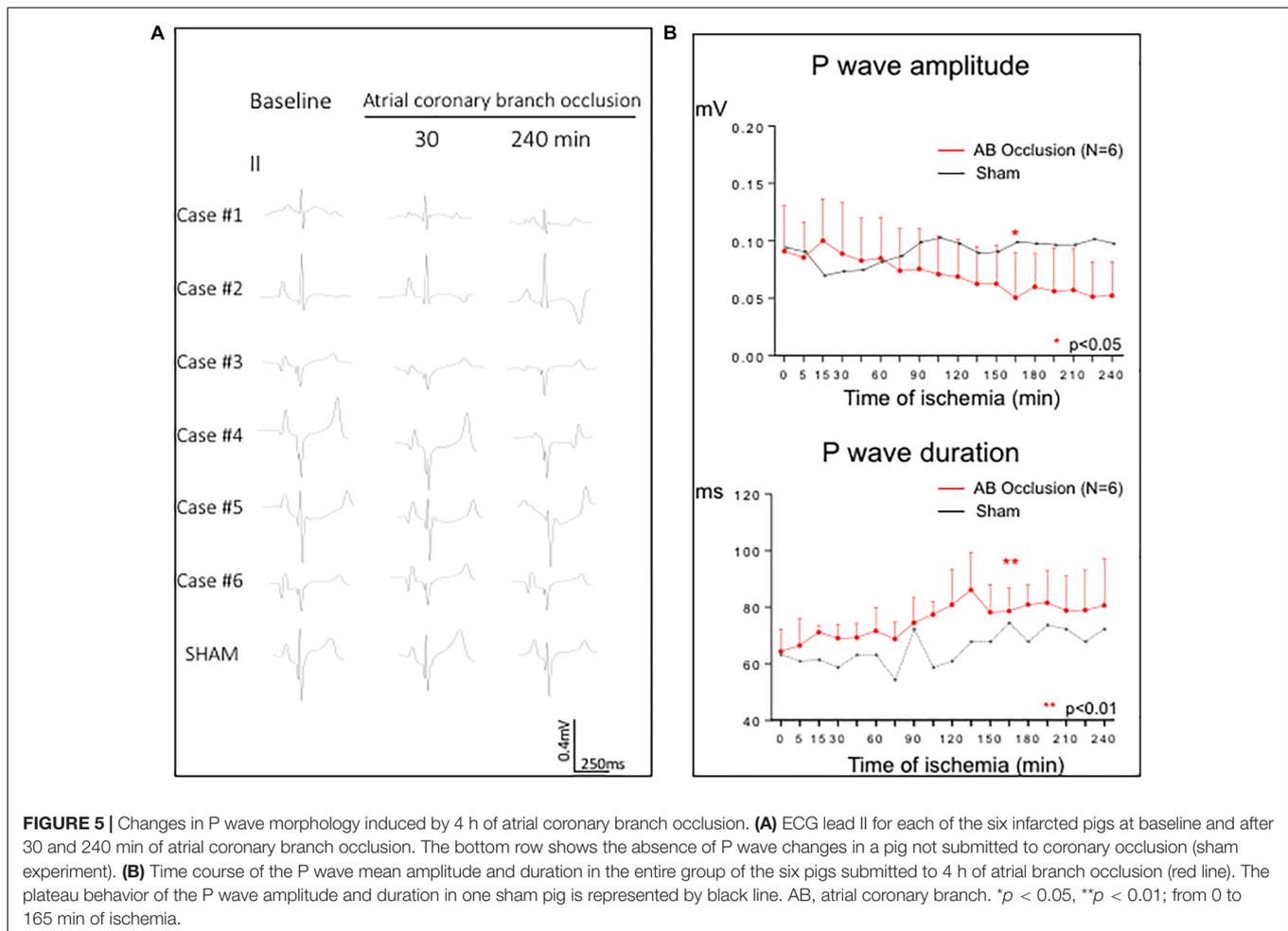


a progressive decline in R wave amplitude and ST segment elevation maximal at 4 h of occlusion (R wave,  $0.8 \pm 0.4$  mV; ST segment,  $0.4 \pm 0.3$  mV;  $p < 0.01$ , from baseline). Electrodes not showing ST segment changes depicted a reduction in R wave amplitude of  $\sim 30\%$  after 3 h of occlusion (**Figure 4A**). In two cases, we observed a transient electrical recovery phase characterized by a reduction in the ST segment elevation and improvement of the local activation delay with reappearance of local intrinsic deflections on previously monophasic potentials (**Supplementary Figure S3**). This phase began at about 45–60 min of occlusion and ended 30 min thereafter. In all animals, we observed a correspondence between the anatomopathological substrate and the electrical mapping. This correspondence was established by identifying first the necrotic regions in the serial section of the atria stained with Masson's trichrome and then determining their projection into the 128-electrode patch, which was marked with Prolene snares and photographed at the end of the experiment. Necrotic regions corresponded to electrode areas with monophasic potentials, and healthy regions depicted normal electrograms (**Figure 1**, bottom panel).

The transition between electrodes with ischemic changes and electrodes with normal potentials encompassed less than two contiguous electrode sites (**Figure 4B**). Thus, since the mapping electrodes were spaced 1 mm, the expected width of the electrical border zone would be smaller than 2 mm. The area of the epicardial mapping encompassing electrodes with monophasic potentials increased during the occlusion period (**Figure 4B**). The number of electrodes showing monophasic potentials increased overtime ( $28 \pm 35$  at 60 min,  $98 \pm 37$  at 120 min, and  $112 \pm 18$  at 240 min;  $p < 0.01$ ).

### Surface ECG Findings

As shown in **Figure 5**, changes in P wave morphology were only appreciable late after 2 h of coronary occlusion. After 165 min of occlusion P wave amplitude decreased from  $0.09 \pm 0.04$  mV at baseline to  $0.05 \pm 0.04$  mV ( $p < 0.05$ ) and P wave duration increased from  $64.4 \pm 8.0$  ms to  $80.9 \pm 12.6$  ms ( $p < 0.01$ ). We did not observe appreciable deviations of the PR-segment level in any ECG lead. The sham pig did not show noticeable changes in the P wave morphology. Selective occlusion of the atrial branch



did not induce concurrent ventricular ischemia as denoted by the absence of significant changes in the QRS-complex duration and ST segment level (**Supplementary Figure S4**). Episodes of atrial fibrillation were not observed.

## DISCUSSION

### Main Findings

This study is the first describing the changes in local atrial electrograms induced by acute occlusion of an atrial coronary branch and their temporal relationship with the ECG. Using a model close to the human cardiac anatomy and electrophysiology (Cinca et al., 1980), we have found that this procedure induces patchy atrial infarction with sharp border zone and evolving changes of atrial R/S waves, ST segment, and local activation time. The early ischemic changes in atrial electrograms were not detectable on the ECG, and only variations in P wave morphology were appreciated in later stages of atrial branch occlusion.

### Anatomopathological Findings

The structural features of atrial infarction have been analyzed in necropsy studies of patients who presented a concomitant

ventricular myocardial infarction caused by occlusion of the RCA or LCX (Cushing et al., 1942; Liu et al., 1961). In these studies, the atrial infarction was massive, suggesting that the interruption of coronary flow affected most of the atrial branches that ordinarily arise from the proximal segment of the RCA or LCX (Baroldi et al., 1956; James and Burch, 1958). Similarly, proximal LCX occlusion induced large atrial infarcts and atrial dilation in pigs (Aguero et al., 2017), which, like humans, have a comparable emergence of the atrial branches from the RCA or LCX coronary arteries (Weaver et al., 1986). By contrast, the structural changes induced by selective atrial branch occlusion have been only described by a single research group in dogs and sheep (Sinno et al., 2003; Rivard et al., 2007; Avula et al., 2018). In dogs, the isolated occlusion of an atrial branch of the RCA induced atrial ischemic changes, which were often nearly transmural at the center of the ischemic area but followed a patchy distribution at the periphery. Similar to previous studies in dogs (Sinno et al., 2003; Rivard et al., 2007), our study in pigs showed that a selective occlusion of an atrial branch of the RCA induced a patchy atrial necrosis pattern, perhaps favored by coronary collaterals that ordinarily interconnect the atrial branches in human and porcine hearts (Baroldi et al., 1956; James and Burch, 1958; Weaver et al., 1986). Bragt et al. (2015)

measured the coronary blood flow through an atrial branch of the LCX coronary in pigs and found that it was maximal in the early diastolic phase and ranged 5–10 ml/min.

## Epicardial Atrial Mapping

This study reveals that during the first 30 min of selective atrial branch occlusion, the local atrial electrograms show a progressive increase in R wave amplitude associated with parallel prolongation of the local activation time and elevation of the ST segment leading to monophasic potentials. These changes are fully comparable to those described in acute ventricular myocardial ischemia (Janse et al., 1979; Cinca et al., 1980), and this resemblance suggests that atrial and ventricular myocardial ischemia share similar cellular electrophysiological derangements. Assuming this parallelism, the R/S wave changes would indicate the existence of a slow conduction in the ischemic atrial myocardium and the ST segment elevation from a flow of injury currents created by the loss of resting membrane potential of ischemic cells (Kléber et al., 1978). Likewise, monophasic potentials will indicate local atrial cellular inexcitability. In two cases, we observed a transient recovery of local activation time and a reduction in the ST segment elevation similarly found in acute ventricular myocardial ischemia, also in swine. This is not due to a concurrent structural improvement of the ischemic myocardium but rather to a concurrent transitory decrease in potassium accumulation in the ischemic myocardium (Janse et al., 1979; Coronel et al., 2019).

One hour after atrial branch occlusion, there was a progressive decrease in the magnitude of ST segment elevation despite the persistence of the coronary clamping. The decline of the ST segment elevation overtime was constantly observed in ventricular myocardial ischemia and is caused by the progressive increase in the electrical resistivity in the ischemic myocardium, which impedes the propagation of the injury currents throughout the ischemic and normal regions (Kléber et al., 1987; Cinca et al., 1997).

The electrical border zone of atrial infarction was abrupt. The atrial mapping showed that the transition between electrodes with normal electrograms and electrodes with ST segment elevation was about 1–2 mm. Of note, this electrical border shifted during the course of ischemia as denoted by the progressive increase in the number of electrodes showing monophasic potentials after 2 h of atrial branch occlusion. These changes have not been appreciated in ventricular myocardial ischemia in the same experimental model (Janse et al., 1979). Reasons for the time-dependent instability of the atrial area at risk cannot be fully elucidated. However, local edema induced in the course of acute myocardial ischemia could interfere atrial coronary perfusion and expand the injured area. In favor of the presence of local edema, we found a reduction in the amplitude of local electrogram that have not shown ischemic ST segment changes.

Atrial arrhythmias, and particularly atrial fibrillation, have been considered diagnostic clues to suspect atrial infarction involvement in patients with acute occlusion of the RCA or LCX coronary arteries (Lazar et al., 1988; Lu et al., 2016). Atrial epicardial mapping in dogs with selective atrial branch occlusion

showed slowing of atrial conduction and prolongation of the refractory period, leading to a substrate for atrial fibrillation maintenance (Sinno et al., 2003). However, these arrhythmias were absent in our study and also in dogs, in which only increased stability of electrically induced atrial fibrillation was attained (Sinno et al., 2003).

## ECG Findings

This study allows to understand the limited diagnostic value of the surface ECG to recognize atrial infarction. The acute ischemic changes in the atrial R/S waves and local activation times translate to the surface ECG as unspecific variations of P wave morphology, but these were only appreciable at advanced stages of atrial coronary occlusion. On the other hand, the characteristic ischemic displacements of the atrial ST segment did not induce appreciable shifts of the PR segment at the surface ECG. A relatively low incidence (20%) of PR-segment displacement was reported in a series of 39 patients with acute inferior myocardial infarction submitted to primary coronary angioplasty and angiographic documentation of atrial branch involvement (Yıldız et al., 2018). Moreover, the PR-segment deviation can vanish over time as was reported in a prospective series of 17 patients with accidental occlusion of atrial branch during elective coronary angioplasty (Álvarez-García et al., 2016).

Selective atrial branch occlusion did not elicit ST segment changes in the surface ECG, thus confirming the absence of concurrent ventricular myocardial ischemia in our atrial infarction model.

## Study Limitations

A median sternotomy was needed to perform the atrial epicardial mapping and the direct ligation of an atrial coronary branch. Since this intervention modifies the spatial relationship of the surface ECG leads and the heart, we focused our analysis on lead II because it was the less affected by the sternotomy and is currently accepted as an appropriate lead to evaluate the P wave morphology. The relatively small sample size of this study only allows a qualitative description of the characteristics and time course of the local atrial electrograms induced by selective acute atrial infarction. This proof-of-concept approach affords foundation for future, more highly powered studies aimed at describing ECG markers of the extension and location of the infarction in the right or left atrial chambers.

This study does not allow determining the influence of the extent of atrial infarction on the magnitude of the P wave changes of the surface ECG. The median sternotomy needed to perform both the atrial mapping and the direct ligation of the coronary atrial branches disrupts the spatial relationship of the heart with the ECG leads and, consequently will hamper any attempt to accurately correlate the magnitude of the P wave changes with the size of atrial infarction. However, the finding of significant changes in the P wave morphology during atrial ischemia in our study suggests, at least, that atrial infarction was large enough to project into the surface ECG. Future studies in closed chest models are therefore needed to precisely quantify the effects of atrial infarct size on the P wave characteristics. The lack of quantification of the atrial infarct size in this study does

not invalidate the epicardial mapping data because the changes in local atrial electrograms are not dependent on the remote extension of infarction but only on local site-to-site transmural spanning of the ischemic injury.

## Clinical Implications

Translation of our findings to the clinical setting is tenable because the distribution of atrial coronary branches and the electrophysiological derangements caused by acute myocardial ischemia in pigs and humans are comparable (Weaver et al., 1986; Cinca et al., 1998).

Our study suggests that although acute occlusion of an atrial branch in patients with coronary atherosclerosis would cause atrial infarction, this condition would be hardly recognized by the surface ECG. Indeed, the specific acute local electrical alterations were only reflected by unspecific changes in P wave morphology at late stages of occlusion. However, acute atrial myocardial ischemia would be reliably detected clinically by direct atrial recordings, and this may open new diagnostic technological developments applicable to patients with implanted electrostimulation devices.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee Research Institute of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

GA-F and JC made substantial contributions to the conception and design of the work, participated in the acquisition, analysis,

and interpretation of the data, drafted the manuscript, and given the final approval of the version to be published and the agreement to be accountable of all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. ER-D, DS-Q, SC-R, EJ, JN-M, DA, XM, CA-M, and JG made substantial contributions to the design of the work, participated in the acquisition of the data, revised the draft critically for important intellectual content, and given the final approval of the version to be published and the agreement to be accountable of all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

## FUNDING

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (CB16/11/00276 and FIS PI17/00069) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.00264/full#supplementary-material>

**FIGURE S1** | Photographs illustrating the correspondence between the corners of the 128-patch electrode (A) and the fixed black Prolene snare marks (B).

**FIGURE S2** | Representative microphotographs illustrating the morphometric analysis of the extent of area of myocardial myolysis. (A–C) show examples of areas of myolysis of 38, 46, and 72%, respectively.

**FIGURE S3** | Evolving changes in epicardial atrial electrograms in a pig submitted to 4-h of atrial coronary branch occlusion showing a transient recovery of local activation between 30–60 min of occlusion.

**FIGURE S4** | Graphs showing the stability of the mean values of ventricular ST-segment and QRS duration at baseline and at specific times of atrial branch occlusion measured in lead II in six pigs submitted to 4-h of atrial coronary branch occlusion.

## REFERENCES

- Aguero, J., Galan-Arriola, C., Fernandez-Jimenez, R., Sanchez-Gonzalez, J., Ajmone, N., Delgado, V., et al. (2017). Atrial infarction and ischemic mitral regurgitation contribute to post-MI remodeling of the left atrium. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 2878–2889. doi: 10.1016/j.jacc.2017.10.013
- Álvarez-García, J., Vives-Borrás, M., Ferrero, A., Aizpurua, D. A., Peñaranda, A. S., and Cinca, J. (2013). Atrial coronary artery occlusion during elective percutaneous coronary angioplasty. *Cardiovasc. Revasculariz. Med.* 14, 270–274. doi: 10.1016/j.carrev.2013.07.007
- Álvarez-García, J., Vives-Borrás, M., Gomis, P., Ordóñez-Llanos, J., Ferrero-Gregori, A., Serra-Penaranda, A., et al. (2016). Electrophysiological effects of selective atrial coronary artery occlusion in humans. *Circulation* 133, 2235–2242. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021700
- Avula, U. M. R., Hernandez, J. J., Yamazaki, M., Valdivia, C. R., Chu, A., Rojas-Pena, A., et al. (2018). Atrial infarction-induced spontaneous focal discharges and atrial fibrillation in sheep role of dantrolene-sensitive aberrant ryanodine receptor calcium release. *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* 11, 1–15. doi: 10.1161/CIRCEP.117.005659
- Baroldi, G., Mantero, O., and Scmazzone, G. (1956). The collaterals of the coronary arteries in normal and pathologic hearts. *Circ. Res.* 4, 223–229. doi: 10.1161/01.RES.4.2.223
- Bragt, K. A., Van Nasrallah, H. M., Kuiper, M., Van Hunnik, A., Kuijpers, N. H., Schotten, U., et al. (2015). Dynamic regulation of atrial coronary blood flow in healthy adult pigs. *Heart Rhythm* 12, 991–1000. doi: 10.1016/j.hrthm.2015.01.016
- Cinca, J., Janse, M., Moréna, H., Candell, J., Valle, V., and Durrer, D. (1980). Mechanism and time course of the early electrical changes during acute coronary artery occlusion. An attempt to correlate the early ECG changes in man to the cellular electrophysiology in the pig. *Chest* 77, 499–505. doi: 10.1378/chest.77.4.499
- Cinca, J., Warren, M., Carreño, A., Tresánchez, M., Armadans, L., Gómez, P., et al. (1997). 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* 96, 3079–3086. doi: 10.1161/01.CIR.96.9.3079
- Cinca, J., Warren, M., Rodríguez-Sinovas, A., Tresánchez, M., Carreño, A., Bragós, R., et al. (1998). Passive transmission of ischemic ST segment changes in low

- electrical resistance myocardial infarct scar in the pig. *Cardiovasc. Res.* 40, 103–112. doi: 10.1016/S0008-6363(98)00145-X
- Climent, V., Hurlé, A., Ho, S. Y., Sáenz-Santamaría, J., Nogales, A. G., and Sánchez-Quintana, D. (2004). Early morphologic changes following microwave endocardial ablation for treatment of chronic atrial fibrillation during mitral valve surgery. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 15, 1277–1283. doi: 10.1046/j.1540-8167.2004.04332.x
- Coronel, R., de Groot, J. R., and Piek, J. J. (2019). Transient ST-segment elevation and coronary flow. *Eur. Heart J.* 1, 1–2. doi: 10.1093/eurheartj/ehz331
- Cushing, E. H., Feil, H. S., Stanton, E. J., and Wartman, W. B. (1942). Infarction of the cardiac auricles (atria): clinical, pathological, and experimental studies. *Br. Heart J.* 4, 17–34. doi: 10.1136/hrt.4.1-2.17
- James, T. N., and Burch, G. (1958). The atrial coronary arteries in man. *Circulation* 17, 90–98. doi: 10.1161/01.CIR.17.1.90
- Janse, M. J., Cinca, J., Moréna, H., Fiolet, J. W., Kléber, A. G., de Vries, G. P., et al. (1979). The “border zone” in myocardial ischemia. An electrophysiological, metabolic, and histochemical correlation in the pig heart. *Circ. Res.* 44, 576–588. doi: 10.1161/01.res.44.4.576
- Kléber, A. G., Riegger, C. B., and Janse, M. J. (1987). Electrical uncoupling and increase of extracellular resistance after induction of ischemia in isolated, arterially perfused rabbit papillary muscle. *Circ. Res.* 61, 271–279. doi: 10.1161/01.RES.61.2.271
- Kléber, G., Janse, M. J., van Capelle, F. J., and Durrer, D. (1978). Mechanism and time course of S-T and T-Q segment changes during acute regional myocardial ischemia in the pig heart determined by extracellular and intracellular recordings. *Circ. Res.* 42, 603–613. doi: 10.1161/01.RES.42.5.603
- Lazar, E. J., Goldberger, J., Peled, H., Sherman, M., and Frishman, W. H. (1988). Atrial infarction: diagnosis and management. *Am. Heart J.* 116, 1058–1063. doi: 10.1016/0002-8703(88)90160-3
- Liu, C. K., Greenspan, G., and Piccirillo, R. T. (1961). Atrial infarction of the heart. *Circulation* 23, 331–338. doi: 10.1161/01.CIR.23.3.331
- Lu, M. L. R., De Venecia, T., Patnaik, S., and Figueredo, V. M. (2016). Atrial myocardial infarction: a tale of the forgotten chamber. *Int. J. Cardiol.* 202, 904–909. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.10.070
- National Research Council (2010). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th Edn. Washington, DC: The National Academies Press.
- Nishida, K., Qi, X. Y., Wakili, R., Comtois, P., Chartier, D., Harada, M., et al. (2011). Mechanisms of atrial tachyarrhythmias associated with coronary artery occlusion in a chronic canine model. *Circulation* 123, 137–146. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972778
- Noriega, F. J., Jorge, E., Arzamendi, D., and Cinca, J. (2013). Mechanism and diagnostic potential of reciprocal ECG changes induced by acute coronary artery occlusion in pigs. *Heart Rhythm* 10, 883–890. doi: 10.1016/j.hrthm.2013.02.022
- Rivard, L., Sinno, H., Shiroshita-Takeshita, A., Schram, G., Leung, T. K., and Nattel, S. (2007). The pharmacological response of ischemia-related atrial fibrillation in dogs: evidence for substrate-specific efficacy. *Cardiovasc. Res.* 74, 104–113. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.01.018
- Sinno, H., Derakhchan, K., Libersan, D., Merhi, Y., Leung, T. K., and Nattel, S. (2003). Atrial ischemia promotes atrial fibrillation in dogs. *Circulation* 107, 1930–1936. doi: 10.1161/01.CIR.0000058743.15215.03
- Weaver, M. E., Pantely, G. A., Bristow, J. D., and Ladley, H. D. (1986). A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc. Res.* 20, 907–917. doi: 10.1093/cvr/20.12.907
- Yıldız, S. S., Keskin, K., Avsar, M., Cetinkal, G., Sigirci, S., Aksan, G., et al. (2018). Electrocardiographic diagnosis of atrial infarction in patients with acute inferior ST-segment elevation myocardial infarction. *Clin. Cardiol.* 41, 972–977. doi: 10.1002/clc.22987

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Amorós-Figueras, Roselló-Diez, Sanchez-Quintana, Casabella-Ramon, Jorge, Nevado-Medina, Arzamendi, Millán, Alonso-Martin, Guerra and Cinca. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**3.4. Artículo 4:** *Electrophysiological and histological characterization of atrial scarring in a model of isolated atrial myocardial infarction.*

Amorós-Figueras G, **Casabella-Ramon S**, Company-Se G, Arzamendi D, Jorge E, Garcia-Osuna A, Macías Y, Sánchez-Quintana D, Rosell-Ferrer J, Guerra JM, Cinca J. *Electrophysiological and histological characterization of atrial scarring in a model of isolated atrial myocardial infarction.*

Front Physiol. 2023 Jan 12;13:1104327.

doi: 10.3389/fphys.2022.1104327. PMID: 36714312; PMCID: PMC9877280.

Impact factor 4,755 Q1



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Yoram Etzion,  
Ben-Gurion University of the Negev, Israel

REVIEWED BY  
David Filgueiras-Rama,  
Spanish National Centre for Cardiovascular  
Research, Spain  
Lisa A Gottlieb,  
University of Copenhagen, Denmark  
Avishag Laish-Farkash,  
Assuta Ashdod University Hospital, Israel

\*CORRESPONDENCE  
Gerard Amorós-Figueras,  
✉ gamorosf@santpau.cat

<sup>†</sup>These authors share senior authorship

SPECIALTY SECTION  
This article was submitted to Cardiac  
Electrophysiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

RECEIVED 21 November 2022  
ACCEPTED 28 December 2022  
PUBLISHED 12 January 2023

CITATION  
Amorós-Figueras G, Casabella-Ramon S,  
Company-Se G, Arzamendi D, Jorge E,  
García-Osuna A, Macías Y,  
Sánchez-Quintana D, Rosell-Ferrer J,  
Guerra JM and Cinca J (2023),  
Electrophysiological and histological  
characterization of atrial scarring in a  
model of isolated atrial  
myocardial infarction.  
*Front. Physiol.* 13:1104327.  
doi: 10.3389/fphys.2022.1104327

COPYRIGHT  
© 2023 Amorós-Figueras, Casabella-  
Ramon, Company-Se, Arzamendi, Jorge,  
García-Osuna, Macías, Sánchez-Quintana,  
Rosell-Ferrer, Guerra and Cinca. This is an  
open-access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original publication in  
this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# Electrophysiological and histological characterization of atrial scarring in a model of isolated atrial myocardial infarction

Gerard Amorós-Figueras<sup>1\*</sup>, Sergi Casabella-Ramon<sup>1</sup>,  
Georgina Company-Se<sup>2</sup>, Dabit Arzamendi<sup>1</sup>, Esther Jorge<sup>1</sup>,  
Alvaro Garcia-Osuna<sup>3</sup>, Yolanda Macías<sup>4</sup>,  
Damián Sánchez-Quintana<sup>4</sup>, Javier Rosell-Ferrer<sup>2</sup>, José M. Guerra<sup>1†</sup>  
and Juan Cinca<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, UAB, CIBERCV, Barcelona, Spain, <sup>2</sup>Electronic and Biomedical Instrumentation Group, Department of Electronics Engineering, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, Spain, <sup>3</sup>Biochemistry Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain, <sup>4</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Extremadura, Badajoz, Spain

**Background:** Characterization of atrial myocardial infarction is hampered by the frequent concurrence of ventricular infarction. Theoretically, atrial infarct scarring could be recognized by multifrequency tissue impedance, like in ventricular infarction, but this remains to be proven.

**Objective:** This study aimed at developing a model of atrial infarction to assess the potential of multifrequency impedance to recognize areas of atrial infarct scar. **Methods:** Seven anesthetized pigs were submitted to transcatheter occlusion of atrial coronary branches arising from the left coronary circumflex artery. Six weeks later the animals were anesthetized and underwent atrial voltage mapping and multifrequency impedance recordings. The hearts were thereafter extracted for anatomopathological study. Two additional pigs not submitted to atrial branch occlusion were used as controls.

**Results:** Selective occlusion of the atrial branches induced areas of healed infarction in the left atrium in 6 of the 7 cases. Endocardial mapping of the left atrium showed reduced multi-frequency impedance (Phase angle at 307 kHz: from  $-17.1^\circ \pm 5.0^\circ$  to  $-8.9^\circ \pm 2.6^\circ$ ,  $p < .01$ ) and low-voltage of bipolar electrograms ( $1.2 \pm 0.1$  mV vs.  $1.9 \pm 1.5$  mV vs.,  $p < .01$ ) in areas affected by the infarction. Data variability of the impedance phase angle was lower than that of bipolar voltage (coefficient of variability of phase angle at 307 kHz vs. bipolar voltage: .30 vs. .77). Histological analysis excluded the presence of ventricular infarction.

**Conclusion:** Selective occlusion of atrial coronary branches permits to set up a model of selective atrial infarction. Atrial multifrequency impedance mapping allowed recognition of atrial infarct scarring with lesser data variability than local bipolar voltage mapping. Our model may have potential applicability on the study of atrial arrhythmia mechanisms.

## KEYWORDS

atrial branch occlusion, atrial myocardial infarction, ECG, endocardial electrical mapping, multifrequency myocardial impedance, anatomopathology

## 1 Introduction

Improving electrophysiological identification of areas of atrial fibrosis would be of relevance in the ablation treatment of patients suffering from atrial arrhythmias. Nowadays the electroanatomic cardiac navigators use the information of the local voltage as surrogate marker of fibrosis. However, the voltage cut-off values vary from patient to patient and are dependent on the cardiac rhythm at the time of the procedure. (Lahuerta et al., 2022). Electrophysiological characterization of atrial infarct scarring is hampered by the paucity of animal models mimicking this clinical entity. To date, the basic knowledge on the intrinsic electrophysiological alterations induced by isolated atrial myocardial infarction (MI) are based on short series of experimental studies. (Sinno et al., 2003; Rivard et al., 2007; Nishida et al., 2011; Alasady et al., 2013; Avula et al., 2018; Amorós-Figueras et al., 2020) These studies showed slowing of local atrial conduction, prolongation of the refractory period, (Sinno et al., 2003), and changes in ST segment and voltage of local atrial electrograms. (Amorós-Figueras et al., 2020) More recently new surrogates for the detection of atrial fibrosis have been proposed and these include strain imaging during left atrial reservoir phase, (Laish-Farkash et al., 2021), or atrial magnetic resonance imaging using late gadolinium enhancement LGE-MRI. (Hopman et al., 2022) Endocardial measurement of myocardial electrical impedance allowed recognition of chronic infarction of the ventricle, (Amorós-Figueras et al., 2018), but its ability to detect the infarct scarring in the atria has not been reported.

This study aimed at developing a closed-chest animal model of selective occlusion of atrial coronary branches to detect atrial infarct scarring by endocardial mapping of multifrequency tissue electrical impedance.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Study population

This study involved 9 domestic swine (Landrace-Large White cross). Seven pigs underwent atrial coronary branch occlusion whereas the remaining two were used as controls for endocardial voltage mapping and multifrequency impedance data. The study protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of our institution, and fully conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, eighth ed. (National Research Council. Washington, DC: The National Academies Press, 2010).

### 2.2 Experimental procedures

#### 2.2.1 Induction of chronic atrial myocardial infarction

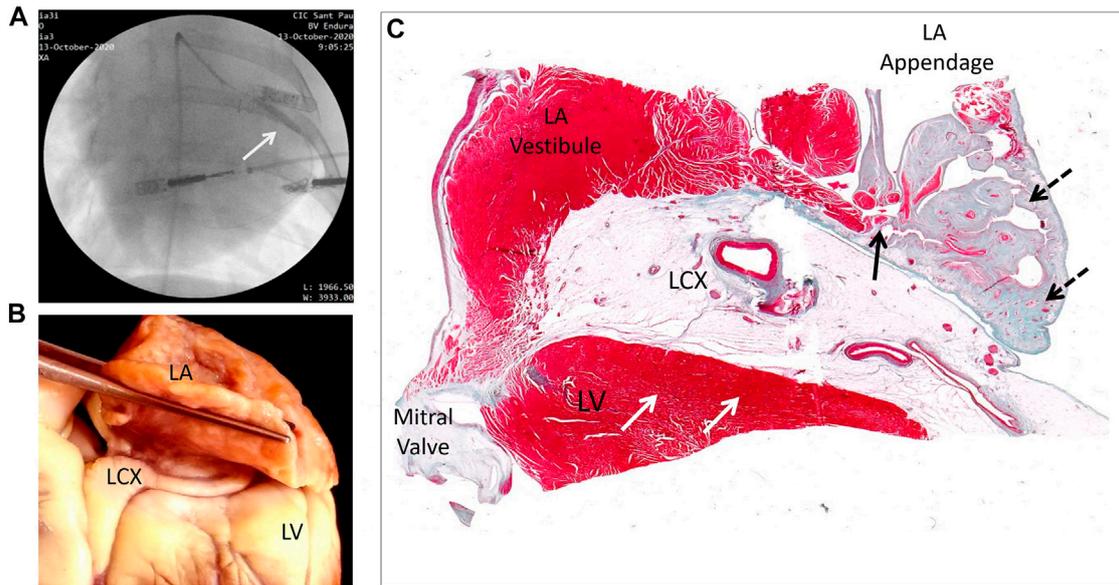
Seven pigs weighing  $49 \pm 5$  kg were premedicated with midazolam (0.6 mg/kg) and ketamine (12 mg/kg) intramuscularly. General anesthesia was induced with intravenous propofol (2–4 mg/kg) and was maintained with a mixture of oxygen and sevoflurane inhalation (2.5%–3.5%). The animals were mechanically ventilated through endotracheal intubation and analgesia was maintained during the entire procedure with intravenous fentanyl (0.1  $\mu$ g/kg/min). A femoral

artery was catheterized with a 7F cannula and a 6F hockey stick guiding catheter (Cordis, United States) was introduced. Under fluoroscopic guidance (Philips Endura), the catheter was advanced to the proximal segment of the LCX and a covered stent (PK Papyrus, Biotronik, Germany) was deployed with a catheter balloon (Figure 1A). We selected this stent because it would allow interruption of blood flow in the exiting atrial coronary branches but preserving at the same time the main stream flow into the LCX, avoiding a concomitant ventricular infarction. We verified the existence of atrial coronary branches arising from the LCX in pigs in a previous series of open-chest experiments. (Amorós-Figueras et al., 2020) The small diameter of these atrial vessels was often below the resolution of our fluoroscopic system and images could not be consistently obtained. A 15-lead ECG was continuously recorded during the procedure to verify the absence of ST-changes secondary to acute ventricular myocardial ischemia. Animals were allowed to recover and were treated with antibiotics and analgesics. After a median period of 6 weeks, the 7 pigs underwent sedation and general anesthesia like in the previous intervention. We performed an atrial endocardial mapping of local electrograms and local tissue electrical impedance. Thereafter, the animals were euthanized, and the hearts processed for anatomopathological study (Figure 1B).

#### 2.2.2 Mapping of left atrial electrograms and tissue electrical impedance

These procedures were performed in the 7 pigs with 6-week old atrial coronary branch occlusion and in the 2 control pigs not submitted to coronary intervention. A femoral vein was catheterized and a mapping electrocatheter (Smarttouch<sup>®</sup>, Biosense-Webster, United States) was advanced into the left atrium through a transeptal access. The electrocatheter was connected to a CARTO three system (Biosense-Webster, United States) to generate 3D high density endocardial mapping of left atrial unipolar and bipolar local electrograms (Electroanatomic map settings: Tissue Proximity Index was activated, Local Activation Time stability was set to 3 ms, Position Stability was set to 2 mm, the map density for voltage maps was  $1,646 \pm 1,277$  points and for impedance maps was  $28 \pm 9$  points, Force Setting was set to Force above minimum threshold, Color Fill Threshold was set to 30). The voltage amplitude (mV) was automatically measured in all endocardial signals and thereafter, voltage and activation maps were constructed. Based on the clinically accepted definition of areas of low voltage in endocardial mapping procedures, (Kottkamp et al., 2017), we considered areas of low atrial voltage those with local bipolar voltage  $<5$  mV.

Myocardial electrical impedance of the left atrium was measured at selected anatomical regions (atrial appendage, septum, anterior and posterior wall) at frequencies ranging from 1 to 1,000 kHz using the same endocardial mapping electrocatheter. This catheter was connected to an impedance recording system made by our group. (Sanchez et al., 2013) Alternating currents (1 ms duration, 1 mA total peak amplitude) of twenty-six frequencies ranging from 1 to 1,000 kHz were injected between the distal electrocatheter pole and a skin reference electrode (Dispersive pad, 3M) placed on the anterior thoracic region. The resultant changes in current voltage were measured between the distal electrocatheter pole and a second thoracic skin reference electrode (ECG pad, 3M). The local impedance was measured at a sampling rate of 60 Hz during the entire duration of the cardiac cycle and stored at 2 s frames. The impedance magnitude ( $Z$ ) and the phase angle (PA) were measured at all current frequencies. The  $Z$  quantifies the drop of voltage amplitude for a given applied



**FIGURE 1**

Illustration of the experimental procedure and study specimen preparations. (A) Fluoroscopic image of one studied pig showing the catheter balloon located in the proximal segment of the LCX while deploying the covered stent (white arrow). (B) Photograph showing the anatomical relationship between the left ventricle (LV), left atrium (LA) and the left circumflex coronary artery (LCX) where the covered stent was deployed. (C) Microphotograph of a histological preparation (frontal section) showing both areas of infarct infarcted (dashed arrows) and non-infarcted areas (solid arrows) in the left atrial appendage with preserved left ventricular myocardium (white arrows) corresponding to the annular area.

current and the PA reflects the time delay between the voltage and current waves which is influenced by structural characteristics of the myocardial tissue. In an attempt to discriminate between healthy and infarcted atrial regions we selected a phase angle cutoff of  $-12^\circ$  at 307 kHz based on a previous study in a pig model of chronic left ventricular infarction. (Amorós-figueras et al., 2017)

To support the assumption that atrial fibrosis accounted for the areas of low-voltage and depressed electrical impedance, we analyzed the left atrial voltage mapping and multifrequency impedance data recorded in two control pigs not submitted to atrial branch occlusion. All voltage and impedance recordings were performed with a stable contact tip-catheter force between 10 and 20 g.

### 2.2.3 Anatomopathology

The explanted hearts of the 7 pigs with atrial coronary branch occlusion were cleaned from blood and fixed in buffered formalin. The atria were separated at the vestibule level of the ventricles and embedded in a paraffin block. Sections ( $12\ \mu\text{m}$ ) of the entire left atrium were mounted and serially sectioned frontally in  $12\ \mu\text{m}$  slices, and then stained with Masson's trichrome (Figure 1C). Morphometric study was performed to evaluate the average extent of atrial fibrosis. In brief, digital images were taken of the sections stained with Masson's and the areas of fibrosis were delimited in the sections of maximum extent of infarcted area using ImageJ software. (Schneider et al., 2012) The areas of fibrosis were expressed as a percentage of the entire limits of the sectioned atria. The identification of the areas of fibrosis was done by two expert anatomopathologists under direct visualization of the histologic preparation at proper magnification. We also calculated the mapping-derived voltage and impedance scar-areas (excluding pulmonary veins) using the software of the electroanatomic mapping system.

## 2.3 Statistical analysis

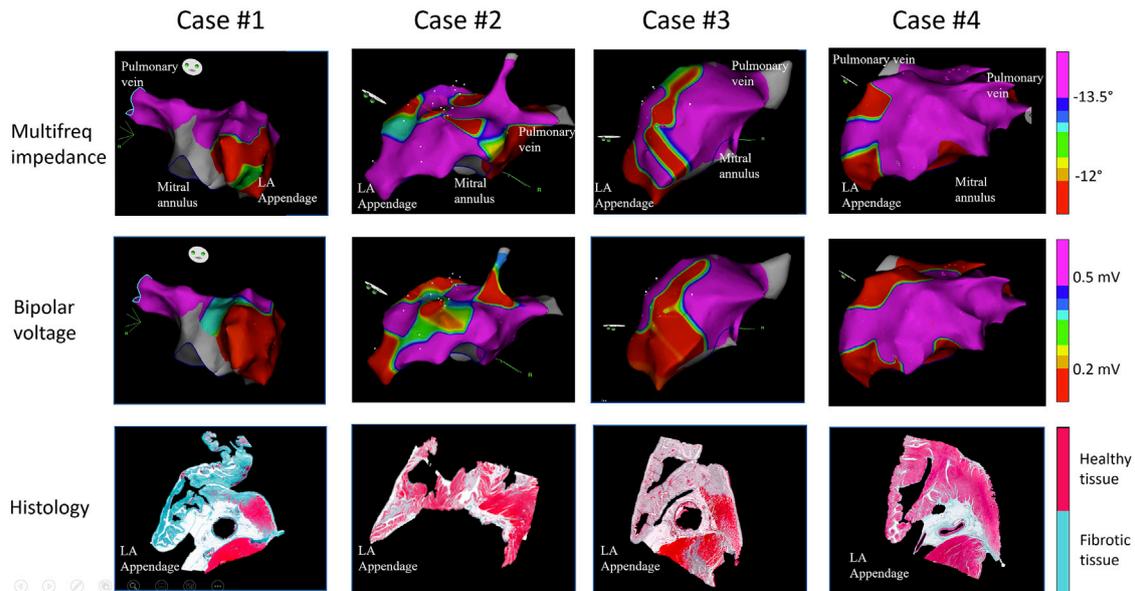
Quantitative data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). The degree of variation of the bipolar voltage and impedance magnitude values was assessed by the coefficient of variation (ratio of the standard deviation and its corresponding mean value). The ordinary two-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparison correction was used to assess the statistical significance of changes in bipolar voltages, impedance magnitude and phase angle at different current frequencies, and ST-segment displacement. A  $p$ -value  $<.05$  was considered significant. All analyses were performed using SPSS v.22.0 software (IBM-SPSS, United States).

## 3 Results

Nine pigs were included in the study. Occlusion of the LCX atrial branches was performed in 7 cases. Among the latter, 6 completed the entire protocol and one pig was lost during anesthesia induction in the 6-week second intervention, though its heart was included in the anatomopathological study. Two pigs non-submitted to atrial branch occlusion were used for the endocardial mapping studies.

### 3.1 Anatomopathological findings

We observed areas of necrosis with collagen deposition in the left atrium in 6 out of the 7 pigs (86%) submitted to atrial branch occlusion. Histological analysis ruled out the presence of areas of



**FIGURE 2**

Electroanatomical voltage and multifrequency impedance maps of the left atrium and histological preparations of the explanted hearts of four representative pigs submitted to acute transcatheter occlusion of the atrial coronary artery branches arising from the proximal segment of the left circumflex coronary artery, with preserved left ventricular myocardium. The figure shows a correspondence between endocardial areas of low voltage and impedance and location of infarct zones.

ventricular myocardial infarction (Figure 1). In addition, at the time of stent implantation, close monitoring of the 15 lead ECG in all the animals did not show ST segment changes secondary to acute ventricular myocardial ischemia (lead II:  $.00 \pm .02$  mV at baseline vs.  $.00 \pm .03$  mV after 30 min vs.  $-.02 \pm .02$  mV after 6 weeks, both  $p = ns$ ). Figure 1C is a microphotograph of a pig showing areas of fibrosis affecting the left atrial appendage while preserving left ventricular myocardium. The morphometric analysis of the sections showing the greatest infarct extent in the 6 pigs revealed a mean area of fibrosis of about 38% (range 17%–66%) of the entire microscopic field.

### 3.2 Voltage and impedance derived scar areas of the left atrium

Figure 2 illustrates representative electroanatomical maps of four pigs submitted to atrial coronary branch occlusion. These show areas of low-multifrequency impedance and low-voltage bipolar electrograms in correspondence with atrial anatomical regions affected by the infarction, as observed in the histology sections. The impedance derived scar areas were significantly smaller than the voltage derived scar areas (impedance vs. voltage derived scar area:  $31 \pm 12$  cm<sup>2</sup> vs.  $50 \pm 26$  cm<sup>2</sup>;  $p < .05$ ). Further electroanatomical mapping analysis of the peri-infarct areas by lowering the voltage scar definition revealed that voltage derived scar areas with a voltage  $<.1$  mV improved the overlap with impedance derived scar areas with a phase angle at 307 kHz lower than  $-12^\circ$ . The remaining non-infarcted atrial zones depicted greater voltage and impedance values, but these were lower than those observed in two control pigs not submitted to atrial branch occlusion (Table 1).

### 3.3 Myocardial electrical impedance of the left atrium

Figure 3 shows the bipolar and multifrequency impedance signals in comparable anatomical regions of the left atrium in a pig with occluded atrial coronary branches and in a control pig with non-occluded atrial coronary branches. As shown in Figure 4, the atrial zones affected by the infarction (IZ) showed lower values of the impedance magnitude than non-affected regions (NZ) at all current frequencies. Likewise, the IZ zones showed less negative values of the phase angle at all current frequencies (Table 2). The current frequency range that better discriminated affected and non-affected infarct regions was 1–253 kHz for the impedance magnitude and 200–1,000 kHz for the impedance phase angle. The coefficient of variation of the impedance magnitude was lower than the coefficient of variation of the bipolar voltage in both affected and non-affected infarction regions (coefficient of variation for impedance magnitude at 1,000 kHz vs. bipolar voltage:  $.30$  vs.  $.77$ ). This can be also observed in Figure 5, where the variability of median values in phase angle of atrial tissue electrical impedance at 307 kHz was lower than the variability of the median values of bipolar voltage.

## 4 Discussion

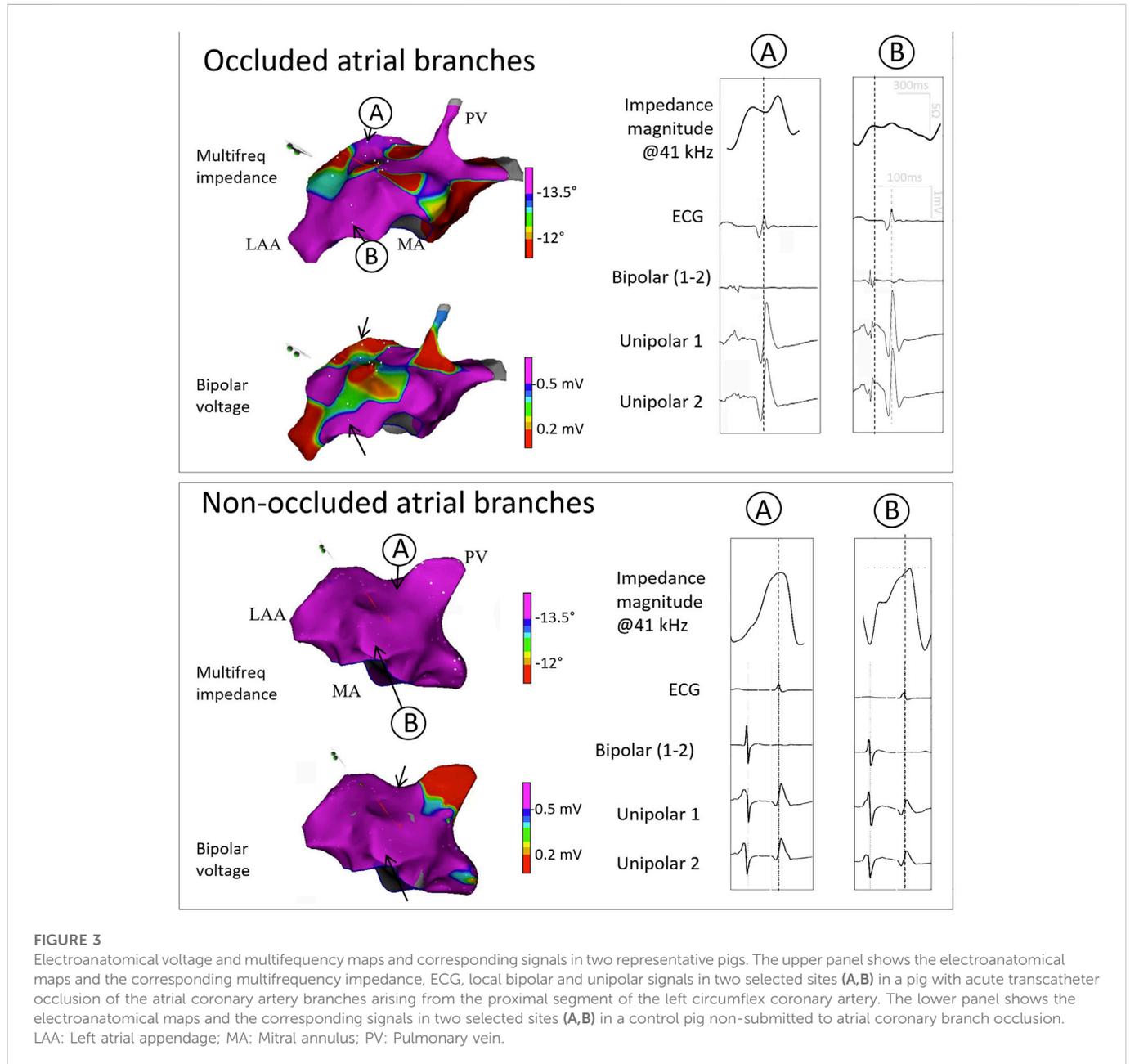
### 4.1 Main findings

This study shows that myocardial infarction restricted to the atrial chambers can be successfully induced by selective transcatheter occlusion of atrial coronary branches in swine. In this closed-chest model, healed atrial MI was associated with decreased magnitude and phase angle of myocardial impedance at all studied frequencies. Impedance data variability was lower than bipolar voltage values.

**TABLE 1 Voltage of local left atrial bipolar electrograms in pigs with and without atrial coronary artery branch occlusion.**

	Atrial areas with a bipolar voltage cutoff <.5 mV	Atrial areas with a bipolar voltage cutoff ≥.5 mV
Pigs with occluded atrial branches	.2 ± .1 mV (N = 66)	1.9 ± 1.5 mV (N = 75)
Pigs with non-occluded atrial branches	Not found	3.2 ± 2.2 mV (N = 16)

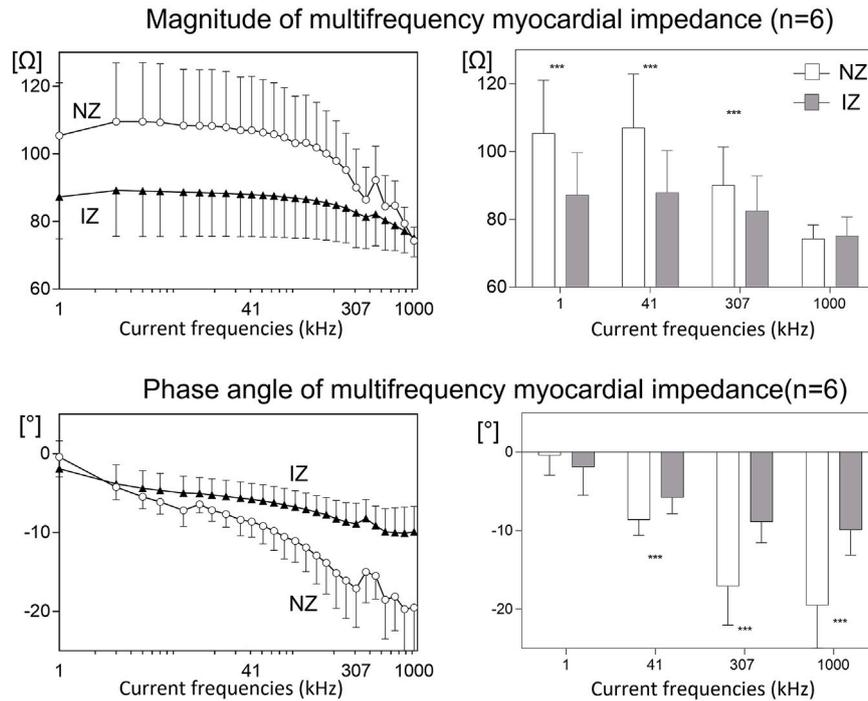
\*\* ANOVA  $p < .01$  between areas with a bipolar voltage cutoff lower or higher than .5 mV.



### 4.2 Local electrophysiological findings

Left atrial electroanatomical mapping evidenced areas of low voltage of the local electrograms and decreased multifrequency tissue impedance. Post infarct fibrosis is the most likely substrate for these electrophysiologic alterations since left atrial mapping in 2 control pigs not submitted to atrial branch occlusion evidenced

normal voltage of electrograms and impedance in similar anatomical atrial regions. Moreover, the infarcted areas observed in the histological preparations shared a correspondence with the anatomical atrial regions showing low voltage electrograms and reduced impedance. A delayed and heterogeneous local activation inside the ischemic atrial myocardium has been reported in dogs after acute or 8-days old occlusion of atrial coronary branches arising from



**FIGURE 4**

Mean values of the impedance magnitude and phase angle at multifrequency in 6 pigs submitted to acute transcatheter occlusion of the atrial coronary artery branches arising from the proximal segment of the left circumflex coronary artery. The left panels show the mean changes in atrial myocardial impedance magnitude (upper) and phase angle (lower) at 26 studied current frequencies. The right panels show the mean changes in atrial myocardial impedance magnitude (upper) and phase angle (lower) at four selected current frequencies. NZ: normal zone; IZ: infarcted zone; \*\*\*: ANOVA  $p < .001$  between myocardial impedance NZ and IZ areas.

**TABLE 2 Magnitude of the atrial myocardial impedance at 1 kHz in pigs with and without atrial coronary artery branch occlusion.**

	Atrial areas with a phase angle cutoff $< -12^\circ$	Atrial areas with a phase angle cutoff $\geq -12^\circ$
Pigs with occluded atrial branches	87.3 ± 12.4 Ω (N = 53)	105.4 ± 15.6 Ω (***) (N = 88)
Pigs with non-occluded atrial branches	Not found	119.7 ± 5.5 Ω (N = 16)

\*\*, ANOVA  $p < .001$  between areas with a phase angle cutoff lower or higher than  $-12^\circ$ .

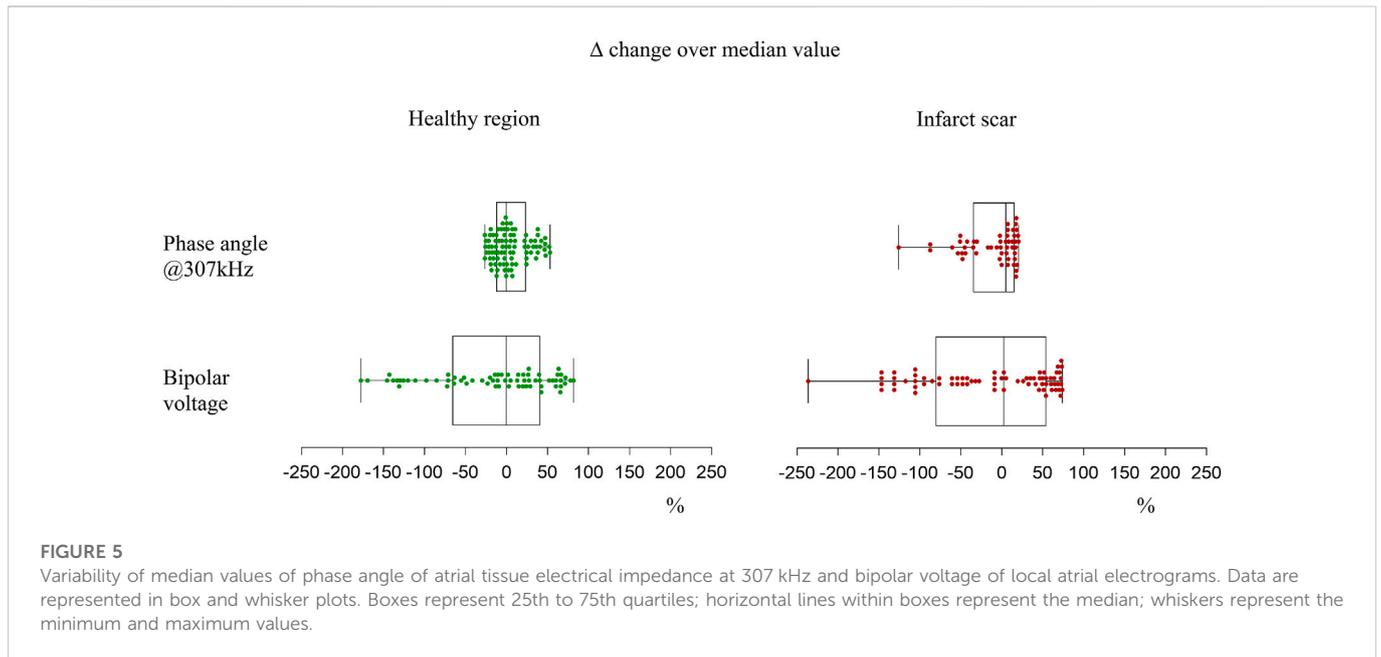
the RCA, (Sinno et al., 2003; Nishida et al., 2011), in sheep after acute occlusion of the LCX, (Alasady et al., 2013), and in pigs with submitted to surgical clamping of atrial branches arising from the LCX. (Amorós-Figueras et al., 2020)

The present study addressed the healing phase of atrial infarct and revealed, for the first time, that the low voltage areas also presented low tissue electrical impedance at all current frequencies. Comparable low-voltage and low-impedance findings were found in pigs with 1-month old ventricular myocardial infarction induced by occlusion of the LAD coronary artery (Amoros-Figueras et al., 2018) thus revealing that both, healed atrial and ventricular myocardial infarction share a similar electrophysiologic substrate. We also found that impedance phase angle values presented less variability than bipolar voltage values, for both healthy and infarct scar regions. This finding, as well as the observation that impedance derived scar areas were significantly smaller than classic voltage derived scar areas ( $<.5$  mV), suggest a more accurate assessment of atrial infarct scar by bioimpedance measurement which, in contrast to voltage mapping, are not dependent on the direction the atrial activation front.

(Amorós-figueras et al., 2017) The arrhythmogenic potential of this substrate has been consistently documented in clinical and experimental ventricular myocardial infarction. (Guandalini et al., 2019) However, spontaneous atrial ectopic arrhythmias rarely occurred in experimental atrial infarction, though susceptibility to electrical induction and of atrial fibrillation (AF) has been reported. (Sinno et al., 2003) In our study, vulnerability to electrically induced atrial arrhythmias was not tested.

### 4.3 Anatomopathology

The characteristic structural features of healed atrial infarction in our model were the irregular distribution of the necrotic areas and the sharp delineation of the infarcted border zone. The left atrial appendage was more frequently affected, and the ventricular myocardium was preserved, indicating that deployment of a covered Papyrus stent in the proximal segment of the LCX was a successful method to create a model of isolated atrial myocardial ischemia.



#### 4.4 Study limitations

The mean values of the bipolar electrograms and myocardial impedance in atrial areas not affected by the infarction in pigs with occluded coronary branches were lower than those recorded in the healthy atria in pigs with non-occluded coronary atrial branches. This could reflect an electrotonic effect of the infarcted tissue over the neighboring normal zones, or the existence of a non-transmural distribution of the infarct fibrosis over the endocardial non-affected zones.

Due to the individual anatomical variability in the distribution of atrial coronary branches and to their rich inter-anastomotic network, the atrial infarct resulting from the deployment of the covered stent in the proximal segment of the LCX coronary artery was of variable size and location. However, the infarcted areas could be recognized on-line by local mapping of electrograms and local tissue impedance measurements. Spontaneous atrial arrhythmias are seldom in models of atrial infarction, though arrhythmia vulnerability to electrical stimulation can be successfully tested in these models. (Sinno et al., 2003; Nishida et al., 2011; Alasady et al., 2013). Moreover, an infarct healing period longer than that followed in our study (6 weeks) might be a more realistic substrate for spontaneous arrhythmia.

A close point-by-point merging analysis between the infarcted areas in the histological preparations and the regions of low-voltage in the endocardial mapping is challenged by the unpredictable magnitude of the changes in size and volume of the atria secondary to heart explantation and formaldehyde inclusion. A strict site-to-site correspondence of low-voltage electrograms and infarcted areas was not therefore performed in our model. However, we afforded evidence that regions with the low-voltage and low multifrequency impedance mainly corresponded with the areas with atrial infarct involvement.

#### 4.5 Clinical implications

In the present work we have mapped the endocardial regions of healthy and infarcted left atrium and found that the areas with low

voltage of electrograms depict greater range of variability than the multifrequency impedance values in the same areas. A likely explanation is that local multifrequency measurements explore the stable passive properties of the tissue while the endocardial voltage is affected by dynamic changes in the local activation front. Considering the similarities between human and swine cardiac ischemic electrophysiology, (Lelovas et al., 2014), a model of infarct atrial infarction like the developed in our study emerges as a reliable tool for further research on atrial electrophysiological mechanisms and development of atrial ablation techniques. A major goal for the success of electrical ablation of the arrhythmias is the accurate characterization of the target ablation structure. In this regard, recent studies have highlighted the advantages of the local measurement of tissue electrical impedance to achieve a better pulmonary vein isolation in the ablation of atrial arrhythmias. (Das et al., 2021; García-Bolao et al., 2022)

In these studies, only the magnitude component of the impedance was measured. In our study we have measured both, the magnitude and the phase angle components of the impedance at different frequencies. We have previously reported that multifrequency impedance mapping can detect different degrees of myocardial fibrosis (Amorós-figueras et al., 2016) and, remarkably, the impedance measurement will not be influenced by the changes in cardiac activation sequence. (Amorós-figueras et al., 2017)

#### Data availability statement

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

#### Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Comitè Ètica Experimentació Animal-IR Sant Pau.

## Author contributions

GA-F, SC-R, GC-S, DA, EJ, AG-O, YM, DS-Q, JR-F, JG, and JC have made substantial contributions to the conception and design of the work, have participated in the acquisition, analysis and interpretation of the data, have drafted the manuscript, have given the final approval of the version to be published and the agreement to be accountable of all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

## Funding

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (CB16/11/00276), FIS PI17/00069); and Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

## References

- Alasady, M., Shipp, N. J., Brooks, A. G., Lim, H. S., Lau, D. H., Barlow, D., et al. (2013). Myocardial infarction and atrial fibrillation: Importance of atrial ischemia. *Circulation Arrhythmia Electrophysiol.* 6 (4), 738–745. doi:10.1161/CIRCEP.113.000163
- Amorós-figueras, G., Jorge, E., García-Sánchez, T., Bragós, R., Rosell-Ferrer, J., and Cinca, J. (2016). Recognition of fibrotic infarct density by the pattern of local systolic-diastolic myocardial. *Electr. Impedance* 7. doi:10.3389/fphys.2016.00389
- Amorós-figueras, G., Jorge, E., Alonso-Martin, C., Traver, D., Ballesta, M., Bragos, R., et al. (2017). Endocardial infarct scar recognition by myocardial electrical impedance is not influenced by changes in cardiac activation sequence. *Heart rhythm.* 15 (4), 589–596. doi:10.1016/j.hrthm.2017.11.031
- Amorós-Figueras, G., Jorge, E., Alonso-Martin, C., Traver, D., Ballesta, M., Bragos, R., et al. (2018). Endocardial infarct scar recognition by myocardial electrical impedance is not influenced by changes in cardiac activation sequence. *Heart rhythm.* 15 (4), 589–596. doi:10.1016/j.hrthm.2017.11.031
- Amorós-Figueras, G., Rosello-Diez, E., Sanchez-Quintana, D., Casabella-Ramon, S., Jorge, E., Nevado-Medina, J., et al. (2020). Changes in local atrial electrograms and surface ECG induced by acute atrial myocardial infarction. *Front. Physiology* 11, 264. doi:10.3389/fphys.2020.00264
- Avula, U. M. R., Hernandez, J. J., Yamazaki, M., Valdivia, C. R., Chu, A., Rojas-Pena, A., et al. (2018). Atrial infarction-induced spontaneous focal discharges and atrial fibrillation in sheep role of dantrolene-sensitive aberrant ryanodine receptor calcium release. *Circulation Arrhythmia Electrophysiol.* 11 (3), e005659. doi:10.1161/CIRCEP.117.005659
- Das, M., Luik, A., Shepherd, E., Sulkin, M., Laughner, J., Oesterlein, T., et al. (2021). Local catheter impedance drop during pulmonary vein isolation predicts acute conduction block in patients with paroxysmal atrial fibrillation: Initial results of the LOCALIZE clinical trial. *Europace* Feb (7), 1042–1051. doi:10.1093/europace/euab004
- García-Bolao, I., Ramos, P., Luik, A., Sulkin, M. S., Gutbrod, S. R., and Oesterlein, T. (2022). Local impedance drop predicts durable conduction block in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *JACC Clin. Electrophysiol.* 8, 1–10. doi:10.1016/j.jacep.2022.01.009
- Guandalini, G. S., Liang, J. J., and Marchlinski, F. E. (2019). Ventricular tachycardia ablation: Past, present, and future perspectives. *JACC Clin. Electrophysiol.* 5 (12), 1363–1383. doi:10.1016/j.jacep.2019.09.015
- Hopman, L. H. G. A., Bhagirath, P., Mulder, M. J., Eggink, I. N., van Rossum, A. C., Allaart, C. P., et al. (2022). Quantification of left atrial fibrosis by 3D late gadolinium-enhanced cardiac magnetic resonance imaging in patients with atrial fibrillation: Impact of different analysis methods. *Eur. heart J. Cardiovasc. Imaging* 23 (9), 1182–1190. doi:10.1093/EHJCI/JEAB245
- Kottkamp, H., Schreiber, D., Moser, F., and Rieger, A. (2017). Therapeutic approaches to atrial fibrillation ablation targeting atrial fibrosis. *JACC Clin. Electrophysiol.* 3 (7), 643–653. doi:10.1016/J.JACEP.2017.05.009
- Lahuerta, A. A., Roberto, C., Saiz, F. J., Cano, O., Martínez-Mateu, L., Alonso, P., et al. (2022). Atrial low voltage areas: A comparison between atrial fibrillation and sinus rhythm. *Cardiol. J.* 29 (2), 252–262. doi:10.5603/CJ.A2021.0125
- Laish-Farkash, A., Perelshtein Brezinov, O., Valdman, A., Tam, D., Rahkovich, M., Kogan, Y., et al. (2021). Evaluation of left atrial remodeling by 2D-speckle-tracking echocardiography versus by high-density voltage mapping in patients with atrial fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 32 (2), 305–315. doi:10.1111/jce.14837
- Lelovas, P. P., Kostomitsopoulos, N. G., and Xanthos, T. T. (2014). A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *J. Am. Assoc. Laboratory Animal Sci. JAALAS* 53 (5), 432–438.
- Nishida, K., Qi, X. Y., Wakili, R., Comtois, P., Chartier, D., Harada, M., et al. (2011). Mechanisms of atrial tachyarrhythmias associated with coronary artery occlusion in a chronic canine model. *Circulation* 123 (2), 137–146. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972778
- Rivard, L., Sinno, H., Shiroshita-Takeshita, A., Schram, G., Leung, T. K., and Nattel, S. (2007). The pharmacological response of ischemia-related atrial fibrillation in dogs: Evidence for substrate-specific efficacy. *Cardiovasc. Res.* 74 (1), 104–113. doi:10.1016/j.cardiores.2007.01.018
- Sanchez, B., Louarroudi, E., Jorge, E., Cinca, J., Bragos, R., and Pintelon, R. (2013). A new measuring and identification approach for time-varying bioimpedance using multisine electrical, 339. doi:10.1088/0967-3334/34/3/339
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9 (797), 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Sinno, H., Derakhchan, K., Libersan, D., Merhi, Y., Leung, T. K., and Nattel, S. (2003). Atrial ischemia promotes atrial fibrillation in dogs. *Circulation* 107 (14), 1930–1936. doi:10.1161/01.CIR.0000058743.15215.03

## Conflict of interest

GA-F, EJ, JG, and JR-F received a research grant by the company Biosense-Webster. Biosense-Webster was not involved in the study design, collection, analysis, interpretation of data, the writing of this article, or the decision to submit it for publication.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## 4. DISCUSIÓN

Se sabe de la existencia de mecanismos que provocan la remodelación auricular y que contribuyen (solos o combinados) al desarrollo de la FA. Se ha avanzado mucho en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, el uso de fármacos antiarrítmicos y la ablación a través de catéter. Estos mecanismos se engloban en procesos de remodelación eléctrica, que incluyen cambios en el manejo del calcio, corrientes iónicas y conducción eléctrica; procesos de remodelación estructural como el aumento del tamaño de la aurícula y la fibrosis auricular; y procesos de remodelación del sistema nervioso autónomo como cambios en la densidad nerviosa autónoma (148). Se ha demostrado que tanto el sistema nervioso simpático como el parasimpático desempeñan un papel importante que contribuye a la FA. Los receptores adrenérgicos  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , localizados en el corazón, son los responsables de generar las acciones ionotrópicas, cronotrópicas y lusotrópicas cardíacas. Estos receptores acoplados a una proteína G transforman la señal neurohormonal autonómica a través de las proteínas G que actúan sobre los canales iónicos y las proteínas que regulen el metabolismo del segundo mensajero AMPc. Esta remodelación eléctrica inducida por el tono simpático contribuye a la aparición de FA (3), y es por eso que, los primeros dos capítulos de esta tesis se centran en el estudio de la modulación de la señalización por receptores  $\beta$ -adrenérgicos, para comprobar si pudieran ser una diana terapéutica para regular la homeostasis del calcio y procesos del remodelado eléctrico que se producen en la FA. Pero como ya hemos dicho, la remodelación eléctrica no es el único actor relevante en el desarrollo de esta enfermedad. La remodelación estructural auricular también se ha asociado a FA en los pacientes, al aumentar la vulnerabilidad del corazón a la inducción y el mantenimiento de la FA. En la remodelación estructural, la fibrosis promueve la FA ya que interrumpe la continuidad del haz de fibras, causando alteraciones en la conducción local (160). Pero también, la interacción entre cardiomiocitos y fibroblastos puede causar cambios arritmogénicos en la bioelectricidad de los cardiomiocitos (161). Además, esta misma enfermedad parece promover la fibrosis auricular (162), lo que contribuye de manera importante al fracaso terapéutico en pacientes que sufren esta enfermedad de manera prolongada (163). Por eso, los últimos dos capítulos se centran en el desarrollo de un modelo anatómico y electrofisiológico cercano al humano para estudiar la FA inducida por isquemia auricular, que conlleve tanto a una remodelación eléctrica como estructural.

## 4.1. SEÑALIZACIÓN $\beta$ -ADRENÉRGICO COMO DIANA PARA REGULAR PROCESOS DE REMODELADO ELÉCTRICO.

Al ser el sistema nervioso autónomo un actor importante en el inicio y el mantenimiento de la FA (2,3,6,117,164), donde la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos acoplados a proteínas G tiene un papel importante en la regulación del calcio, nos propusimos indagar sobre las repercusiones que tiene su manipulación en la homeostasis del calcio en pacientes con y sin FA. Aprovechando que los bloqueadores de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se usan comúnmente para el tratamiento, tanto de pacientes con arritmias auriculares como pacientes con otras enfermedades miocárdicas, nos planteamos realizar un estudio de las propiedades electrofisiológicas de los miocitos auriculares humanos, para determinar como el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes afecta a la homeostasis del calcio. Por ello, el estudio *“Beta-blocker treatment of patients with atrial fibrillation attenuates spontaneous calcium release-induced electrical activity”* tuvo como objetivo evaluar cómo el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes de los pacientes afecta la liberación espontánea de calcio y las corrientes en los miocitos auriculares aislados. Con el fin de determinar el impacto neto de este tratamiento en la homeostasis del calcio intracelular, se ha tenido en cuenta los factores de confusión de la enfermedad concurrente y otros factores clínicos relevantes. Para ello, analizamos 371 pacientes sometidos a cirugía cardíaca obteniendo miocitos del tejido de su aurícula derecha. Los dividimos en 4 grupos con o sin episodios informados de FA que recibieron, o no, tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes. En los miocitos auriculares vimos que el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes no modificaba la corriente de calcio tipo L (amplitud, activación o inactivación) en pacientes con o sin FA. En cambio, vimos que sí se reducía la incidencia de  $I_{TI}$  en pacientes con FA que recibieron tratamiento con estos antagonistas, a niveles observados en pacientes sin la arritmia auricular. La comparación de pacientes con FA paroxística y crónica mostró que la frecuencia de  $I_{TI}$  fue similar para los dos tipos de FA y que el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes redujo la frecuencia de  $I_{TI}$  a los niveles observados en pacientes sin FA. En cambio, la densidad del  $I_{Ca}$  no se vio afectada por el tratamiento con bloqueadores  $\beta$ , pero fue significativamente mayor en los pacientes con FA paroxística que permanente. Además, la amplitud del  $I_{TI}$  no se modificó con el tratamiento, lo que sugiere que el tratamiento no modifica la parte del calcio liberado espontáneamente que se elimina de

la célula mediante el intercambio electrogénico de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) y que da lugar al  $\text{I}_{\text{TI}}$ , al igual que no se modificó el contenido de calcio del RS liberado por cafeína. También se sabe que los pacientes con FA tienen una mayor incidencia de chispas de calcio y vimos que los pacientes tratados con  $\beta$ -bloqueantes tenían menos de estos eventos espontáneos.

Finalmente, para determinar si los efectos observados del tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes en la homeostasis del calcio del RS fueron causados por alteraciones en la fosforilación de las proteínas reguladoras del calcio, medimos la fosforilación de los RyR2 en el residuo Ser-2808, así como la fosforilación de PLB en Ser-16 y Thr-17. Vimos que la fosforilación de RyR2 en Ser-2808 no fue diferente entre los pacientes sin FA que recibieron o no  $\beta$ -bloqueantes. Sin embargo, la fosforilación de Ser-2808 fue significativamente mayor en pacientes con FA que no recibieron tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes que en pacientes con FA tratados.

Por lo tanto, este primer estudio demuestra como el tratamiento ambulatorio con  $\beta$ -bloqueantes afecta a la homeostasis del calcio intracelular en los miocitos auriculares de pacientes con y sin FA. Así mostramos que, en pacientes con FA, el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes reduce la fosforilación del RyR2 en Ser-2808; reduciendo así su activación espontánea y la incidencia de *calcium sparks* y de  $\text{I}_{\text{TI}}$  a los niveles que se observaron en los pacientes sin FA. Por lo consiguiente, los resultados indican que la terapia con  $\beta$ -bloqueantes puede prevenir la actividad eléctrica auricular inducida por la liberación espontánea de calcio. Además, nuestros resultados mostraron efectos diferenciales de diferentes  $\beta$ -bloqueantes. Así, la incidencia de *calcium sparks* y de  $\text{I}_{\text{TI}}$  solamente se redujo de forma significativa en los pacientes con FA tratados con los  $\beta$ -bloqueantes Bisoprolol o Carvedilol.

Por otro lado, cabe resaltar que el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes, aunque pueda prevenir la actividad eléctrica espontánea, no está exenta de efectos secundarios al inhibir el sistema nervioso simpático. Por ejemplo, el  $\beta$ -bloqueante Carvedilol se usa actualmente como una mezcla de los enantiómeros R y S (14,15,165) que tienen efectos diferenciales sobre los receptores  $\beta$  y la actividad de RyR2. Así, Zhang et al. 2015 (166) demostraron que R-Carvedilol suprime la taquicardia ventricular en ratones con la mutación RyR2 causante de taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (R4496C), mediante la modificación directa de la activación del RyR2 y sin disminuir la frecuencia cardíaca ni

la presión arterial. Es decir, sin causar los efectos secundarios derivados de la inhibición del sistema nervioso simpático.

Dado que Carvedilol, al contrario de otros  $\beta$ -bloqueantes comunes, también inhibe los receptores  $\beta_2$ , y que la estimulación  $\beta_2$ -adrenérgica de los cardiomiocitos de ratón imita las alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular observadas en pacientes con FA (167), el segundo estudio de esta tesis, titulado ***“impact of R-carvedilol on  $\beta_2$ -adrenergic receptor-mediated spontaneous calcium release in human atrial myocytes”***, tuvo como objetivo determinar el impacto de la estimulación  $\beta_2$ -adrenérgica en la homeostasis del calcio en miocitos auriculares humanos y compararlo con la estimulación con un agonista no selectivo como Isoproterenol. Además, el estudio también pretendía comparar la capacidad de los enantiómeros R- y S-Carvedilol para revertir los efectos de la estimulación  $\beta_2$ -adrenérgica sobre la liberación espontánea de calcio.

Para ello, analizamos miocitos auriculares humanos de 37 pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Para estudiar el impacto de la estimulación  $\beta_2$ -adrenérgica en la homeostasis del calcio intracelular en miocitos auriculares humanos utilizamos una dosis de saturación (3  $\mu$ M) del agonista selectivo de los receptores  $\beta_2$  Fenoterol, un fármaco que se ha asociado con un aumento de la tasa de mortalidad en pacientes asmáticos medicados con él (168,169). Observamos que este fármaco aumentó 8 veces la densidad de *calcium sparks*, tanto en la cantidad de sitios donde éstos se producían, como en su frecuencia, disminuyéndose la distancia entre *sparks*. Además, la masa de los *sparks* aumentó en 1.7 veces y al combinarse con la mayor densidad y menor distancia entre *sparks* facilita su fusión. De acuerdo con ello, Fenoterol aumentó 30 veces la incidencia de ondas de calcio o transitorios de calcio espontáneos. Por lo tanto, vimos que los cardiomiocitos de pacientes sin FA sometidos a 3  $\mu$ M de Fenoterol, imitaban las alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular observadas en miocitos auriculares de pacientes con FA. A continuación, investigamos si R-Carvedilol, que inhibe selectivamente la actividad de RyR2 sin afectar los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, puede revertir los efectos de Fenoterol sobre la homeostasis del calcio. Para ello, primero determinamos su capacidad para revertir los efectos de la estimulación con 3  $\mu$ M Fenoterol. Vimos que R-Carvedilol revirtió los efectos estimulantes del Fenoterol sobre la densidad de *calcium sparks* y el número de *sparks* por sitio de manera dependiente de la dosis, con valores IC<sub>50</sub> de 0,3 y 0,17  $\mu$ M, respectivamente y alcanzando niveles de control en 1  $\mu$ M R-Carvedilol.

Además, R-Carvedilol redujo la probabilidad de que los *sparks* coincidieran en el espacio y en el tiempo, reduciendo así la frecuencia de ondas y transitorios de calcio espontáneos. Todo esto sugiere que R-Carvedilol no sólo reduce la frecuencia de ondas de calcio espontáneas o transitorios, sino también la tasa de liberación de calcio y la cantidad de calcio liberado por evento, lo que, a su vez, debería disminuir tanto la frecuencia como la amplitud de las resultantes despolarizaciones de membrana.

Para determinar si R-Carvedilol inhibe selectivamente la actividad de RyR2 sin afectar los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, analizamos su capacidad para revertir la fosforilación de RyR2 inducida por la estimulación  $\beta$ -adrenérgica con Fenoterol a 3  $\mu$ M y compararlo con el efecto de S-Carvedilol, que sí afecta a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. El marcaje inmunofluorescente de RyR2 total y de RyR2 fosforilado con Ser-2808 en condiciones de control, tras la exposición a Fenoterol y la posterior exposición a diferentes concentraciones de R-Carvedilol mostró que, R-Carvedilol redujo significativamente y de forma dependiente de la dosis la fosforilación de RyR2 inducida por Fenoterol en Ser-2808. Además, la comparación de los enantiómeros R- y S-Carvedilol mostró que a 1  $\mu$ M de cualquiera de los dos, anulaba el efecto estimulador de Fenoterol 3  $\mu$ M en la fosforilación de Ser-2808, sugiriendo que 1  $\mu$ M R-Carvedilol sí afecta a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

Además, el hecho que la densidad de los sitios de *sparks* disminuyó abruptamente a 1  $\mu$ M R-Carvedilol sugiere que el R-Carvedilol, en esta concentración, podría afectar múltiples mecanismos simultáneamente. En este sentido, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se ubican en clústeres macromoleculares donde la distribución espacial de los que se encuentran asociados con RyR2 es diferente de la distribución de los asociados con PLB y SERCA2a (170,171). Por lo tanto, R-Carvedilol en concentraciones inferiores a 1  $\mu$ M podría regular principalmente la activación de RyR2. Pero, a concentraciones de 1  $\mu$ M o superiores, podría afectar tanto a la activación de RyR2, como a la fosforilación de PLB y a la actividad de SERCA, y al contenido de calcio del RS. Entonces, para determinar si los efectos observados del tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes en la homeostasis del calcio del RS fueron causados por alteraciones en la fosforilación de las proteínas reguladoras del calcio, medimos la fosforilación de PLB en Ser-16 y Thr-17. Vimos que la fosforilación de PLB en Ser-16 fue significativamente mayor en pacientes con FA que no recibieron tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes que en pacientes con FA tratados con  $\beta$ -bloqueantes.

Por lo tanto, Carvedilol o R-Carvedilol podría ser un fármaco más adecuado para el tratamiento de arritmias cardíacas que los bloqueadores  $\beta_1$  selectivos, cuando se producen condiciones fisiopatológicas que favorezcan una activación predominante de los receptores  $\beta_2$ .

## **4.2. DESARROLLO DE UN MODELO PORCINO DE ISQUEMIA AURICULAR PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DE ARRITMIAS AURICULARES.**

Dado que los mecanismos que acaban provocando una remodelación eléctrica de la aurícula son heterogéneos y complejos (148), se planteaba desarrollar un modelo experimental de gran relevancia clínica para estudiar mecanismos de remodelado eléctrico y estructural subyacentes al desarrollo de arritmias auriculares. En este sentido, se ha descrito la oclusión de una rama coronaria auricular como una entidad clínica común, difícilmente reconocible, que puede promover la FA (156). Además, hasta ahora no se han podido describir los cambios inducidos por la isquemia en los electrogramas auriculares locales y su repercusión en el ECG. Teniendo en cuenta que no existe un modelo animal de infarto de miocardio que sólo afecte a las aurículas, nos planteamos hacer un modelo porcino, con la anatomía y electrofisiología cardíaca cercana a la humana, para poder avanzar en la comprensión de los mecanismos subyacentes que intervienen en el inicio de esta enfermedad.

El desarrollo del modelo se produjo en dos etapas. En la primera etapa, nos propusimos analizar los efectos de la oclusión aguda selectiva de la rama auricular en la estructura miocárdica local, los electrogramas auriculares y el ECG de superficie. Para ello, en el estudio "*Change in local atrial electrograms and Surface ECG induced by acute atrial myocardial infaction*" utilizamos un total de siete cerdos sometidos durante 4 horas a la oclusión quirúrgica de una rama auricular, que surgiera de la arteria coronaria derecha. Se registraron simultáneamente los electrogramas auriculares y el ECG. Además, se hizo un animal control y se procesaron todos los corazones para analizarlos anatomopatológicamente.

Cabe decir que nuestro estudio a tórax abierto es el primer estudio donde se muestran los cambios surgidos en los electrogramas auriculares locales, resultantes de la oclusión

selectiva y aguda de una rama coronaria auricular y su correlación temporal con el ECG. Esta inducción de un infarto de miocardio auricular provocó cambios, que evolucionaron con el tiempo, de las ondas R/S, el segmento ST y la activación local. Estos cambios isquémicos en los electrogramas auriculares no se pudieron detectar en el ECG donde sólo se pudieron apreciar variaciones inespecíficas de la morfología de la onda P en etapas posteriores a la oclusión. Por lo tanto, este estudio demuestra porque el ECG de superficie no es útil para reconocer el IA. Además, la oclusión selectiva de la rama auricular no provocó cambios en el segmento ST en el ECG de superficie, lo que confirma la ausencia de isquemia miocárdica ventricular concurrente en nuestro modelo de IA a tórax abierto. Además, la oclusión de la rama coronaria auricular indujo degeneración y necrosis coagulativa de grupos de cardiomiocitos. La necrosis representaba una distribución "en parches" y mostraba desorden de fibras miocárdicas con infiltración celular. El infarto afectó regiones subendocárdicas de los músculos pectinados y englobó arteriolas pequeñas.

Este modelo de tórax abierto fue la base para la realización de un modelo de mayor relevancia traslacional de IA a tórax cerrado y además sugiere que, aunque la oclusión aguda de una rama auricular podría causar un IA, esta condición difícilmente sería reconocida por el ECG de superficie.

La segunda etapa en la generación de este modelo porcino se refleja en el estudio "*Electrophysiological and histological characterization of atrial scarring in a model of isolated atrial myocardial infarction*". Este estudio se realizó a tórax cerrado donde se ocluía una rama coronaria auricular en siete cerdos. Dos cerdos adicionales se usaron como controles para el mapeo de voltaje endocárdico y datos de impedancia multifrecuencia. En este estudio se demuestra que el infarto de miocardio delimitado a las cámaras auriculares puede inducirse con éxito mediante la oclusión transcáteter selectiva de ramas coronarias auriculares en cerdos. Además, este infarto de miocardio afecta a la orejuela auricular izquierda sin afectar al miocardio ventricular, ya que no se registró elevación del segmento ST en el ECG de superficie en ningún caso y el análisis histológico descartó la presencia de infarto ventricular. Esto indica que el despliegue de un *stent* cubierto de Papyrus en el segmento proximal de la arteria coronaria circunfleja izquierda (LCX) es un método exitoso para crear un modelo de isquemia miocárdica auricular aislado.

El mapeo electroanatómico de la aurícula izquierda evidenció áreas de bajo voltaje de los electrogramas locales y disminución de la impedancia tisular multifrecuencia. El sustrato más probable que podría explicar estas alteraciones electrofisiológicas es la fibrosis postinfarto. Además, en las preparaciones histológicas se observaban las áreas infartadas que correspondían con las regiones anatómicas auriculares con electrogramas de bajo voltaje e impedancia reducida. En otros modelos animales, se ha descrito una activación local heterogénea y retardada dentro del miocardio auricular isquémico en perros después de una oclusión aguda o de 8 días de antigüedad de las ramas coronarias auriculares que surgen del segmentos proximales de la coronaria derecha (24,158), en ovinos después de la oclusión aguda de la LCX (159), y en cerdos sometidos a pinzamiento quirúrgico de las ramas auriculares que surgen de la LCX (20).

Nuestro estudio abordó la fase de curación del IA y reveló, por primera vez, que las áreas de bajo voltaje también presentaban baja impedancia eléctrica tisular en todas las frecuencias de corriente. Estos hallazgos son comparables al bajo voltaje y baja impedancia observados en cerdos con infarto de miocardio ventricular de 1 mes de edad inducido por la oclusión de la arteria descendente anterior izquierda (172), lo que revela que tanto el infarto de miocardio auricular como el ventricular comparten un sustrato electrofisiológico similar. El potencial arritmogénico de este sustrato ha sido consistentemente documentado en infarto de miocardio ventricular clínico y experimental (173). Sin embargo, rara vez ocurrieron arritmias ectópicas auriculares espontáneas en el IA experimental, aunque se ha informado susceptibilidad a la inducción eléctrica y a la FA (24). Además, el infarto de miocardio conduce a trastornos hemodinámicos que dan como resultado un aumento de la presión-volumen en la aurícula izquierda, lo que conduce a un estiramiento miocárdico de la cámara. Este estiramiento proporciona un sustrato arritmogénico, como se observa con frecuencia en pacientes con infarto agudo de miocardio. En un estudio con cerdos donde se les indujo un infarto de miocardio para provocar un aumento de la presión intraauricular, vieron que al disminuir la sobrecarga de la aurícula izquierda se disminuía la inducibilidad a las arritmias (147). En nuestro estudio, no se probó la vulnerabilidad a las arritmias auriculares inducidas eléctricamente ni medimos la presión intraauricular. Este último parámetro, podría ser importante valorar en el futuro ya que el estiramiento auricular en este contexto podría tener un papel importante en el inicio y mantenimiento de la FA. Además, aunque las arritmias auriculares espontáneas son raras en los modelos de IA, un período de curación del infarto

más largo que el seguido en nuestro estudio (6 semanas) podría ser un sustrato más realista para el desarrollo de la arritmia espontánea. Además, existen datos no publicados generados a partir de la implantación de un holter a estos animales, donde en uno de los 7 animales sí se observó episodios de FA, reforzando la utilidad de nuestro modelo para estudios traslacionales.

### **4.3. PERSPECTIVAS FUTURAS**

El modelo de FA porcino más común utiliza una taquicardia auricular como desencadenante del inicio de la remodelación auricular. Sin embargo, se puede generar una taquicardiomiopatía, que es rara en humanos (148). En cambio, se sabe que la isquemia miocárdica es la causa más común de FA, afectando entre un 6 a un 21% de los pacientes que desarrollan esta enfermedad después de un infarto de miocardio (174). Por ello, nuestro modelo de IA aislado, que genera procesos de remodelación auricular similares a los que se encuentran en pacientes, se presenta como un modelo idóneo para estudios traslacionales del desarrollo del remodelado y arritmias, inducidos por la isquemia miocárdica (147,148) que sólo afecta a nivel auricular. Además, también se abre un abanico de posibilidades para el estudio de la repercusión de la obstrucción accidental de ramas auriculares en los diferentes procedimientos quirúrgicos, como se vio en un estudio en pacientes (156) que sufrían una oclusión selectiva de la arteria coronaria auricular durante la angioplastia coronaria transluminal percutánea electiva. Este estudio asocia el daño isquémico miocárdico con arritmias auriculares y del retraso de la conducción intraauricular, llegando a la conclusión de que los episodios isquémicos auriculares podrían considerarse una causa potencial de FA en pacientes con enfermedad arterial coronaria crónica. Además, un ensayo clínico de 336 pacientes con factores de riesgo de accidente cerebrovascular y sometidos a cirugía cardíaca, les monitorizaron el ritmo cardíaco de forma continua y se vio que la incidencia de FA en estos pacientes fue de un 17.9% más alta, dentro de los primeros 30 días posteriores al alta hospitalaria, que los registrados habitualmente (175).

Nuestro modelo también podría utilizarse para probar terapias farmacológicas como los bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, para probar su utilidad para atenuar la aparición de FA en pacientes sometidos a cirugía cardíaca, ya que la prevalencia de esta enfermedad dentro del primer mes es alta. Este modelo también se podría utilizar para estudiar los aspectos temporales del desarrollo de la remodelación estructural y eléctrica auricular, o para

estudiar episodios arrítmicos inducidos por el pico de adenosina que se produce durante la isquemia auricular (176), además del potencial terapéutico de fármacos que inhiben los receptores de adenosina  $A_2A$  o que favorecen la activación de los receptores de adenosina  $A_1$  o  $A_3$ , ya que atenuarían la actividad ectópica auricular inducida por adenosina (177).

## 5. CONCLUSIONES

- El tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes puede ser de utilidad terapéutica para prevenir la actividad eléctrica auricular inducida por la liberación espontánea de calcio; especialmente en pacientes con antecedentes de FA paroxística que muestran una densidad del  $I_{Ca}$  conservada.
- La estimulación  $\beta_2$ -adrenérgica aumenta la incidencia de *sparks* y ondas de calcio a los niveles observados con los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos no específicos, lo que subraya la relevancia de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos para promover la liberación espontánea de calcio en los miocitos auriculares humanos. Además, el enantiómero R-Carvedilol puede revertir estos efectos de manera dependiente de la dosis, estableciendo una base fisiológica para probar la capacidad de este  $\beta$ -bloqueante para revertir la liberación arritmogénica de calcio en pacientes con FA u otras arritmias cardíacas asociada con la activación del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico.
- La oclusión selectiva de la rama auricular induce un infarto auricular parcheado y cambios característicos en la activación auricular, la onda R/S y el segmento ST que no son perceptibles en el ECG. Solo se apreciaron cambios indirectos en la amplitud y duración de la onda P en estadios avanzados de oclusión coronaria aguda.
- La oclusión selectiva de ramas coronarias auriculares permite establecer un modelo de infarto auricular selectivo, teniendo una aplicabilidad potencial en el estudio de los mecanismos de arritmia auricular.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2002 May;54(2):230-46. doi: 10.1016/s0008-6363(02)00258-4. PMID: 12062329.
2. Chen PS, Chen LS, Fishbein MC, Lin SF, Nattel S. Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy. *Circ Res.* 2014 Apr 25;114(9):1500-15. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303772. PMID: 24763467; PMCID: PMC4043633.
3. Arora R. Recent insights into the role of the autonomic nervous system in the creation of substrate for atrial fibrillation: implications for therapies targeting the atrial autonomic nervous system. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012 Aug 1;5(4):850-9. doi: 10.1161/CIRCEP.112.972273. PMID: 22895601; PMCID: PMC3607318.
4. Nguyen BL, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS, Masroor S. Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans. *Heart Rhythm.* 2009 Apr;6(4):454-60. doi: 10.1016/j.hrthm.2009.01.010. Epub 2009 Jan 16. PMID: 19324302; PMCID: PMC2662134.
5. Gould PA, Yui M, McLean C, Finch S, Marshall T, Lambert GW, Kaye DM. Evidence for increased atrial sympathetic innervation in persistent human atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2006 Aug;29(8):821-9. doi: 10.1111/j.1540-8159.2006.00447.x. PMID: 16922997.
6. Pfenniger A, Arora R. Beyond beta-blockers: targeting the sympathetic nervous system for the prevention and treatment of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2019 Dec 1;115(14):1940-1942. doi: 10.1093/cvr/cvz254. PMID: 31687741.
7. Reiken S, Wehrens XH, Vest JA, Barbone A, Klotz S, Mancini D, Burkhoff D, Marks AR. Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation.* 2003 May 20;107(19):2459-66. doi: 10.1161/01.CIR.0000068316.53218.49. Epub 2003 May 12. PMID: 12743001.
8. Nattel S, Dobrev D. The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Eur Heart J.* 2012 Aug;33(15):1870-7. doi: 10.1093/eurheartj/ehs079. Epub 2012 Apr 16. PMID: 22507975.
9. Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest.* 2011 Aug;121(8):2955-68. doi: 10.1172/JCI46315. Epub 2011 Aug 1. PMID: 21804195; PMCID: PMC3148739.
10. Vest JA, Wehrens XH, Reiken SR, Lehnart SE, Dobrev D, Chandra P, Danilo P, Ravens U, Rosen MR, Marks AR. Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation. *Circulation.* 2005 Apr 26;111(16):2025-32. doi: 10.1161/01.CIR.0000162461.67140.4C. PMID: 15851612.
11. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS. CaMKII-dependent diastolic SR Ca<sup>2+</sup> leak and elevated diastolic Ca<sup>2+</sup> levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res.* 2010 Apr 2;106(6):1134-44. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.203836. Epub 2010 Jan 7. PMID: 20056922.

12. Dobrev D, Voigt N, Wehrens XH. The ryanodine receptor channel as a molecular motif in atrial fibrillation: pathophysiological and therapeutic implications. *Cardiovasc Res.* 2011 Mar 1;89(4):734-43. doi: 10.1093/cvr/cvq324. Epub 2010 Oct 12. PMID: 20943673; PMCID: PMC3039246.
13. Llach A, Molina CE, Prat-Vidal C, Fernandes J, Casadó V, Ciruela F, Lluís C, Franco R, Cinca J, Hove-Madsen L. Abnormal calcium handling in atrial fibrillation is linked to up-regulation of adenosine A2A receptors. *Eur Heart J.* 2011 Mar;32(6):721-9. doi: 10.1093/eurheartj/ehq464. Epub 2010 Dec 22. PMID: 21177700.
14. Zhou Q, Xiao J, Jiang D, Wang R, Vembaiyan K, Wang A, Smith CD, Xie C, Chen W, Zhang J, Tian X, Jones PP, Zhong X, Guo A, Chen H, Zhang L, Zhu W, Yang D, Li X, Chen J, Gillis AM, Duff HJ, Cheng H, Feldman AM, Song LS, Fill M, Back TG, Chen SR. Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release. *Nat Med.* 2011 Jul 10;17(8):1003-9. doi: 10.1038/nm.2406. PMID: 21743453; PMCID: PMC3268079.
15. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, Sun Q, Wieland T, Ravens U, Nattel S, Wehrens XH, Dobrev D. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak and increased Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation.* 2012 May 1;125(17):2059-70. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067306. Epub 2012 Mar 28. PMID: 22456474; PMCID: PMC4663993.
16. Crick SJ, Sheppard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH. Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. *J Anat.* 1998 Jul;193 ( Pt 1)(Pt 1):105-19. doi: 10.1046/j.1469-7580.1998.19310105.x. PMID: 9758141; PMCID: PMC1467827.
17. Lu ML, De Venecia T, Patnaik S, Figueredo VM. Atrial myocardial infarction: A tale of the forgotten chamber. *Int J Cardiol.* 2016 Jan 1;202:904-9. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.10.070. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26485186.
18. Rivard L, Sinno H, Shiroshita-Takeshita A, Schram G, Leung TK, Nattel S. The pharmacological response of ischemia-related atrial fibrillation in dogs: evidence for substrate-specific efficacy. *Cardiovasc Res.* 2007 Apr 1;74(1):104-13. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.01.018. Epub 2007 Jan 27. PMID: 17316585.
19. Nishida K, Qi XY, Wakili R, Comtois P, Chartier D, Harada M, Iwasaki YK, Romeo P, Maguy A, Dobrev D, Michael G, Talajic M, Nattel S. Mechanisms of atrial tachyarrhythmias associated with coronary artery occlusion in a chronic canine model. *Circulation.* 2011 Jan 18;123(2):137-46. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972778. Epub 2011 Jan 3. PMID: 21200008..
20. Amorós-Figueras G, Roselló-Diez E, Sanchez-Quintana D, Casabella-Ramon S, Jorge E, Nevado-Medina J, Arzamendi D, Millán X, Alonso-Martin C, Guerra JM, Cinca J. Changes in Local Atrial Electrograms and Surface ECG Induced by Acute Atrial Myocardial Infarction. *Front Physiol.* 2020 Apr 17;11:264. doi: 10.3389/fphys.2020.00264. PMID: 32362831; PMCID: PMC7180211.
21. Varró A, Tomek J, Nagy N, Virág L, Passini E, Rodriguez B, Baczkó I. Cardiac transmembrane ion channels and action potentials: cellular physiology and arrhythmogenic behavior. *Physiol Rev.* 2021 Jul 1;101(3):1083-1176. doi: 10.1152/physrev.00024.2019. Epub 2020 Oct 29. PMID: 33118864.

22. Sagris M, Vardas EP, Theofilis P, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Tousoulis D. Atrial Fibrillation: Pathogenesis, Predisposing Factors, and Genetics. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 21;23(1):6. doi: 10.3390/ijms23010006. PMID: 35008432; PMCID: PMC8744894.
23. Nattel S, Heijman J, Zhou L, Dobrev D. Molecular Basis of Atrial Fibrillation Pathophysiology and Therapy: A Translational Perspective. *Circ Res.* 2020 Jun 19;127(1):51-72. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316363. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32717172; PMCID: PMC7398486.
24. Sinno H, Derakhchan K, Libersan D, Merhi Y, Leung TK, Nattel S. Atrial ischemia promotes atrial fibrillation in dogs. *Circulation.* 2003 Apr 15;107(14):1930-6. doi: 10.1161/01.CIR.0000058743.15215.03. Epub 2003 Mar 31. PMID: 12668526.
25. Schüttler D, Bapat A, Käab S, Lee K, Tomsits P, Clauss S, Hucker WJ. Animal Models of Atrial Fibrillation. *Circ Res.* 2020 Jun 19;127(1):91-110. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316366. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32716814.
26. Patuzzi R. The Goldman-Hodgkin-Katz equation and graphical 'load-line' analysis of ionic flow through outer hair cells. *Hear Res.* 1998 Nov;125(1-2):71-97. doi: 10.1016/s0378-5955(98)00124-5. PMID: 9833963.
27. Schmitt N, Grunnet M, Olesen SP. Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol Rev.* 2014 Apr;94(2):609-53. doi: 10.1152/physrev.00022.2013. PMID: 24692356.
28. Bartos DC, Grandi E, Ripplinger CM. Ion Channels in the Heart. *Compr Physiol.* 2015 Jul 1;5(3):1423-64. doi: 10.1002/cphy.c140069. PMID: 26140724; PMCID: PMC4516287.
29. Jiang D, Shi H, Tonggu L, Gamal El-Din TM, Lenaeus MJ, Zhao Y, Yoshioka C, Zheng N, Catterall WA. Structure of the Cardiac Sodium Channel. *Cell.* 2020 Jan 9;180(1):122-134.e10. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.041. Epub 2019 Dec 19. PMID: 31866066; PMCID: PMC6986426.
30. Bocchi L, Vassalle M. Characterization of the slowly inactivating sodium current  $I_{Na2}$  in canine cardiac single Purkinje cells. *Exp Physiol.* 2008 Mar;93(3):347-61. doi: 10.1113/expphysiol.2007.040881. Epub 2007 Nov 9. PMID: 17993508.
31. Tan HL, Kupersmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AA, Anderson ME, Balsler JR. A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature.* 2002 Jan 24;415(6870):442-7. doi: 10.1038/415442a. PMID: 11807557.
32. Maltsev VA, Reznikov V, Undrovinas NA, Sabbah HN, Undrovinas A. Modulation of late sodium current by  $Ca^{2+}$ , calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Apr;294(4):H1597-608. doi: 10.1152/ajpheart.00484.2007. Epub 2008 Jan 18. PMID: 18203851; PMCID: PMC2376056.
33. Patel SP, Campbell DL. Transient outward potassium current, 'I<sub>to</sub>', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol.* 2005 Nov 15;569(Pt 1):7-39. doi: 10.1113/jphysiol.2005.086223. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15831535; PMCID: PMC1464208.
34. Virág L, Jost N, Papp R, Koncz I, Kristóf A, Kohajda Z, Harmati G, Carbonell-Pascual B, Ferrero JM Jr, Papp JG, Nánási PP, Varró A. Analysis of the contribution of I<sub>(to)</sub> to

- repolarization in canine ventricular myocardium. *Br J Pharmacol.* 2011 Sep;164(1):93-105. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01331.x. PMID: 21410683; PMCID: PMC3171863.
35. van der Heyden MA, Wijnhoven TJ, Ophhof T. Molecular aspects of adrenergic modulation of the transient outward current. *Cardiovasc Res.* 2006 Aug 1;71(3):430-42. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.04.012. Epub 2006 Apr 27. PMID: 16762331.
  36. Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol.* 2007 Jul 15;582(Pt 2):675-93. doi: 10.1113/jphysiol.2006.126714. Epub 2007 May 3. PMID: 17478540; PMCID: PMC2075332.
  37. Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, Wegener JW. L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev.* 2014 Jan;94(1):303-26. doi: 10.1152/physrev.00016.2013. PMID: 24382889.
  38. Ruepp MD, Brozik JA, de Esch IJ, Farndale RW, Murrell-Lagnado RD, Thompson AJ. A fluorescent approach for identifying P2X1 ligands. *Neuropharmacology.* 2015 Nov;98:13-21. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.05.016. Epub 2015 May 28. PMID: 26026951; PMCID: PMC4728187.
  39. Buraei Z, Yang J. The  $\beta$  subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Physiol Rev.* 2010 Oct;90(4):1461-506. doi: 10.1152/physrev.00057.2009. PMID: 20959621; PMCID: PMC4353500.
  40. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:23-49. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455. PMID: 17988210.
  41. Mesirca P, Torrente AG, Mangoni ME. Functional role of voltage gated Ca(2+) channels in heart automaticity. *Front Physiol.* 2015 Feb 2;6:19. doi: 10.3389/fphys.2015.00019. PMID: 25698974; PMCID: PMC4313592.
  42. Kokubun S, Irisawa H. Effects of various intracellular Ca ion concentrations on the calcium current of guinea-pig single ventricular cells. *Jpn J Physiol.* 1984;34(4):599-611. doi: 10.2170/jjphysiol.34.599. PMID: 6094895.
  43. Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack BA. Multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca(2+)-induced enhancement of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res.* 1994 Nov;75(5):854-61. doi: 10.1161/01.res.75.5.854. PMID: 7923631.
  44. Bers DM, Morotti S. Ca(2+) current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences. *Front Pharmacol.* 2014 Jun 17;5:144. doi: 10.3389/fphar.2014.00144. PMID: 24987371; PMCID: PMC4060732.
  45. Liu G, Papa A, Katchman AN, Zakharov SI, Roybal D, Hennessey JA, Kushner J, Yang L, Chen BX, Kushnir A, Dargas K, Gygi SP, Pitt GS, Colecraft HM, Ben-Johny M, Kalocsay M, Marx SO. Mechanism of adrenergic Cav1.2 stimulation revealed by proximity proteomics. *Nature.* 2020 Jan;577(7792):695-700. doi: 10.1038/s41586-020-1947-z. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31969708; PMCID: PMC7018383.
  46. Bohn G, Moosmang S, Conrad H, Ludwig A, Hofmann F, Klugbauer N. Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett.* 2000 Sep 8;481(1):73-6. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01979-7. PMID: 10984618.

47. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev.* 2005 Oct;85(4):1205-53. doi: 10.1152/physrev.00002.2005. PMID: 16183911.
48. Jost N, Virág L, Bitay M, Takács J, Lengyel C, Biliczki P, Nagy Z, Bogáts G, Lathrop DA, Papp JG, Varró A. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for IKs in human ventricular muscle. *Circulation.* 2005 Sep 6;112(10):1392-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.550111. Epub 2005 Aug 29. PMID: 16129791.
49. Jost N, Papp JG, Varró A. Slow delayed rectifier potassium current (IKs) and the repolarization reserve. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2007 Jan;12(1):64-78. doi: 10.1111/j.1542-474X.2007.00140.x. PMID: 17286653; PMCID: PMC6931982.
50. Virág L, Jost N, Opincariu M, Szolnoky J, Szécsi J, Bogáts G, Szenohradszky P, Varró A, Papp JG. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 2001 Mar;49(4):790-7. doi: 10.1016/s0008-6363(00)00306-0. PMID: 11230978.
51. Han W, Wang Z, Nattel S. Slow delayed rectifier current and repolarization in canine cardiac Purkinje cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Mar;280(3):H1075-80. doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.3.H1075. PMID: 11179049.
52. Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, Anumonwo JM. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res.* 2004 May 28;94(10):1332-9. doi: 10.1161/01.RES.0000128408.66946.67. Epub 2004 Apr 15. PMID: 15087421.
53. Nerbonne JM. Molecular Basis of Functional Myocardial Potassium Channel Diversity. *Card Electrophysiol Clin.* 2016 Jun;8(2):257-73. doi: 10.1016/j.ccep.2016.01.001. Epub 2016 Mar 24. PMID: 27261820; PMCID: PMC4893780.
54. Nattel S. The molecular and ionic specificity of antiarrhythmic drug actions. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1999 Feb;10(2):272-82. doi: 10.1111/j.1540-8167.1999.tb00673.x. PMID: 10090234.
55. Schmitt N, Grunnet M, Olesen SP. Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol Rev.* 2014 Apr;94(2):609-53. doi: 10.1152/physrev.00022.2013. PMID: 24692356.
56. Skibsbye L, Poulet C, Diness JG, Bentzen BH, Yuan L, Kappert U, Matschke K, Wettwer E, Ravens U, Grunnet M, Christ T, Jespersen T. Small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atria. *Cardiovasc Res.* 2014 Jul 1;103(1):156-67. doi: 10.1093/cvr/cvu121. Epub 2014 May 9. PMID: 24817686.
57. Brown BM, Shim H, Christophersen P, Wulff H. Pharmacology of Small- and Intermediate-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2020 Jan 6;60:219-240. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010919-023420. Epub 2019 Jul 23. PMID: 31337271; PMCID: PMC9615427.
58. Bueno-Orovio A, Sánchez C, Pueyo E, Rodriguez B. Na/K pump regulation of cardiac repolarization: insights from a systems biology approach. *Pflugers Arch.* 2014 Feb;466(2):183-93. doi: 10.1007/s00424-013-1293-1. Epub 2013 May 15. PMID: 23674099.

59. Shattock MJ, Ottolia M, Bers DM, Blaustein MP, Boguslavskiy A, Bossuyt J, Bridge JH, Chen-Izu Y, Clancy CE, Edwards A, Goldhaber J, Kaplan J, Lingrel JB, Pavlovic D, Philipson K, Sipido KR, Xie ZJ. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the heart. *J Physiol*. 2015 Mar 15;593(6):1361-82. doi: 10.1113/jphysiol.2014.282319. PMID: 25772291; PMCID: PMC4376416.
60. Stein WD. Energetics and the design principles of the Na/K-ATPase. *J Theor Biol*. 1990 Nov 21;147(2):145-59. doi: 10.1016/s0022-5193(05)80049-9. PMID: 2177514.
61. Despa S, Bers DM. Functional analysis of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase isoform distribution in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Jul;293(1):C321-7. doi: 10.1152/ajpcell.00597.2006. Epub 2007 Mar 28. PMID: 17392375.
62. Bossuyt J, Despa S, Han F, Hou Z, Robia SL, Lingrel JB, Bers DM. Isoform specificity of the Na/K-ATPase association and regulation by phospholemman. *J Biol Chem*. 2009 Sep 25;284(39):26749-57. doi: 10.1074/jbc.M109.047357. Epub 2009 Jul 28. PMID: 19638348; PMCID: PMC2785363.
63. Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev*. 1999 Jul;79(3):917-1017. doi: 10.1152/physrev.1999.79.3.917. PMID: 10390520.
64. Nicoll DA, Quednau BD, Qui Z, Xia YR, Lusis AJ, Philipson KD. Cloning of a third mammalian Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCX3. *J Biol Chem*. 1996 Oct 4;271(40):24914-21. doi: 10.1074/jbc.271.40.24914. PMID: 8798769.
65. Ren X, Philipson KD. The topology of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCX1. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Apr;57:68-71. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.010. Epub 2013 Jan 31. PMID: 23376057; PMCID: PMC3593740.
66. Khananshvili D. The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX) - structure, function, and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr-Jun;34(2-3):220-35. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.003. PMID: 23506867.
67. Szerencsei RT, Kinjo TG, Schnetkamp PP. The topology of the C-terminal sections of the NCX1 Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchanger and the NCKX2 Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup>-K<sup>(+)</sup> exchanger. *Channels (Austin)*. 2013 Mar-Apr;7(2):109-14. doi: 10.4161/chan.23898. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23511010; PMCID: PMC3667879.
68. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res*. 2017 Jul 7;121(2):181-195. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310230. PMID: 28684623; PMCID: PMC5497788.
69. Li GR, Nattel S. Demonstration of an inward Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange current in adult human atrial myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Apr 15;779:525-8. doi: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb44827.x. PMID: 8659869.
70. Sher AA, Noble PJ, Hinch R, Gavaghan DJ, Noble D. The role of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers in Ca<sup>2+</sup> dynamics in ventricular myocytes. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008 Jan-Apr;96(1-3):377-98. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2007.07.018. Epub 2007 Aug 11. PMID: 17959231.
71. Bers DM, Weber CR. Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov;976:500-12. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04784.x. PMID: 12502604.

72. Nagy N, Kormos A, Kohajda Z, Szebeni Á, Szepesi J, Pollesello P, Levijoki J, Acsai K, Virág L, Nánási PP, Papp JG, Varró A, Tóth A. Selective Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchanger inhibition prevents Ca<sup>(2+)</sup> overload-induced triggered arrhythmias. *Br J Pharmacol*. 2014 Dec;171(24):5665-81. doi: 10.1111/bph.12867. PMID: 25073832; PMCID: PMC4290709.
73. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res*. 2010 Feb 19;106(3):434-46. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208041. PMID: 20167941.
74. Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Osuna L, Almendral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol*. 2010 May 25;55(21):2346-54. doi: 10.1016/j.jacc.2010.02.028. PMID: 20488306.
75. Felipe A, Knittle TJ, Doyle KL, Tamkun MM. Primary structure and differential expression during development and pregnancy of a novel voltage-gated sodium channel in the mouse. *J Biol Chem*. 1994 Dec 2;269(48):30125-31. PMID: 7982916.
76. Hocini M, Ho SY, Kawara T, Linnenbank AC, Potse M, Shah D, Jaïs P, Janse MJ, Haïssaguerre M, De Bakker JM. Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation. *Circulation*. 2002 May 21;105(20):2442-8. doi: 10.1161/01.cir.0000016062.80020.11. PMID: 12021234.
77. Chen YJ, Chen SA, Chen YC, Yeh HI, Chan P, Chang MS, Lin CI. Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: implication in initiation of atrial fibrillation. *Circulation*. 2001 Dec 4;104(23):2849-54. doi: 10.1161/hc4801.099736. PMID: 11733406.
78. Liu J, Noble PJ, Xiao G, Abdelrahman M, Dobrzynski H, Boyett MR, Lei M, Noble D. Role of pacemaking current in cardiac nodes: insights from a comparative study of sinoatrial node and atrioventricular node. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008 Jan-Apr;96(1-3):294-304. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2007.07.009. Epub 2007 Aug 10. PMID: 17905415.
79. Temple IP, Inada S, Dobrzynski H, Boyett MR. Connexins and the atrioventricular node. *Heart Rhythm*. 2013 Feb;10(2):297-304. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.10.020. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23085482; PMCID: PMC3572393.
80. Boyden PA. Purkinje physiology and pathophysiology. *J Interv Card Electrophysiol*. 2018 Aug;52(3):255-262. doi: 10.1007/s10840-018-0414-3. Epub 2018 Jul 28. PMID: 30056516.
81. Han W, Bao W, Wang Z, Nattel S. Comparison of ion-channel subunit expression in canine cardiac Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ Res*. 2002 Nov 1;91(9):790-7. doi: 10.1161/01.res.0000039534.18114.d9. PMID: 12411393.
82. Cordeiro JM, Zeina T, Goodrow R, Kaplan AD, Thomas LM, Nesterenko VV, Treat JA, Hawel L 3rd, Byus C, Bett GC, Rasmusson RL, Panama BK. Regional variation of the inwardly rectifying potassium current in the canine heart and the contributions to differences in action potential repolarization. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Jul;84:52-60. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.010. Epub 2015 Apr 15. PMID: 25889894; PMCID: PMC4468020.

83. Zaza A, Belardinelli L, Shryock JC. Pathophysiology and pharmacology of the cardiac "late sodium current.". *Pharmacol Ther.* 2008 Sep;119(3):326-39. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.06.001. Epub 2008 Jul 1. PMID: 18662720.
84. Temple IP, Inada S, Dobrzynski H, Boyett MR. Connexins and the atrioventricular node. *Heart Rhythm.* 2013 Feb;10(2):297-304. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.10.020. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23085482; PMCID: PMC3572393.
85. Sweeney HL, Hammers DW. Muscle Contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Feb 1;10(2):a023200. doi: 10.1101/cshperspect.a023200. PMID: 29419405; PMCID: PMC5793755.
86. Sweeney HL, Holzbaur ELF. Motor Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 May 1;10(5):a021931. doi: 10.1101/cshperspect.a021931. PMID: 29716949; PMCID: PMC5932582.
87. Pollard TD. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 Aug 1;8(8):a018226. doi: 10.1101/cshperspect.a018226. PMID: 26988969; PMCID: PMC4968159.
88. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res.* 2017 Jul 7;121(2):181-195. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310230. PMID: 28684623; PMCID: PMC5497788.
89. Soeller C, Cannell MB. Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circ Res.* 1999 Feb 19;84(3):266-75. doi: 10.1161/01.res.84.3.266. PMID: 10024300.
90. Hayashi T, Martone ME, Yu Z, Thor A, Doi M, Holst MJ, Ellisman MH, Hoshijima M. Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca<sup>2+</sup> signaling in the heart. *J Cell Sci.* 2009 Apr 1;122(Pt 7):1005-13. doi: 10.1242/jcs.028175. PMID: 19295127; PMCID: PMC2720931.
91. Cook SJ, Chamunorwa JP, Lancaster MK, O'Neill SC. Regional differences in the regulation of intracellular sodium and in action potential configuration in rabbit left ventricle. *Pflugers Arch.* 1997 Feb;433(4):515-22. doi: 10.1007/s004240050307. PMID: 9000431.
92. Shannon TR, Guo T, Bers DM. Ca<sup>2+</sup> scraps: local depletions of free [Ca<sup>2+</sup>] in cardiac sarcoplasmic reticulum during contractions leave substantial Ca<sup>2+</sup> reserve. *Circ Res.* 2003 Jul 11;93(1):40-5. doi: 10.1161/01.RES.0000079967.11815.19. Epub 2003 Jun 5. PMID: 12791706.
93. Fabiato A. Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol.* 1985 Feb;85(2):291-320. doi: 10.1085/jgp.85.2.291. PMID: 2580044; PMCID: PMC2215798.
94. Zalk R, Clarke OB, des Georges A, Grassucci RA, Reiken S, Mancina F, Hendrickson WA, Frank J, Marks AR. Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature.* 2015 Jan 1;517(7532):44-9. doi: 10.1038/nature13950. Epub 2014 Dec 1. PMID: 25470061; PMCID: PMC4300236.
95. Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb*

- Perspect Biol. 2010 Nov;2(11):a003996. doi: 10.1101/cshperspect.a003996. Epub 2010 Oct 20. PMID: 20961976; PMCID: PMC2964179.
96. Fearnley CJ, Roderick HL, Bootman MD. Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Nov 1;3(11):a004242. doi: 10.1101/cshperspect.a004242. PMID: 21875987; PMCID: PMC3220352.
  97. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 2002 Nov-Dec;32(5-6):235-49. doi: 10.1016/s0143416002001823. PMID: 12543086.
  98. Qin J, Valle G, Nani A, Nori A, Rizzi N, Priori SG, Volpe P, Fill M. Luminal Ca<sup>2+</sup> regulation of single cardiac ryanodine receptors: insights provided by calsequestrin and its mutants. *J Gen Physiol.* 2008 Apr;131(4):325-34. doi: 10.1085/jgp.200709907. Epub 2008 Mar 17. PMID: 18347081; PMCID: PMC2279168.
  99. Wei J, Yao J, Belke D, Guo W, Zhong X, Sun B, Wang R, Paul Estillore J, Vallmitjana A, Benitez R, Hove-Madsen L, Alvarez-Lacalle E, Echebarria B, Chen SRW. Ca<sup>2+</sup>-CaM Dependent Inactivation of RyR2 Underlies Ca<sup>2+</sup> Alternans in Intact Heart. *Circ Res.* 2021 Feb 19;128(4):e63-e83. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.318429. Epub 2020 Dec 30. PMID: 33375811.
  100. Maier LS, Bers DM. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007 Mar 1;73(4):631-40. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.11.005. Epub 2006 Nov 10. PMID: 17157285.
  101. Lokuta AJ, Meyers MB, Sander PR, Fishman GI, Valdivia HH. Modulation of cardiac ryanodine receptors by sorcin. *J Biol Chem.* 1997 Oct 3;272(40):25333-8. doi: 10.1074/jbc.272.40.25333. PMID: 9312152.
  102. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 2002 Jan 10;415(6868):219-26. doi: 10.1038/415219a. PMID: 11805846.
  103. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, Roseblit N, Marks AR. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol.* 2001 May 14;153(4):699-708. doi: 10.1083/jcb.153.4.699. PMID: 11352932; PMCID: PMC2192391.
  104. Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1491-545. doi: 10.1152/physrev.00030.2007. PMID: 18923188.
  105. Zygmunt AC, Goodrow RJ, Weigel CM. INaCa and ICl(Ca) contribute to isoproterenol-induced delayed after depolarizations in midmyocardial cells. *Am J Physiol.* 1998 Dec;275(6):H1979-92. doi: 10.1152/ajpheart.1998.275.6.H1979. PMID: 9843796.
  106. Priori SG, Chen SR. Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling and arrhythmogenesis. *Circ Res.* 2011 Apr 1;108(7):871-83. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226845. PMID: 21454795; PMCID: PMC3085083.
  107. Dridi H, Kushnir A, Zalk R, Yuan Q, Melville Z, Marks AR. Intracellular calcium leak in heart failure and atrial fibrillation: a unifying mechanism and therapeutic target. *Nat Rev Cardiol.* 2020 Nov;17(11):732-747. doi: 10.1038/s41569-020-0394-8. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32555383; PMCID: PMC8362847.
  108. Writing Group Members; January CT, Wann LS, Calkins H, Chen LY, Cigarroa JE, Cleveland JC Jr, Ellinor PT, Ezekowitz MD, Field ME, Furie KL, Heidenreich PA,

- Murray KT, Shea JB, Tracy CM, Yancy CW. 2019 AHA/ACC/HRS focused update of the 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Heart Rhythm*. 2019 Aug;16(8):e66-e93. doi: 10.1016/j.hrthm.2019.01.024. Epub 2019 Jan 28. PMID: 30703530.
109. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim YH, McAnulty JH Jr, Zheng ZJ, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJ. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 2014 Feb 25;129(8):837-47. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005119. Epub 2013 Dec 17. PMID: 24345399; PMCID: PMC4151302.
  110. Schartner V, Laporte J, Böhm J. Abnormal Excitation-Contraction Coupling and Calcium Homeostasis in Myopathies and Cardiomyopathies. *J Neuromuscul Dis*. 2019;6(3):289-305. doi: 10.3233/JND-180314. PMID: 31356215.
  111. MacLennan DH, Chen SR. Store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release as a triggering mechanism for CPVT and MH episodes caused by mutations in RYR and CASQ genes. *J Physiol*. 2009 Jul 1;587(Pt 13):3113-5. doi: 10.1113/jphysiol.2009.172155. PMID: 19567749; PMCID: PMC2727021.
  112. Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest*. 2011 Aug;121(8):2955-68. doi: 10.1172/JCI46315. Epub 2011 Aug 1. PMID: 21804195; PMCID: PMC3148739.
  113. Ardell JL. The cardiac neuronal hierarchy and susceptibility to arrhythmias. *Heart Rhythm*. 2011 Apr;8(4):590-1. doi: 10.1016/j.hrthm.2010.12.019. Epub 2010 Dec 16. PMID: 21167959; PMCID: PMC3629697.
  114. Kawashima T. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution. *Anat Embryol (Berl)*. 2005 Jul;209(6):425-38. doi: 10.1007/s00429-005-0462-1. Epub 2005 May 11. PMID: 15887046.
  115. Pagé PL, Dandan N, Savard P, Nadeau R, Armour JA, Cardinal R. Regional distribution of atrial electrical changes induced by stimulation of extracardiac and intracardiac neural elements. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995 Feb;109(2):377-88. doi: 10.1016/S0022-5223(95)70400-0. PMID: 7853890.
  116. Han S, Kobayashi K, Joung B, Piccirillo G, Maruyama M, Vinters HV, March K, Lin SF, Shen C, Fishbein MC, Chen PS, Chen LS. Electroanatomic remodeling of the left stellate ganglion after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Mar 6;59(10):954-61. doi: 10.1016/j.jacc.2011.11.030. PMID: 22381432; PMCID: PMC3975658.
  117. Nattel S, Dobrev D. The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Eur Heart J*. 2012 Aug;33(15):1870-7. doi: 10.1093/eurheartj/ehs079. Epub 2012 Apr 16. PMID: 22507975.
  118. Yeh YH, Wakili R, Qi XY, Chartier D, Boknik P, Kääh S, Ravens U, Coutu P, Dobrev D, Nattel S. Calcium-handling abnormalities underlying atrial arrhythmogenesis and contractile dysfunction in dogs with congestive heart failure. *Circ Arrhythm*

- Electrophysiol. 2008 Jun 1;1(2):93-102. doi: 10.1161/CIRCEP.107.754788. Epub 2008 Apr 30. PMID: 19808399.
119. Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res.* 2013 Aug 30;113(6):739-53. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300308. Erratum in: *Circ Res.* 2016 Aug 5;119(4):e38. PMID: 23989716; PMCID: PMC3843360.
  120. Oberhauser V, Schwertfeger E, Rutz T, Beyersdorf F, Rump LC. Acetylcholine release in human heart atrium: influence of muscarinic autoreceptors, diabetes, and age. *Circulation.* 2001 Mar 27;103(12):1638-43. doi: 10.1161/01.cir.103.12.1638. PMID: 11273990.
  121. Patterson E, Jackman WM, Beckman KJ, Lazzara R, Lockwood D, Scherlag BJ, Wu R, Po S. Spontaneous pulmonary vein firing in man: relationship to tachycardia-pause early afterdepolarizations and triggered arrhythmia in canine pulmonary veins in vitro. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2007 Sep;18(10):1067-75. doi: 10.1111/j.1540-8167.2007.00909.x. Epub 2007 Jul 26. PMID: 17655663.
  122. Scherlag BJ, Patterson E, Po SS. The neural basis of atrial fibrillation. *J Electrocardiol.* 2006 Oct;39(4 Suppl):S180-3. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2006.05.021. Epub 2006 Aug 21. PMID: 16920142.
  123. Andrade J, Khairy P, Dobrev D, Nattel S. The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circ Res.* 2014 Apr 25;114(9):1453-68. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303211. PMID: 24763464.
  124. Spencer TM, Blumenstein RF, Pryse KM, Lee SL, Glaubke DA, Carlson BE, Elson EL, Genin GM. Fibroblasts Slow Conduction Velocity in a Reconstituted Tissue Model of Fibrotic Cardiomyopathy. *ACS Biomater Sci Eng.* 2017 Nov 13;3(11):3022-3028. doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00576. Epub 2016 Oct 18. PMID: 31119190; PMCID: PMC6527425.
  125. Ozcan C, Battaglia E, Young R, Suzuki G. LKB1 knockout mouse develops spontaneous atrial fibrillation and provides mechanistic insights into human disease process. *J Am Heart Assoc.* 2015 Mar 15;4(3):e001733. doi: 10.1161/JAHA.114.001733. PMID: 25773299; PMCID: PMC4392447.
  126. Yao C, Veleva T, Scott L Jr, Cao S, Li L, Chen G, Jeyabal P, Pan X, Alsina KM, Abu-Taha I Dr, Ghezelbash S, Reynolds CL, Shen YH, LeMaire SA, Schmitz W, Müller FU, El-Armouche A, Tony Eissa N, Beeton C, Nattel S, Wehrens XHT, Dobrev D, Li N. Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling Promotes Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2018 Nov 13;138(20):2227-2242. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035202. Erratum in: *Circulation.* 2019 Apr 23;139(17):e889. PMID: 29802206; PMCID: PMC6252285.
  127. Huang H, Darbar D. Genetic heterogeneity of atrial fibrillation susceptibility loci across racial or ethnic groups. *Eur Heart J.* 2017 Sep 7;38(34):2595-2598. doi: 10.1093/eurheartj/ehx289. PMID: 28637342; PMCID: PMC5837825.
  128. Lau DH, Shipp NJ, Kelly DJ, Thanigaimani S, Neo M, Kuklik P, Lim HS, Zhang Y, Drury K, Wong CX, Chia NH, Brooks AG, Dimitri H, Saint DA, Brown L, Sanders P. Atrial arrhythmia in ageing spontaneously hypertensive rats: unraveling the substrate in

- hypertension and ageing. *PLoS One*. 2013 Aug 27;8(8):e72416. doi: 10.1371/journal.pone.0072416. PMID: 24013508; PMCID: PMC3754972.
129. Kaese S, Verheule S. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front Physiol*. 2012 Sep 5;3:345. doi: 10.3389/fphys.2012.00345. PMID: 22973235; PMCID: PMC3433738.
  130. Qu Z. Critical mass hypothesis revisited: role of dynamical wave stability in spontaneous termination of cardiac fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jan;290(1):H255-63. doi: 10.1152/ajpheart.00668.2005. Epub 2005 Aug 19. PMID: 16113075; PMCID: PMC3644506.
  131. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*. 1995 Oct 1;92(7):1954-68. doi: 10.1161/01.cir.92.7.1954. PMID: 7671380.
  132. Verheule S, Tuyls E, Gharaviri A, Hulsmans S, van Hunnik A, Kuiper M, Serroyen J, Zeemering S, Kuijpers NH, Schotten U. Loss of continuity in the thin epicardial layer because of endomysial fibrosis increases the complexity of atrial fibrillatory conduction. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013 Feb;6(1):202-11. doi: 10.1161/CIRCEP.112.975144. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23390124.
  133. Verheule S, Tuyls E, van Hunnik A, Kuiper M, Schotten U, Allessie M. Fibrillatory conduction in the atrial free walls of goats in persistent and permanent atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2010 Dec;3(6):590-9. doi: 10.1161/CIRCEP.109.931634. Epub 2010 Oct 11. PMID: 20937721.
  134. Eckstein J, Maesen B, Linz D, Zeemering S, van Hunnik A, Verheule S, Allessie M, Schotten U. Time course and mechanisms of endo-epicardial electrical dissociation during atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res*. 2011 Mar 1;89(4):816-24. doi: 10.1093/cvr/cvq336. Epub 2010 Oct 26. PMID: 20978006.
  135. Eckstein J, Zeemering S, Linz D, Maesen B, Verheule S, van Hunnik A, Crijns H, Allessie MA, Schotten U. Transmural conduction is the predominant mechanism of breakthrough during atrial fibrillation: evidence from simultaneous endo-epicardial high-density activation mapping. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013 Apr;6(2):334-41. doi: 10.1161/CIRCEP.113.000342. Epub 2013 Mar 19. PMID: 23512204.
  136. Greiser M, Neuberger HR, Harks E, El-Armouche A, Boknik P, de Haan S, Verheyen F, Verheule S, Schmitz W, Ravens U, Nattel S, Allessie MA, Dobrev D, Schotten U. Distinct contractile and molecular differences between two goat models of atrial dysfunction: AV block-induced atrial dilatation and atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol*. 2009 Mar;46(3):385-94. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.11.012. Epub 2008 Nov 27. PMID: 19100271.
  137. Keene BW, Atkins CE, Bonagura JD, Fox PR, Häggström J, Fuentes VL, Oyama MA, Rush JE, Stepien R, Uechi M. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med*. 2019 May;33(3):1127-1140. doi: 10.1111/jvim.15488. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30974015; PMCID: PMC6524084.
  138. Pariaut R. Atrial Fibrillation: Current Therapies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2017 Sep;47(5):977-988. doi: 10.1016/j.cvsm.2017.04.002. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28645513.

139. Gerstenfeld EP, Lavi N, Bazan V, Gojraty S, Kim SJ, Michele J. Mechanism of complex fractionated electrograms recorded during atrial fibrillation in a canine model. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2011 Jul;34(7):844-57. doi: 10.1111/j.1540-8159.2011.03071.x. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21418250.
140. Ishii Y, Schuessler RB, Gaynor SL, Yamada K, Fu AS, Boineau JP, Damiano RJ Jr. Inflammation of atrium after cardiac surgery is associated with inhomogeneity of atrial conduction and atrial fibrillation. *Circulation.* 2005 Jun 7;111(22):2881-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.475194. Epub 2005 May 31. PMID: 15927979.
141. Anné W, Willems R, Holemans P, Beckers F, Roskams T, Lenaerts I, Ector H, Heidbüchel H. Self-terminating AF depends on electrical remodeling while persistent AF depends on additional structural changes in a rapid atrially paced sheep model. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Aug;43(2):148-58. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.05.010. Epub 2007 May 21. PMID: 17597147.
142. Takemoto Y, Ramirez RJ, Yokokawa M, Kaur K, Ponce-Balbuena D, Sinno MC, Willis BC, Ghanbari H, Ennis SR, Guerrero-Serna G, Henzi BC, Latchamsetty R, Ramos-Mondragon R, Musa H, Martins RP, Pandit SV, Noujaim SF, Crawford T, Jongnarangsin K, Pelosi F, Bogun F, Chugh A, Berenfeld O, Morady F, Oral H, Jalife J. Galectin-3 Regulates Atrial Fibrillation Remodeling and Predicts Catheter Ablation Outcomes. *JACC Basic Transl Sci.* 2016 Apr;1(3):143-154. doi: 10.1016/j.jacbts.2016.03.003. PMID: 27525318; PMCID: PMC4979747.
143. Quintanilla JG, Alfonso-Almazán JM, Pérez-Castellano N, Pandit SV, Jalife J, Pérez-Villacastín J, Filgueiras-Rama D. Instantaneous Amplitude and Frequency Modulations Detect the Footprint of Rotational Activity and Reveal Stable Driver Regions as Targets for Persistent Atrial Fibrillation Ablation. *Circ Res.* 2019 Aug 30;125(6):609-627. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314930. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31366278; PMCID: PMC6735936.
144. Avula UMR, Hernandez JJ, Yamazaki M, Valdivia CR, Chu A, Rojas-Pena A, Kaur K, Ramos-Mondragón R, Anumonwo JM, Nattel S, Valdivia HH, Kalifa J. Atrial Infarction-Induced Spontaneous Focal Discharges and Atrial Fibrillation in Sheep: Role of Dantrolene-Sensitive Aberrant Ryanodine Receptor Calcium Release. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2018 Mar;11(3):e005659. doi: 10.1161/CIRCEP.117.005659. PMID: 29540372; PMCID: PMC6554725.
145. Lugenbiel P, Wenz F, Govorov K, Schweizer PA, Katus HA, Thomas D. Atrial fibrillation complicated by heart failure induces distinct remodeling of calcium cycling proteins. *PLoS One.* 2015 Mar 16;10(3):e0116395. doi: 10.1371/journal.pone.0116395. PMID: 25775120; PMCID: PMC4361185.
146. Schwarzl M, Alogna A, Zweiker D, Verderber J, Huber S, Manninger M, Scherr D, Antoons G, Pieske BM, Post H, Lueger A. A porcine model of early atrial fibrillation using a custom-built, radio transmission-controlled pacemaker. *J Electrocardiol.* 2016 Mar-Apr;49(2):124-31. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2015.12.012. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26803554.
147. Ishikawa K, Watanabe S, Lee P, Akar FG, Lee A, Bikou O, Fish K, Kho C, Hajjar RJ. Acute Left Ventricular Unloading Reduces Atrial Stretch and Inhibits Atrial Arrhythmias. *J Am Coll Cardiol.* 2018 Aug 14;72(7):738-750. doi: 10.1016/j.jacc.2018.05.059. PMID: 30092950; PMCID: PMC6160394.

148. Clauss S, Schüttler D, Bleyer C, Vlcek J, Shakarami M, Tomsits P, Schneider S, Maderspacher F, Chataut K, Trebo A, Wang C, Kleeberger J, Xia R, Baloch E, Hildebrand B, Massberg S, Wakili R, Käab S. Characterization of a porcine model of atrial arrhythmogenicity in the context of ischaemic heart failure. *PLoS One*. 2020 May 4;15(5):e0232374. doi: 10.1371/journal.pone.0232374. PMID: 32365085; PMCID: PMC7197782.
149. Park DS, Cerrone M, Morley G, Vasquez C, Fowler S, Liu N, Bernstein SA, Liu FY, Zhang J, Rogers CS, Priori SG, Chinitz LA, Fishman GI. Genetically engineered SCN5A mutant pig hearts exhibit conduction defects and arrhythmias. *J Clin Invest*. 2015 Jan;125(1):403-12. doi: 10.1172/JCI76919. Epub 2014 Dec 15. PMID: 25500882; PMCID: PMC4382241.
150. Ohmura H, Hiraga A, Takahashi T, Kai M, Jones JH. Risk factors for atrial fibrillation during racing in slow-finishing horses. *J Am Vet Med Assoc*. 2003 Jul 1;223(1):84-8. doi: 10.2460/javma.2003.223.84. PMID: 12839069.
151. Reef VB, Bonagura J, Buhl R, McGurrin MK, Schwarzwald CC, van Loon G, Young LE. Recommendations for management of equine athletes with cardiovascular abnormalities. *J Vet Intern Med*. 2014 May-Jun;28(3):749-61. doi: 10.1111/jvim.12340. Epub 2014 Mar 14. PMID: 24628586; PMCID: PMC4895474.
152. Linz D, Hesselkilde E, Kutieleh R, Jespersen T, Buhl R, Sanders P. Pulmonary vein firing initiating atrial fibrillation in the horse: Oversized dimensions but similar mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2020 May;31(5):1211-1212. doi: 10.1111/jce.14422. Epub 2020 Mar 5. PMID: 32108401.
153. Carstensen H, Hesselkilde EZ, Haugaard MM, Flethøj M, Carlson J, Pehrson S, Jespersen T, Platonov PG, Buhl R. Effects of dofetilide and ranolazine on atrial fibrillatory rate in a horse model of acutely induced atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2019 Apr;30(4):596-606. doi: 10.1111/jce.13849. Epub 2019 Jan 28. PMID: 30661267; PMCID: PMC6849868.
154. Hesselkilde EZ, Carstensen H, Flethøj M, Fenner M, Kruse DD, Sattler SM, Tfelt-Hansen J, Pehrson S, Braunstein TH, Carlson J, Platonov PG, Jespersen T, Buhl R. Longitudinal study of electrical, functional and structural remodelling in an equine model of atrial fibrillation. *BMC Cardiovasc Disord*. 2019 Oct 21;19(1):228. doi: 10.1186/s12872-019-1210-4. PMID: 31638896; PMCID: PMC6805623.
155. De Clercq D, Broux B, Vera L, Decloedt A, van Loon G. Measurement variability of right atrial and ventricular monophasic action potential and refractory period measurements in the standing non-sedated horse. *BMC Vet Res*. 2018 Mar 20;14(1):101. doi: 10.1186/s12917-018-1399-y. PMID: 29558937; PMCID: PMC5859751.
156. Álvarez-García J, Vives-Borrás M, Gomis P, Ordoñez-Llanos J, Ferrero-Gregori A, Serra-Peñaranda A, Cinca J. Electrophysiological Effects of Selective Atrial Coronary Artery Occlusion in Humans. *Circulation*. 2016 Jun 7;133(23):2235-42. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021700. Epub 2016 May 5. PMID: 27151531.
157. Yamazaki M, Morgenstern S, Klos M, Campbell K, Buerkel D, Kalifa J. Left atrial coronary perfusion territories in isolated sheep hearts: implications for atrial fibrillation maintenance. *Heart Rhythm*. 2010 Oct;7(10):1501-8. doi: 10.1016/j.hrthm.2010.06.036. Epub 2010 Jul 8. PMID: 20621203; PMCID: PMC3091284.

158. Nishida K, Qi XY, Wakili R, Comtois P, Chartier D, Harada M, Iwasaki YK, Romeo P, Maguy A, Dobrev D, Michael G, Talajic M, Nattel S. Mechanisms of atrial tachyarrhythmias associated with coronary artery occlusion in a chronic canine model. *Circulation*. 2011 Jan 18;123(2):137-46. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972778. Epub 2011 Jan 3. PMID: 21200008.
159. Alasady M, Shipp NJ, Brooks AG, Lim HS, Lau DH, Barlow D, Kuklik P, Worthley MI, Roberts-Thomson KC, Saint DA, Abhayaratna W, Sanders P. Myocardial infarction and atrial fibrillation: importance of atrial ischemia. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013 Aug;6(4):738-45. doi: 10.1161/CIRCEP.113.000163. Epub 2013 Jul 19. PMID: 23873140.
160. Nattel S, Harada M. Atrial remodeling and atrial fibrillation: recent advances and translational perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jun 10;63(22):2335-45. doi: 10.1016/j.jacc.2014.02.555. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24613319.
161. Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2011 Mar 1;89(4):744-53. doi: 10.1093/cvr/cvq329. Epub 2010 Oct 20. PMID: 20962103; PMCID: PMC3039247.
162. Burstein B, Qi XY, Yeh YH, Calderone A, Nattel S. Atrial cardiomyocyte tachycardia alters cardiac fibroblast function: a novel consideration in atrial remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007 Dec 1;76(3):442-52. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.07.013. Epub 2007 Jul 25. PMID: 17720149.
163. Verheule S, Tuyls E, Gharaviri A, Hulsmans S, van Hunnik A, Kuiper M, Serroyen J, Zeemering S, Kuijpers NH, Schotten U. Loss of continuity in the thin epicardial layer because of endomyocardial fibrosis increases the complexity of atrial fibrillatory conduction. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013 Feb;6(1):202-11. doi: 10.1161/CIRCEP.112.975144. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23390124.
164. Chen PS, Tan AY. Autonomic nerve activity and atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2007 Mar;4(3 Suppl):S61-4. doi: 10.1016/j.hrthm.2006.12.006. Epub 2006 Dec 15. PMID: 17336887; PMCID: PMC1852524.
165. Smith CD, Wang A, Vembaiyan K, Zhang J, Xie C, Zhou Q, Wu G, Chen SR, Back TG. Novel carvedilol analogues that suppress store-overload-induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Med Chem*. 2013 Nov 14;56(21):8626-55. doi: 10.1021/jm401090a. Epub 2013 Nov 5. PMID: 24124794; PMCID: PMC3896386.
166. Zhang J, Zhou Q, Smith CD, Chen H, Tan Z, Chen B, Nani A, Wu G, Song LS, Fill M, Back TG, Chen SR. Non- $\beta$ -blocking R-carvedilol enantiomer suppresses Ca<sup>2+</sup> waves and stress-induced ventricular tachyarrhythmia without lowering heart rate or blood pressure. *Biochem J*. 2015 Sep 1;470(2):233-42. doi: 10.1042/BJ20150548. Epub 2015 Jul 8. PMID: 26348911; PMCID: PMC4902270.
167. Nolla-Colomer C, Casabella-Ramon S, Jimenez-Sabado V, Vallmitjana A, Tarifa C, Herraiz-Martínez A, Llach A, Tauron M, Montiel J, Cinca J, Chen SRW, Benitez R, Hove-Madsen L.  $\beta$ 2-adrenergic stimulation potentiates spontaneous calcium release by increasing signal mass and co-activation of ryanodine receptor clusters. *Acta Physiol (Oxf)*. 2022 Apr;234(4):e13736. doi: 10.1111/apha.13736. Epub 2021 Nov 6. PMID: 34709723.

168. Beasley R, Pearce N, Crane J, Burgess C. Beta-agonists: what is the evidence that their use increases the risk of asthma morbidity and mortality? *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Aug;104(2 Pt 2):S18-30. doi: 10.1016/s0091-6749(99)70270-8. PMID: 10452785.
169. Beasley R, Nishima S, Pearce N, Crane J. Beta-agonist therapy and asthma mortality in Japan. *Lancet*. 1998 May 9;351(9113):1406-7. doi: 10.1016/S0140-6736(05)79446-0. PMID: 9593418.
170. Agarwal SR, Sherpa RT, Moshal KS, Harvey RD. Compartmentalized cAMP signaling in cardiac ventricular myocytes. *Cell Signal*. 2022 Jan;89:110172. doi: 10.1016/j.cellsig.2021.110172. Epub 2021 Oct 20. PMID: 34687901; PMCID: PMC8602782.
171. Wang Y, Shi Q, Li M, Zhao M, Reddy Gopireddy R, Teoh JP, Xu B, Zhu C, Ireton KE, Srinivasan S, Chen S, Gasser PJ, Bossuyt J, Hell JW, Bers DM, Xiang YK. Intracellular  $\beta_1$ -Adrenergic Receptors and Organic Cation Transporter 3 Mediate Phospholamban Phosphorylation to Enhance Cardiac Contractility. *Circ Res*. 2021 Jan 22;128(2):246-261. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317452. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33183171; PMCID: PMC7856104.
172. Amorós-Figueras G, Jorge E, Alonso-Martin C, Traver D, Ballesta M, Bragós R, Rosell-Ferrer J, Cinca J. Endocardial infarct scar recognition by myocardial electrical impedance is not influenced by changes in cardiac activation sequence. *Heart Rhythm*. 2018 Apr;15(4):589-596. doi: 10.1016/j.hrthm.2017.11.031. Epub 2017 Dec 27. PMID: 29197656.
173. Guandalini GS, Liang JJ, Marchlinski FE. Ventricular Tachycardia Ablation: Past, Present, and Future Perspectives. *JACC Clin Electrophysiol*. 2019 Dec;5(12):1363-1383. doi: 10.1016/j.jacep.2019.09.015. PMID: 31857035.
174. Cappato R. Atrial fibrillation complicating acute myocardial infarction: how should it be interpreted and how should it be treated and prevented? *Eur Heart J*. 2009 May;30(9):1035-7. doi: 10.1093/eurheartj/ehp154. Epub 2009 Apr 9. PMID: 19359325; PMCID: PMC2675704.
175. Ha ACT, Verma S, Mazer CD, Quan A, Yanagawa B, Latter DA, Yau TM, Jacques F, Brown CD, Singal RK, Yamashita MH, Saha T, Teoh KH, Lam BK, Deyell MW, Wilson M, Hibino M, Cheung CC, Kosmopoulos A, Garg V, Brodutch S, Teoh H, Zuo F, Thorpe KE, Jüni P, Bhatt DL, Verma A; SEARCH AF CardioLink-1 Investigators. Effect of Continuous Electrocardiogram Monitoring on Detection of Undiagnosed Atrial Fibrillation After Hospitalization for Cardiac Surgery: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open*. 2021 Aug 2;4(8):e2121867. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.21867. PMID: 34448866; PMCID: PMC8397929.
176. Soattin L, Lubberding AF, Bentzen BH, Christ T, Jespersen T. Inhibition of Adenosine Pathway Alters Atrial Electrophysiology and Prevents Atrial Fibrillation. *Front Physiol*. 2020 Jun 12;11:493. doi: 10.3389/fphys.2020.00493. PMID: 32595514; PMCID: PMC7304385.
177. Katritsis DG, Giazitzoglou E, Wood MA, Shepard RK, Parvez B, Ellenbogen KA. Inducible supraventricular tachycardias in patients referred for catheter ablation of atrial fibrillation. *Europace*. 2007 Sep;9(9):785-9. doi: 10.1093/europace/eum105. Epub 2007 Jun 1. PMID: 17545655.

