



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Impacto de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) sobre la homeostasis del calcio intracelular y la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos

Verónica Jiménez Sábado



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

IMPACTO DE SNPs (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS) SOBRE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR Y LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN MIOCITOS AURICULARES HUMANOS

Memoria de tesis doctoral presentada por

Verónica Jiménez Sábado

para optar al grado de Doctora por la Universitat de Barcelona

Dirigida por el Dr. Leif Hove-Madsen, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Tutor: Dr. Josep Lluís Mont Girbau, Jefe de la Sección de Arritmias del Hospital Clínic.

El director

El tutor

La doctoranda

Leif Hove-Madsen

Josep Lluís Mont Girbau

Verónica Jiménez Sábado



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Programa de Doctorado de Medicina e Investigación Traslacional

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universitat de Barcelona

Barcelona, mayo de 2021

A mi madre,

AGRADECIMIENTOS

Primero, quisiera agradecer a mi director Leif que me haya dado la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio. Gracias por todo lo que me has enseñado durante todos estos años, sobre ciencia, sobre electrofisiología y sobre la vida en general. Sin tu apoyo, tus consejos y tu confianza seguro que esta etapa hubiese sido mucho más difícil. Sin duda, me siento muy afortunada de haber compartido todos estos años contigo.

En segundo lugar, quería dar las gracias a todos los compañeros de laboratorio con los que he coincidido, ya que tengo la gran suerte de llevarme grandes amigos de esta etapa. Me gustaría empezar con Adela y Carmen, las dos primeras personas con las que coincidí en el laboratorio, con las que compartí muchos momentos y gracias a las que hoy por hoy sé todo el funcionamiento del laboratorio. Siempre les digo que para mí son como mis hermanas mayores, y así lo siento, porque desde el primer momento me acogieron y me ayudaron en todo lo que necesité. Gracias por todos los momentos que hemos compartido en viajes, congresos, cenas, etc. ¡Os sigo echando de menos! Agradecerle a Anna que siempre estuviera dispuesta a echarme un cable con los conceptos teóricos, por sus anécdotas y experiencias, y por haberme introducido en el apasionante mundo del “scrapbooking” y los jabones sólidos. Ahora le toca a Hildegard, que como siempre decimos en otras circunstancias quizás no hubiéramos sido amigas, pero así es la vida que te pone a grandes personas en el camino. Gracias por ser tan buena, por estar siempre dispuesta a acompañarme a salir a comer bravas, por haberme acogido en tu casa muchos días, y por haberme inculcado algunos de los buenos principios que tienes. Gracias a Carme, por los días que nos venía a hacer compañía al lab y por darme recetas fit de bizcochos jaja. Y aunque coincidimos poco tiempo, también quería mencionar a Laura Nasarre, gracias por los ratos divertidos que pasamos en las épocas de estudio de mercado de robots de cocina jajaja. Por último, a las 2 personas que han compartido conmigo este final de etapa, Sergi y Paloma. Gracias por vuestro humor, por vuestros debates a grito “pelao” en el laboratorio, por las tardes de karaoke y hasta por los malos días que hemos tenido, porque de todo se aprende. También os tengo que dar las gracias por apoyarme, escucharme y preocuparos por mí. No hace mucho leí la frase de que somos una mezcla de las 5 personas con las que compartimos más tiempo. Yo creo que es una frase muy cierta, y el ejemplo está en que he aprendido muchas cosas buenas de cada uno de vosotros, gracias a todo el tiempo que hemos compartido en el trabajo. Gracias de corazón, a todos y cada uno de vosotros.

Muchas gracias al grupo ANCORA- Anàlisi i control del ritme cardíac y al grupo BIOCÓM-SC- Grup de Biologia Computacional i Sistemes Complexos de la Universitat Politècnica de Catalunya, que son otra parte del equipo.

Agradecer también al equipo del Dr. Cinca y Dr. Guerra por su ayuda científica y su visión clínica, y al equipo de Cirugía Cardíaca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau que siempre nos han recibido con los brazos abiertos.

No querría olvidarme de agradecer a todas las personas con las que coincidí en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Veterinaria mientras realizaba mi TFG en el último curso. Fue mi primer contacto con la investigación, y en parte gracias a como me acogieron, el entusiasmo que me transmitieron y que me animaron a seguir adelante, hoy estoy aquí escribiendo esta tesis.

Por otro lado, me gustaría agradecer a Bea y Anso, mis dos grandes apoyos durante Veterinaria, y también durante toda esta etapa porque hemos seguido el mismo camino y las 3 hemos vivido lo que es realizar una tesis. Gracias por el apoyo, el ánimo y la comprensión incondicional. A Sònia, Laura y Sandra, y también a Sara, Ainhoa, Tania, Sonia y Laia, que durante estas últimas semanas me han estado transmitiendo su fuerza y energía para llegar al final. ¡Muchas gracias a todas!

A mi familia, gracias por el apoyo, por confiar siempre en mí. Gracias sobretodo a mi madre que siempre ha hecho un esfuerzo para que yo estudiase, por haberme enseñado a ser responsable, constante y luchadora. A mis hermanos, cuñadas y sobrinos/as, porque siempre que los necesito están ahí para apoyarme. Y no puedo olvidar a mi familia política, mis suegros y cuñados, gracias por los ánimos, por el apoyo y por la confianza que tenéis siempre en mí.

Y por último, pero no menos importante, millones de gracias a Juanjo. No tengo siquiera palabras para agradecerle su apoyo incondicional. Ya pasamos juntos una carrera, y ahora ha tenido que volver a aguantar el estrés de una tesis doctoral. Gracias por apoyarme, animarme y hacerme reír hasta en los peores momentos. Gracias por haberme dado soporte moral durante toda esta etapa y en especial en las últimas semanas, por haberme cuidado tanto y por haber tenido tanta paciencia.

ÍNDICE

ÍNDICE

GLOSARIO	13
ARTÍCULOS QUE COMPONEN LA TESIS	17
RESUMEN	21
ABSTRACT	27
INTRODUCCIÓN.....	33
MOTIVACIÓN DEL ESTUDIO	35
LA EXCITACIÓN ELÉCTRICA DE LOS CARDIOMIOCITOS	37
<i>Canales iónicos y potencial de reposo</i>	37
<i>Potencial de acción cardíaco y corrientes iónicas subyacentes</i>	39
<i>Generación de la señal eléctrica</i>	42
<i>Conducción de la señal eléctrica</i>	43
ESTRUCTURA DEL CARDIOMIOCITO	44
<i>Miofilamentos</i>	44
<i>Sarcolema y túbulos transversos</i>	48
<i>Retículo sarcoplasmático</i>	48
HOMEOSTASIS DEL CALCIO EN CARDIOMIOCITOS.....	49
<i>Esquema general del acoplamiento excitación- contracción</i>	49
<i>Activación de la contracción</i>	51
<i>Eliminación de calcio del citosol</i>	54
REGULACIÓN NEURO-HORMONAL DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR	58
<i>Receptores adrenérgicos</i>	58
<i>Receptores colinérgicos</i>	59
<i>Receptores purinérgicos</i>	59
MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS Y FACTORES ETIOLÓGICOS PARA EL DESARROLLO DE FIBRILACIÓN AURICULAR	60
<i>Mecanismos arritmogénicos</i>	60
<i>Factores etiológicos</i>	64
<i>Variantes genéticas que pueden afectar a la homeostasis del calcio y predisponer a la aparición de fibrilación auricular</i>	65
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE MIOCITOS AURICULARES HUMANOS	75
<i>Obtención de tejido auricular humano</i>	75
<i>Aislamiento de cardiomiocitos auriculares humanos</i>	75
MEDICIONES ELECTROFISIOLÓGICAS	77
<i>Medición de la corriente de calcio tipo L</i>	79
<i>Determinación de la relación intensidad-voltaje (I-V) para la I_{Ca}</i>	80
<i>Determinación de la inactivación de la I_{Ca}</i>	80
<i>Determinación de la recuperación de la inactivación de la I_{Ca}</i>	82
<i>Determinación del contenido de calcio del RS y de las liberaciones espontáneas de calcio</i>	82
<i>Determinación de la corriente SK sensible a apamina</i>	83
<i>Determinación de despolarizaciones espontáneas de membrana en reposo y bajo estimulación eléctrica</i>	84
VISUALIZACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	85
<i>Detección de calcium sparks</i>	87
TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA	88
<i>Análisis de imágenes</i>	89
TÉCNICA DE WESTERN BLOT	90
GENOTIPADO DE SNPs	91

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	91
RESULTADOS.....	95
I- EFECTO DE LAS VARIANTES DE RIESGO DE 4Q25 SOBRE LA I_{Ca} EN MIOCITOS AURICULARES HUMANOS	99
INTRODUCCIÓN	99
RESULTADOS	100
<i>Frecuencia de las variantes de riesgo de 4q25.....</i>	100
<i>Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.....</i>	103
<i>Efecto de las variantes de 4q25 sobre la I_{Ca}.....</i>	104
<i>Hallazgos principales</i>	112
II- EFECTO DE LAS VARIANTES 4Q25 SOBRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN MIOCITOS AURICULARES HUMANOS.....	113
INTRODUCCIÓN	113
RESULTADOS	114
<i>Efecto de las variantes de riesgo de 4q25 sobre los I_{TT}.....</i>	114
<i>Efecto de las variantes 4q25 sobre el contenido de calcio del RS.....</i>	117
<i>Efecto de las variantes de riesgo en 4q25 sobre la densidad y fosforilación del RyR2.....</i>	118
<i>Efecto de las variantes de riesgo en 4q25 sobre los niveles de ADO y actividad de adenosina desaminasa en plasma.....</i>	120
<i>Hallazgos principales</i>	122
III- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA VARIANTE RS13376333 DE 1Q21 Y SU INTERACCIÓN CON LAS VARIANTES 4Q25.....	123
INTRODUCCIÓN	123
RESULTADOS	124
<i>Frecuencia de las variantes de riesgo de 1q21.....</i>	124
<i>Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.....</i>	127
<i>Efecto de la variante rs13376333 de 1q21 sobre la corriente SK sensible a apamina.....</i>	128
<i>Distribución espacial de los canales SK3, los Cav1.2 y los RyR2.....</i>	129
<i>Efecto de la FA sobre la corriente SK sensible a apamina.....</i>	130
<i>Efecto de la variante rs1448818 de 4q25 sobre la corriente SK sensible a apamina</i>	131
<i>Efecto específico de la variante rs13376333 de 1q21 sobre la corriente SK</i>	132
<i>Efecto de la inhibición de los canales SK3 sobre las despolarizaciones espontáneas de la membrana.....</i>	133
<i>Hallazgos principales</i>	134
IV- INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE LA HOMEOSTASIS INTRACELULAR DE CALCIO EN PACIENTES CON FIBRILACIÓN AURICULAR.....	135
INTRODUCCIÓN	135
RESULTADOS	136
<i>Diferencias en las características clínicas entre pacientes de sexo femenino y masculino</i>	136
<i>Efecto del sexo sobre la I_{Ca} y los I_{TT}.....</i>	137
<i>Efecto del sexo sobre las liberaciones espontáneas de calcio del RS.....</i>	142
<i>Efecto del sexo sobre la regulación de la recaptación y contenido de calcio del RS.....</i>	143
<i>Efecto del sexo sobre la fosforilación de los RyR2.....</i>	146
<i>Traducción de las diferencias sexo-específicas en la homeostasis del calcio.....</i>	147
<i>Hallazgos principales</i>	148
DISCUSIÓN	151
CONCLUSIONES.....	175
BIBLIOGRAFÍA	179
ANEXO I.....	205
ANEXO II	221

GLOSARIO

ABREVIATURAS

1q21	Región cromosómica 1q21
4q25	Región cromosómica 4q25
AC	Adenilil ciclasa
ADA	Adenosina desaminasa
ADO	Adenosina
AV	Atrioventricular
Ca²⁺	Ion calcio
[Ca²⁺]	Concentración de calcio
CaM	Calmodulina
CaMKII	Proteína quinasa II dependiente de Ca ²⁺ -CaM
Ca_v1.2	Canal de calcio tipo L
CICR	<i>Calcium induced calcium release</i>
CPVT	Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica
CSQ-2	Calsecuestrina cardíaca (tipo 2)
DAD	<i>Delayed afterdepolarization</i> o despolarización espontánea de membrana tardía
EAD	<i>Early afterdepolarization</i> o despolarización espontánea de membrana temprana
FA	Fibrilación auricular
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>
I_{Ca}	Corriente de calcio
I_{CaL}	Corriente de calcio tipo L
I_{CaT}	Corriente de calcio tipo T
I_f	<i>Funny current</i> o corriente marcapaso
I_{TI}	<i>Transient inward currents</i> o corrientes transitorias de entrada
I-V	Intensidad-voltaje

NCX-1	Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cardíaco (tipo 1)
OR	<i>Odds ratio</i>
PA	Potencial de acción
PDE	<i>Phosphodiesterase</i> o fosfodiesterasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLB	<i>Phospholamban</i> o fosfolamban
PLC	<i>Phospholipase C</i> o fosfolipasa C
PMCA	ATPasa plasmática de Ca^{2+}
PP1	Fosfatasa 1
PP2	Fosfatasa 2
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR2	Receptor de rianodina cardíaco (tipo 2)
SA	Sinoatrial
SERCA2a	ATPasa de Ca^{2+} cardíaca del RS (tipo 2)
SK3	Canal de K^+ activado por Ca^{2+}
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TnC	Troponina C
TnI	Troponina I
TnT	Troponina T
V_m	Potencial de membrana

ARTÍCULOS QUE COMPONEN LA TESIS

Tesis presentada en formato clásico con un artículo anexo. La tesis consta de 4 objetivos y 1 artículo:

Los Capítulos I y II abarcarían el primer objetivo, y están dedicados a estudiar en profundidad el efecto de diferentes variantes de riesgo de la región 4q25 del cromosoma 4 sobre la corriente de calcio tipo L y sobre la actividad eléctrica espontánea inducida por liberación de calcio en miocitos auriculares humanos. Ambos capítulos forman parte de un manuscrito en preparación.

El Capítulo III abarcaría el segundo y tercer objetivo. Incluye el estudio del efecto de las variantes de riesgo de la región 1q21 del cromosoma 1 sobre la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos, así como las posibles interacciones funcionales entre las variantes de 1q21 y 4q25. Este capítulo forma parte de otro manuscrito en preparación.

Finalmente, el Capítulo IV abarcaría el cuarto y último objetivo e incluye el estudio de la influencia del sexo sobre la homeostasis del calcio en pacientes con fibrilación auricular. Sus resultados están incluidos en un artículo publicado en la revista Cardiovascular Research recientemente.

- Herraiz-Martínez A, Tarifa C, **Jiménez-Sábado V**, Llach A, Godoy-Marín H, Colino H, Nolla-Colomer C, Casabella S, Izquierdo-Castro P, Benítez I, Benítez R, Rosselló-Díez E, Rodríguez-Font E, Viñolas X, Ciruela F, Cinca J, Hove-Madsen L. Influence of sex on intracellular calcium homeostasis in patients with atrial fibrillation. Cardiovascular Research. 2021; cvab127. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab127>. JCR Factor de Impacto: 8.168 (12/138; Q1). Cardiac and cardiovascular systems.

RESUMEN

ANTECEDENTES: La fibrilación auricular (FA) es la arritmia más común, afectando a un 1-2% de la población general. Aunque la FA se ha asociado con numerosas alteraciones electrofisiológicas, moleculares y estructurales, su tratamiento no es eficaz en todos los pacientes. Desde hace una década, diversos estudios de “*genome wide association*” han asociado varios *single nucleotide polymorphisms* (SNP)s en las regiones cromosómicas 4q25, 1q21 y 16q22, entre otras, a un mayor riesgo de presentar FA. No obstante, los mecanismos que están detrás de cada uno de ellos todavía son desconocidos. Por otro lado, varios estudios han demostrado que factores como tener enfermedad en la válvula mitral, la edad o la función del ventrículo izquierdo pueden afectar a la homeostasis intracelular del calcio y a la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos. Sin embargo, aunque hay estudios que demuestran que la epidemiología de la FA es diferente entre hombres y mujeres, sólo se ha analizado el efecto del sexo sobre la homeostasis intracelular del calcio en modelos animales.

HIPÓTESIS: La asociación específica de los diferentes SNPs con mecanismos moleculares y consecuencias electrofisiológicas concretas podría ser utilizada como biomarcador para la prevención del desarrollo de FA, así como para el tratamiento personalizado de pacientes teniendo en cuenta el efecto del sexo.

OBJETIVOS:

- ◆ Profundizar en los mecanismos moleculares que alteran la homeostasis del calcio en los portadores de múltiples variantes de riesgo de la región 4q25.
- ◆ Investigar el efecto que tienen las variantes de riesgo de la región 1q21 sobre la corriente SK3 y la actividad eléctrica, así como la influencia de la homeostasis del calcio sobre la corriente SK3 en miocitos auriculares humanos.
- ◆ Analizar las posibles interacciones que se pueden dar entre las diferentes variantes de riesgo 4q25 y 1q21, y cómo afectarían estas a la función de los miocitos auriculares humanos.
- ◆ Determinar la influencia del sexo en la homeostasis intracelular del calcio en pacientes con FA.

MÉTODOS: Los experimentos se llevaron a cabo en miocitos auriculares humanos aislados. Se utilizó la técnica de *patch-clamp* (*voltaje-clamp* o *current-clamp* en función del protocolo) para medir la corriente de calcio (I_{Ca}) y sus características electrofisiológicas, así como las corrientes transitorias de entrada (I_{T1}) o 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

RESULTADOS: El análisis del efecto de múltiples variantes de riesgo de 4q25 sobre la I_{Ca} y la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos, mostró que los pacientes portadores de la variante de riesgo en rs1448818 (la más próxima a PITX2) presentaban una reducción significativa de la I_{Ca} , mientras que los pacientes portadores de las variantes de riesgo en rs2200733, rs13143308 y rs10033464 (aproximadamente a 150 kb de PITX2) presentaban un incremento significativo en la frecuencia de I_{TI} . Teniendo en cuenta estos hallazgos en conjunto, el efecto parece estar asociado a la localización en la que se encuentran las variantes de riesgo, sugiriéndose un efecto inhibitor en el extremo de 4q25 en la que se encuentra la variante de riesgo rs1448818, y un efecto estimulador en la región central donde se encuentran las variantes de riesgo rs2200733, rs13143308 y rs10033464. Por otro lado, el análisis del efecto de la alteración en la homeostasis del calcio y de las variantes de riesgo 1q21 sobre la corriente SK3 y la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos mostró que los pacientes con FA, los portadores de la variante de riesgo en rs1448818 de 4q25 y los portadores de la variante rs13376333 de 1q21 presentaban una reducción en la corriente SK sensible a apamina. Además, el bloqueo de los canales SK3 con apamina demostró que una disminución de la función de estos se traducía en un incremento de las despolarizaciones espontáneas de la membrana. Finalmente, aunque la FA se ha asociado con una disminución de la I_{Ca} y un aumento de la frecuencia de I_{TI} , el análisis del efecto del sexo sobre la homeostasis intracelular del calcio en miocitos auriculares humanos demostró que la I_{Ca} sólo se vio reducida en hombres con FA; mientras que permitió observar una mayor incidencia de I_{TI} y despolarizaciones espontáneas de la membrana únicamente en mujeres, exacerbándose en aquellas con FA.

CONCLUSIONES:

1. Las variantes de riesgo de la región 4q25 asociadas a FA tienen un efecto diferencial sobre la regulación del calcio intracelular en función de su localización.
 - Los pacientes portadores de la variante de riesgo en rs1448818, que se encuentra en el extremo más próximo a PITX2, presentan una reducción de la I_{Ca} que favorecería un acortamiento del periodo refractario y la reentrada eléctrica.
 - Por otro lado, los pacientes portadores de las variantes de riesgo en rs2200733, rs13143308 o rs10033464, situadas a unas 150 kb de PITX2,

presentan un incremento en la frecuencia de I_{TI} que favorecería las despolarizaciones espontáneas de la membrana y actividad ectópica.

Esto sugiere que la elección del tratamiento para prevenir o tratar la FA debería tener en cuenta las variantes de riesgo que presenta el paciente, ya que sería beneficioso restaurar la I_{Ca} en portadores de rs1448818 y reducir la liberación espontánea de calcio en portadores de rs13143308.

2. Las alteraciones en la homeostasis del calcio modifican la corriente SK sensible a apamina.
 - Así, la reducción de la I_{Ca} observada en pacientes con FA o en portadores de la variante de riesgo en rs1448818 reduce la corriente SK sensible a apamina.
 - Por otro lado, la variante de riesgo rs13376333 de la región1q21, ubicada en el intrón 1 del gen KCNN3, también reduce la corriente SK sensible a apamina.
 - Los efectos de las variantes de riesgo rs1448818 y rs13376333 no son complementarios.

Estas reducciones de la corriente SK3 retrasarían la repolarización de las despolarizaciones espontáneas de membrana, facilitando la inducción de potenciales de acción espontáneos y arritmias inducidas por actividad ectópica. Por tanto, la restauración de la función de los canales SK3 podría ser una terapia farmacológica específica para la prevención o el tratamiento de los pacientes portadores de la variante rs13376333.

3. El sexo es un factor a tener en cuenta ya que tiene un efecto diferencial sobre la I_{Ca} y la frecuencia de I_{TI} en miocitos auriculares de pacientes con FA.
 - La I_{Ca} sólo se ve reducida en hombres con FA.
 - La incidencia de I_{TI} y despolarizaciones espontáneas de la membrana es mayor únicamente en mujeres.

Estos resultados sugieren que las terapias dirigidas a reestablecer la I_{Ca} serían más efectivas en hombres con FA, mientras que las terapias dirigidas a reestablecer la actividad del RyR2 serían más efectivas en mujeres con FA.

ABSTRACT

BACKGROUND: Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia, affecting 1-2% of the general population. Although AF has been associated with numerous electrophysiological, molecular and structural alterations, its treatment is not effective in all patients. For a decade, various genome wide association studies have associated several single nucleotide polymorphisms (SNP)s in the chromosomal regions 4q25, 1q21 and 16q22 with an increased risk of developing AF. Nevertheless, the mechanisms behind each of them are still unknown. On the other hand, several studies have shown that clinical factors such as mitral valve disease, age, or left ventricular function can affect intracellular calcium homeostasis and electrical activity in human atrial myocytes. However, although there are studies showing differences in the epidemiology of AF between men and women, the effect of sex on intracellular calcium homeostasis has only been analyzed in animal models.

HYPOTHESIS: The specific association of the different SNPs with molecular mechanisms and specific electrophysiological responses could be used as biomarkers for the prevention of AF, as well as for personalized treatment of patients with AF, taking into account the influence of sex.

AIMS OF THE THESIS:

- ◆ Analyze the molecular mechanisms that alter calcium homeostasis in carriers of multiple risk variants of the 4q25 region.
- ◆ Investigate the effects of 1q21 risk variants on SK3 current and electrical activity, as well as the influence of calcium homeostasis on SK3 current in human atrial myocytes.
- ◆ Analyze the possible interactions that can occur between the different 4q25 and 1q21 risk variants, and their combined effect on electrophysiological function of human atrial myocytes.
- ◆ Determine the influence of sex on intracellular calcium homeostasis in patients with AF.

METHODS: Experiments were carried out on isolated human atrial myocytes. Patch-clamp technique (voltage-clamp or current-clamp depending on the protocol) was used to measure calcium current and its electrophysiological characteristics, as well as transient inward currents (I_{Ti}) or spontaneous membrane depolarizations. Confocal microscopy was used to visualize intracellular calcium. Protein expression was determined using the western blot technique and their distribution was analyzed with immunofluorescent marking.

RESULTS: Analysis of the effect of all 4q25 risk variants on I_{Ca} and electrical activity in human atrial myocytes showed a significant reduction in I_{Ca} amplitude in patients carrying the risk variant in rs1448818 (the variant closest to PITX2), while patients carrying the risk variants in rs2200733, rs13143308 and rs10033464 (approximately located 150 kb upstream from PITX2) presented a significant increase in the I_{TI} frequency. Taking these findings into account, the functional effect seems to be associated with the location of the risk variants, suggesting an inhibitory effect on ion channel activity in the region close to PITX2 where the risk variant rs1448818 is found, and a stimulatory effect in the area further away from PITX2 where the risk variants rs2200733, rs13143308 and rs10033464 are found. On the other hand, analysis of the effect of the alterations in calcium homeostasis and 1q21 risk variants on SK3 current and electrical activity in human atrial myocytes showed that patients with AF, carriers of the risk variant rs1448818 and carriers of the risk variant rs13376333 at 1q21 all exhibited a reduction in apamine-sensitive SK current. Furthermore, blocking the SK3 channels with apamin led to an increase in spontaneous membrane depolarizations. Finally, AF has generally been associated with a decrease in I_{Ca} and an increase in I_{TI} frequency, but analysis of the effect of sex on intracellular calcium homeostasis in human atrial myocytes showed that I_{Ca} is only reduced in men with AF; while higher frequency of I_{TI} and spontaneous membrane depolarizations is only observed in women and exacerbated in those with AF.

CONCLUSIONS:

1. Risk variants in the 4q25 region associated with risk of AF have a differential effect on intracellular calcium regulation depending on their location.
 - Patients with risk variant at rs1448818, which is closest to PITX2, present a reduction in I_{Ca} that would favor a shortening of refractory period and electrical reentry.
 - On the other hand, patients with risk variants at rs2200733, rs13143308 or rs10033464, located approximately 150 kb upstream from PITX2, present an increase in the I_{TI} frequency that favors spontaneous membrane depolarizations and ectopic activity.

This demonstrates that the choice of treatment to prevent or treat AF should take into account the risk variants carried by the patient, suggesting that it would be beneficial to restore I_{Ca} in carriers of rs1448818 and to reduce spontaneous calcium release in carriers of rs13143308.

2. Altered calcium homeostasis and 1q21 variants modify the apamine-sensitive current.
 - The reduction in I_{Ca} observed in patients with AF or in carriers of the risk variant in rs1448818 reduces the apamine-sensitive SK current.
 - The risk variant rs13376333 in the 1q21 region, located in intron 1 of the KCNN3 gene, also reduce the apamine-sensitive current.
 - The effects of the risk variants rs1448818 and rs13376333 are not complementary.

These reductions in SK3 current would delay the repolarization of spontaneous membrane depolarizations, facilitating the induction of spontaneous action potentials and arrhythmias induced by ectopic activity. Therefore, restoration of SK3 channel function might represent a specific therapy for the prevention or treatment of AF in carriers of the rs13376333 risk variant.

3. Sex is also a factor to take into account since it has a differential effect on I_{Ca} amplitude and I_{T1} frequency in atrial myocytes of patients with AF.
 - I_{Ca} is only reduced in men with AF.
 - The incidence of I_{T1} and spontaneous membrane depolarizations is higher in women only and exacerbated in those with AF.

These results suggest that therapies aimed at reestablishing I_{Ca} would be more effective in men with AF, while therapies aimed at restoring RyR2 activity would be more effective in women with AF.

INTRODUCCIÓN

MOTIVACIÓN DEL ESTUDIO

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia más común, afectando a un 1-2% de la población general. Clínicamente, la presencia de FA hace que se duplique la tasa de mortalidad e incrementa el riesgo de sufrir un ictus hasta 5 veces (1). Sin embargo, a pesar de esta elevada prevalencia entre la población, su relevancia clínica y todos los esfuerzos depositados en su estudio en las últimas décadas, su tratamiento no es eficaz en todos los pacientes.

La regulación del calcio intracelular juega un papel muy importante en el desarrollo de disfunciones contráctiles y arritmias. Durante el potencial de acción (PA) cardíaco se produce una despolarización de la membrana celular que permite la entrada de calcio al interior de la célula gracias a la activación de los canales de calcio tipo L ($Ca_v1.2$). Este incremento del calcio intracelular activará la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (RS) a través de canales de calcio presentes en su membrana, también conocidos como receptores de rianodina (RyR2), dando lugar al fenómeno conocido como “*calcium induced calcium release*” (CICR). De esta forma, el calcio liberado al citosol se unirá a la troponina C, produciendo la contracción celular. Por el contrario, para que se produzca la relajación, el aumento del calcio citosólico debe ser eliminado. Los principales mecanismos implicados en su eliminación son la reacumulación en el RS y su expulsión del cardiomiocito a través del intercambiador Na^+-Ca^{2+} (NCX-1)(2).

La FA se ha asociado con numerosas alteraciones electrofisiológicas, moleculares y estructurales en los miocitos auriculares (3). En cuanto a las alteraciones electrofisiológicas, varios estudios han demostrado que los miocitos de los pacientes con FA presentan una mayor frecuencia de liberaciones espontáneas de calcio procedentes del RS (4,5). Estas liberaciones espontáneas se han relacionado con la fosforilación del RyR2 en el residuo ser-2808, producida por la proteína quinasa A (PKA)(5,6). La fosforilación del RyR2 en el residuo ser-2814 también puede ser activada por la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII), que contribuye de la misma manera a un incremento de la liberación de calcio del RS en miocitos auriculares de pacientes con FA (7).

Por otro lado, se ha visto que modelos de ratón transgénicos con un elevado índice de liberaciones espontáneas de calcio son más susceptibles a presentar arritmia espontánea o inducida (8). Todo esto, demuestra la importancia de la liberación espontánea de calcio del RS para el desarrollo de arritmias.

Mientras se siguen haciendo numerosos estudios sobre las alteraciones electrofisiológicas y mecánicas en la FA, la investigación de sus bases genéticas sigue siendo escasa. Principalmente, se conocen mutaciones puntuales en los genes que codifican para diferentes canales iónicos que se han asociado a la FA familiar, pero estas sólo explican una minoría de los casos (<10%)(9). Durante la última década, se han realizado estudios de *genome-wide association studies* (GWAS) que han relacionado la FA con diferentes locus de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) en las regiones cromosómicas 4q25, 1q21 y 16q22, entre otros (10,11). Estudios más recientes, han determinado la asociación de nuevas variantes a la FA, aunque las localizadas en 4q25 parecen seguir siendo las que podrían tener mayor impacto (12). Resultados de nuestro laboratorio vinculan la variante de riesgo de 4q25 rs13143308T con una excesiva liberación espontánea de calcio que podría asociarse a determinados cambios observados, entre los cuales encontramos el aumento en la expresión de la ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA2a), el aumento del contenido de calcio del RS y el aumento de la fosforilación en el residuo de ser-2808 del RyR2 (13). Sin embargo, a parte de rs13143308, hay otros SNPs en la región 4q25 que se segregan de forma independiente a esta, por lo que podrían tener efectos funcionales diferentes.

También se ha asociado la FA a variantes de riesgo de la región 1q21 ubicadas en intrones del gen KCNN3, que codifica para el canal de K^+ activado por Ca^{2+} (SK3)(11). En la última década se ha evidenciado la existencia y la importancia funcional de los canales SK3 en el corazón, e incluso parece que podrían tener un rol importante en la FA.

Por esta razón, sería de gran interés conocer de forma más profunda los mecanismos moleculares que se encuentran detrás de cada variante de riesgo 4q25, así como el impacto que tienen las variantes de riesgo 1q21 sobre la homeostasis del calcio intracelular y la actividad eléctrica de miocitos auriculares humanos de pacientes con y sin FA, y las posibles interacciones que puede haber entre las diferentes variantes de riesgo.

LA EXCITACIÓN ELÉCTRICA DE LOS CARDIOMIOCITOS

Canales iónicos y potencial de reposo

Para entender los principios básicos de la excitación eléctrica de los cardiomiocitos y cómo se pueden producir las arritmias cardíacas por defectos en esta excitación eléctrica, debemos conocer el funcionamiento de los canales iónicos y sus propiedades.

Los canales iónicos son proteínas que regulan el paso de iones a través de la membrana celular. Estos presentan una serie de características importantes, entre las cuales encontramos la permeabilidad selectiva a determinados iones y su apertura o cierre dependiendo del potencial de membrana (canales regulados por voltaje), moléculas intracelulares o ligandos extracelulares (canales regulados por sustancias químicas) y cambios físicos (canales regulados por estímulos mecánicos).

El potencial de membrana (V_m) de las células se genera gracias a varios gradientes iónicos debido a la permeabilidad selectiva que presenta la membrana celular para diferentes iones. Para entender cómo se genera el V_m de reposo de las células, debemos tener en cuenta las concentraciones del medio extra e intracelular (Ver **Tabla 1**), así como conocer las 2 ecuaciones que determinan la difusión de iones a través de la membrana celular.

	INTRACELULAR	EXTRACELULAR
Na⁺	5-15	145
K⁺	140	5
Mg²⁺	30	1-2
Ca²⁺	<0.0001 libre	2-5
Cl⁻	4	110

Tabla 1. Gradiente de concentraciones iónicas transmembrana (mM)

El potencial de equilibrio de un ion determinado (E_{ion}) depende de la concentración de ese ion específico a ambos lados de la membrana, y nos indica el potencial eléctrico en el cual no se produce un movimiento neto de este ion. Cuanto mayor sea la diferencia, mayor es la tendencia del ion a difundir hacia el lado que presenta una menor concentración, y por tanto mayor será el potencial de equilibrio. El potencial de equilibrio para cualquier ion a 37°C se calcula utilizando la **ecuación de Nernst** (14):

$$E_{ion} = \frac{61}{Z} \times \log \frac{[ión]_e}{[ión]_i}$$

Donde 61 es $2.303 RT/F$ a 37°C (R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura absoluta y F es la constante de Faraday), Z es la carga eléctrica del ion, y $[\text{ion}]_i$ y $[\text{ion}]_e$ es la concentración del ion en el interior y en el exterior de la célula respectivamente.

Sin embargo, las células excitables de los mamíferos son permeables a más de un ion, y por ello el V_m viene determinado por el gradiente de todos ellos. Así, el V_m depende de la polaridad de cada ion, la permeabilidad de la membrana a cada ion, y los gradientes de concentración entre el interior y el exterior de la membrana. Los iones Na^+ , K^+ y Cl^- son los iones más importantes en la generación del V_m de las células en reposo. Así surgió la **ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz** (14), que sirve para predecir el potencial de membrana teniendo en cuenta estos 3 iones:

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

Donde 61 es $2.303 RT/F$ a 37°C (R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura absoluta y F es la constante de Faraday), P corresponde 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.

La permeabilidad de los canales de Na^+ y K^+ sufre cambios rápidos durante la transmisión de un impulso eléctrico, fenómeno que no ocurre con los canales de Cl^- . Por esta razón, los cambios rápidos en la permeabilidad de los canales de Na^+ y K^+ serán los principales responsables de la transmisión de la señal eléctrica.

Después de entender estos conceptos, vamos a ver cuáles son los factores importantes que determinan el V_m en reposo:

- **Difusión de K^+** . El elevado gradiente de iones K^+ entre el interior y el exterior de la célula, hace que el K^+ salga de la célula a través de los canales de fuga.
- **Difusión de Na^+** . Los canales de fuga de K^+ también pueden dejar que difundan al exterior algunos iones Na^+ , pero generalmente los iones K^+ son 100 veces más permeables, así que el Na^+ que difunde a través de estos es mínimo.
- **Bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$** . Se produce un bombeo continuo de 3 iones Na^+ hacia el exterior de la célula por cada 2 iones K^+ que entran. Esto da lugar a una pérdida continua de cargas positivas, por lo que genera un poco más de negatividad en el interior de la célula.

Resumiendo, el mecanismo que tiene mayor contribución en la generación del V_m de reposo es la difusión de iones K^+ , y en menor medida la difusión de iones Na^+ y el movimiento producido por la bomba Na^+-K^+ . Estos mecanismos harán que el V_m de reposo medio en las células auriculares y ventriculares esté entre -80 y -90 mV (15).

Potencial de acción cardíaco y corrientes iónicas subyacentes

Tal como podemos ver en la **Figura 1**, el PA de las células ventriculares se puede dividir en las siguientes fases (16):

- **Fase 0. Despolarización.** La despolarización de los cardiomiocitos normalmente se inicia por la propagación de una corriente pasiva de una zona vecina activa. Cuando la membrana alcanza entre -80 y -60 mV (en las células ventriculares), los canales de Na^+ voltaje-dependientes se abren, permitiendo así que el Na^+ se introduzca dentro de la célula rápidamente y en consecuencia se produzca una subida rápida del V_m . Cuando el V_m alcanza los -30 mV aproximadamente, la activación de los canales de Ca^{2+} también contribuye a la despolarización de la membrana y la subida del PA.
- **Fase 1. Repolarización inicial.** Debido a la inactivación de los canales de Na^+ (I_{Na}), y a la activación de los canales de K^+ de activación e inactivación rápida (I_{to}) y el intercambiador NCX-1 (I_{NCX}) se produce una repolarización inicial. En esta fase de repolarización inicial, el NCX-1 actúa de forma inversa, es decir expulsando Na^+ debido a la despolarización de la membrana y a la elevada concentración de Na^+ que hay en el interior de la célula. Por tanto, se genera una pequeña corriente neta de salida (salen 3 Na^+ y entra 1 Ca^{2+}).
- **Fase 2. Meseta.** Después de esta pequeña repolarización inicial, el PA alcanza una meseta debido a que el flujo de entrada y salida de iones alcanza un equilibrio. Este equilibrio se debe a que la entrada de calcio a través de los $Ca_v1.2$ junto a la carga neta positiva de entrada debido a que el NCX-1 intercambia 3 Na^+ (entran) por 1 Ca^{2+} (que se expulsa), contrarrestan la corriente de repolarización producida por los canales de K^+ ultra-rápidos (I_{Kur}) y los canales de K^+ lentos (I_{Ks}).
- **Fase 3. Repolarización rápida.** El cierre de los $Ca_v1.2$ y el aumento de la permeabilidad a los iones K^+ a través de los canales de K^+ rápidos (I_{Kr}), los canales de K^+ lentos (I_{Ks}) y la corriente rectificadora I_{K1} , permite que los iones K^+ salgan

rápidamente de la célula, poniendo fin a la meseta y devolviendo a la célula a su V_m de reposo.

- **Fase 4. Potencial de membrana de reposo.** En esta fase se recuperan las concentraciones de iones intracelular y extracelular de la célula en reposo. El V_m de reposo será diferente en función del tipo de célula cardíaca.

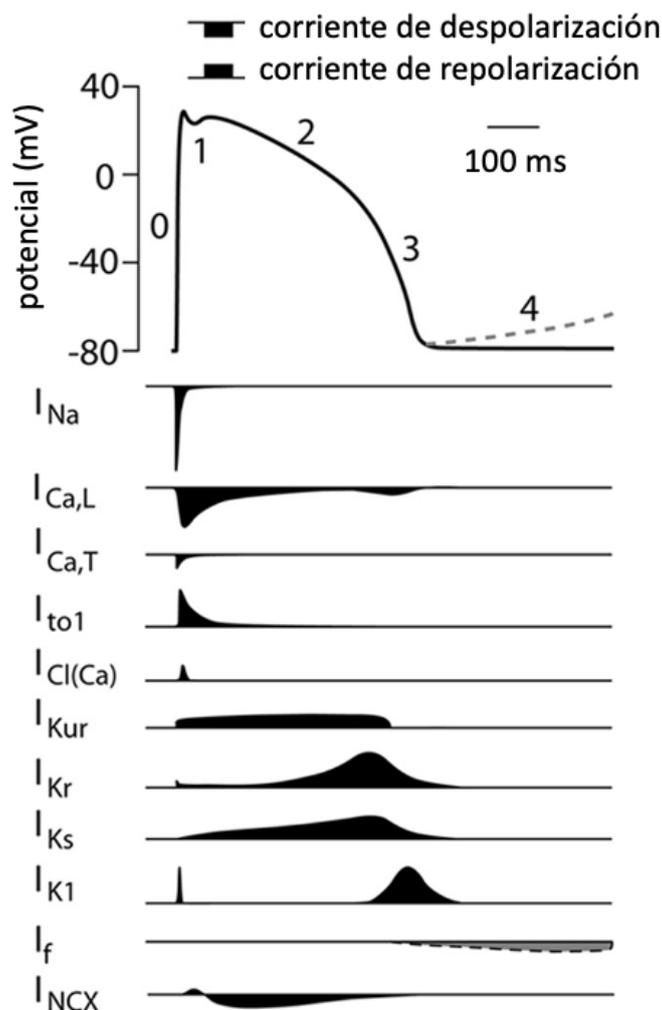


Figura 1. Representación esquemática de un potencial de acción de las células ventriculares. Los números representan las diferentes fases del potencial de acción; Fase 0: Despolarización; Fase 1: Repolarización inicial; Fase 2: Meseta; Fase 3: Repolarización rápida; Fase 4: Potencial de membrana en reposo. La línea discontinua representa la despolarización que se da normalmente en la fase 4 de las células del sistema de conducción del corazón, pero no en los cardiomiocitos ventriculares. Debajo del potencial de acción, se muestran las corrientes iónicas involucradas en cada fase del potencial de acción. Adaptada de “Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes as models for cardiac arrhythmias” por Hoekstra M, Mummery CL, Wilde AAM, Bezzina CR and Verkerk AO, 2012, *Frontiers in Physiology*, 3: 346, p.4 (17).

Tal como podemos ver en la **Figura 2**, la forma de los potenciales de acción varía en función de la región del corazón. Las células del nodo sinoatrial (SA) suelen tener un V_m de reposo entre -50 y -60 mV, y las despolarizaciones graduales producen un PA con una subida lenta y en consecuencia una velocidad de propagación local también lenta. La mayoría de los canales de Na^+ están inactivados y no participan en la fase de despolarización rápida, en estas células los canales de Ca^{2+} son los encargados de llevar a cabo esta despolarización. En la misma línea, las células del nodo atrioventricular (AV) presentan un V_m entre -60 y -70 mV, y el PA es similar al de las células del nodo SA. En las células auriculares y ventriculares el V_m de reposo está entre -80 y -90 mV y el PA tiene una despolarización muy rápida atribuida a la corriente de Na^+ , que puede llegar a alcanzar +30-50 mV. La repolarización es más rápida en las células auriculares que en las ventriculares y las células de las fibras de Purkinje. Sin embargo, la fase de meseta es más prominente en las células ventriculares. Además, la duración del PA es menor en las células epicárdicas y mayor en las células endocárdicas y miocárdicas, reflejando la diferencia en la expresión de canales iónicos en cada región (16).

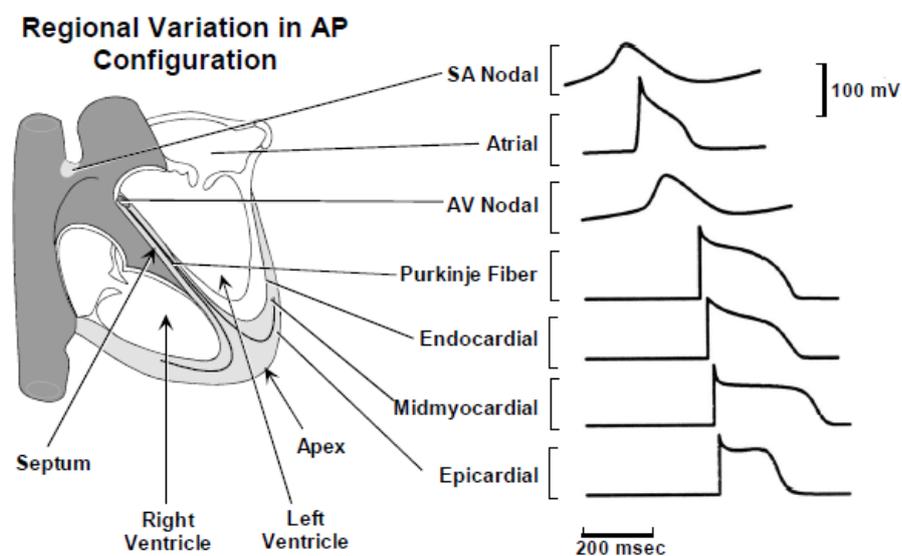


Figura 2. Variaciones regionales de la forma de los potenciales de acción. Los PA a la derecha son representativos de las diferentes formas que se observan normalmente en las regiones cardíacas indicadas. La posición que tienen estos a lo largo del eje de tiempo refleja el lapso de tiempo que pasa desde que se inicia el PA en el nodo SA. Adaptada de “Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force” 2nd Edition por Bers, Donald M. , 2001, *Kluwer Academic Press*, p.64 (16).

La larga duración del PA en los miocitos ventriculares tiene 2 funciones principales. En primer lugar, previene la re-excitación, manteniendo la membrana despolarizada, y por

lo tanto los canales de Na^+ y Ca^{2+} inactivados. Este fenómeno previene el desarrollo de una conducción anómala. En segundo lugar, la larga duración permite la relajación del músculo cardíaco antes del siguiente latido, previniendo así su tetanización que podría suponer un problema para el correcto bombeo de la sangre (16).

Generación de la señal eléctrica

Algunos tejidos deben presentar una ritmicidad espontánea para regular el latido rítmico del corazón, como es el caso de las células marcapasos ubicadas en el nodo SA. Estas células especializadas, presentan pocos canales rectificadores de K^+ , responsables en gran parte de la repolarización de las células, lo cual hace que su V_m de reposo esté entre -50 y -60 mV.

Durante décadas ha habido discusión sobre el funcionamiento de la automaticidad del nodo SA, en la que siempre competían dos conceptos para explicarla: la corriente marcapaso (I_f) y la despolarización de la membrana a través de la corriente NCX (I_{NCX}) inducida por Ca^{2+} (18). La despolarización diastólica espontánea es la base de la automaticidad de las células marcapasos, y durante muchos años se ha atribuido a las corrientes voltaje-dependientes que se producen a través de la membrana, como es el caso de I_f , una corriente de entrada de Na^+ - K^+ que se activa por hiperpolarización y está regulada por AMPc (19). El hecho de que los canales iónicos se abran y cierren en función del V_m , hace que este fenómeno se conozca con el nombre de “*voltage clock*”. Existen 4 isoformas del gen HCN (HCN1-4) que codifica para los canales f. Concretamente, la isoforma HCN4 es la que más se expresa en el nodo SA de mamíferos (20). Se han realizado estudios que demuestran que mutaciones en los canales f se asocian con una disminución de la frecuencia cardíaca (21), y que la aplicación de fármacos que inhiben los canales I_f tienen el mismo efecto (22). Por ello, la importancia de I_f en las células marcapasos del nodo SA ha ido cobrando cada vez más fuerza. Sin embargo, aunque las mutaciones en HCN4 se han asociado a una bradicardia sinusal, la frecuencia cardíaca máxima alcanzada durante la realización de ejercicio era normal (23). Este hecho evidencia que la corriente I_f no es el único mecanismo implicado en la automaticidad del nodo SA.

Estudios posteriores, identificaron liberaciones espontáneas de calcio del RS rítmicas durante la despolarización diastólica. Se propuso que estas liberaciones espontáneas de calcio rítmicas activaban el NCX-1, generando una corriente de entrada que contribuía a la

despolarización diastólica (24,25). A este mecanismo se le conoce con el término de “*calcium clock*”, y varios estudios demostraron su importancia. Uno de ellos demostró que un aumento del nivel basal de PKA en el nodo SA podría contribuir a un aumento del contenido de calcio del RS (26). Además, en otro estudio se vio que los pacientes que presentaban una delección en el exón-3 del RyR2 desarrollaban taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT), acompañada de una disfunción del nodo SA y AV, e incluso de FA (27).

Así, varios estudios evidenciaron que la automaticidad de las células marcapasos era un mecanismo complejo en el que los fenómenos de “*voltage clock*” y “*calcium clock*” actuaban de forma coordinada para asegurar el correcto funcionamiento de la actividad de las células marcapasos (28–30), y que este acoplamiento se basaba en numerosos mecanismos dependientes de voltaje, tiempo y calcio (29,30). Entre estos mecanismos, se vio la importancia de la corriente de calcio tipo L (I_{CaL}) en el reinicio y reabastecimiento del mecanismo de “*calcium clock*” (30). Así, se pudo concluir que tanto I_{CaL} como NCX-1 tienen un rol importante en los dos sistemas.

Conducción de la señal eléctrica

El latido cardíaco se inicia con un impulso eléctrico o PA generado en el nodo SA (situado en la pared supralateral de la aurícula derecha), que se propagará de forma sincronizada por todo el músculo cardíaco. Primero, a través de las vías internodulares, viajará rápidamente hasta ambas aurículas produciendo su contracción y el paso de sangre de estas hacia los ventrículos. A continuación, el impulso llegará al nodo AV, situado en la pared posterolateral de la aurícula derecha. La conducción del impulso por el nodo AV y a través de las fibras del haz de Hiss que discurren por el tabique interventricular, hace que se produzca un retraso en la conducción de más de 0.1s, permitiendo así que las aurículas vacíen su sangre hacia los ventrículos antes de que se inicie la contracción ventricular. Estas fibras del haz de Hiss discurren a lo largo del tabique interventricular dirigiéndose hacia el ápex del corazón. Al final se divide en dos ramas, izquierda y derecha, las cuales se dividen en ramas más pequeñas que se distribuyen alrededor de cada una de las cavidades ventriculares. Estas pequeñas ramas se conocen como fibras de Purkinje, las cuales penetran hasta aproximadamente un tercio del grosor de la masa muscular y la conducción en ellas es más rápida. Se continúan con las fibras musculares cardíacas, de forma que una vez el impulso ha

llegado a las fibras de Purkinje, este se propaga casi inmediatamente a las células musculares cardíacas.

Aunque el nodo SA es el que controla el latido del corazón, las fibras del nodo AV y las fibras de Purkinje pueden presentar una excitación rítmica intrínseca. La razón por la cual no son estas otras fibras las que controlan el latido cardíaco es porque su frecuencia de descarga es bastante menor a la del nodo SA. Cada vez que se produce una descarga del nodo SA, el impulso se propaga haciendo que se despolaricen las membranas del nodo AV y las fibras de Purkinje. Antes de que éstas últimas puedan alcanzar sus propios umbrales de autoexcitación se inicia un nuevo impulso procedente del nodo SA que impide que esto ocurra.

Cuando este sistema de conducción no funciona correctamente, alguna otra parte del corazón puede presentar una actividad rítmica más rápida que la del nodo SA. Incluso en algunos casos se puede dar que el músculo auricular o ventricular presente una excitabilidad excesiva y actúe como un marcapasos. Estos marcapasos localizados en lugares distintos al nodo SA se conocen como marcapasos ectópicos y generan una secuencia anormal de contracción, pudiendo llegar a producir una debilidad significativa del bombeo cardíaco (15).

ESTRUCTURA DEL CARDIOMIOCITO

Los cardiomiocitos son la unidad funcional del miocardio, tienen forma cilíndrica, su longitud puede estar entre 50-120 μm y su diámetro entre 5-25 μm . El término sarcolemma se utiliza para denominar a la membrana celular de las células musculares, así como el término sarcoplasma se utiliza para referirse al citoplasma de estas (14). A continuación, se explicará la importancia que tiene cada estructura celular en la transmisión de la señal eléctrica y la contracción.

Miofilamentos

Los miofilamentos ocupan un 45-60% del volumen celular en los miocitos ventriculares de los mamíferos. Esta proporción es menor en las células auriculares y las células especializadas en la conducción eléctrica. Los miofilamentos son la maquinaria contráctil de la célula y son el efector final en la transformación de energía química en energía

mecánica. La unidad contráctil fundamental del músculo estriado es el sarcómero, delimitado por las líneas Z (**Figura 3**).

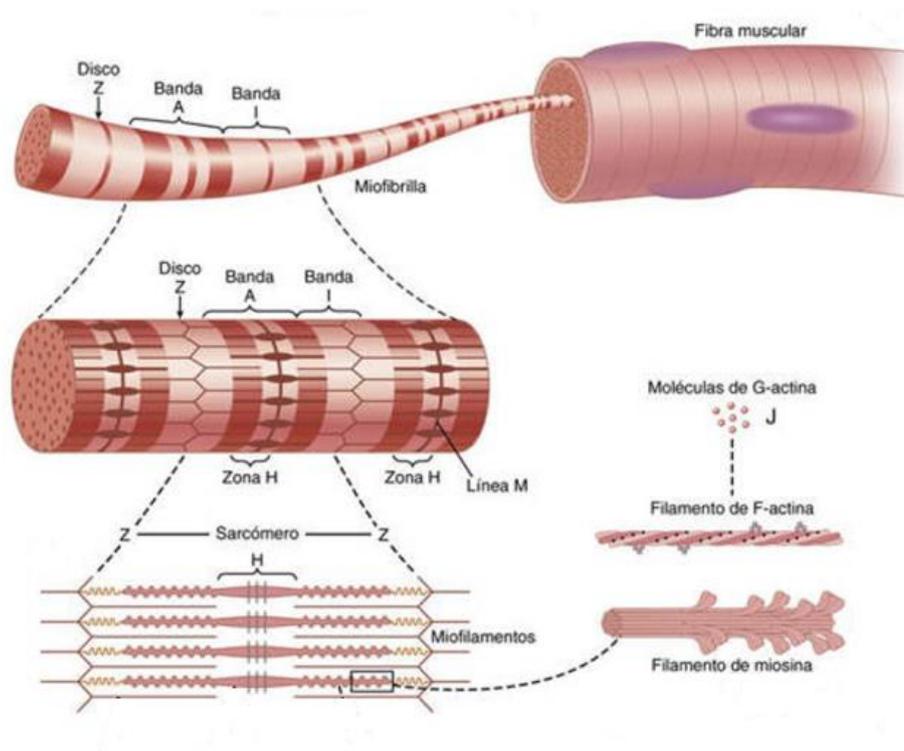


Figura 3. Organización y ultraestructura de la fibra muscular. Tomada de “Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica” 13th Edition por Hall, JE., 2016 *ELSEVIER* (15).

Los miofilamentos están compuestos por filamentos gruesos constituidos por la unión de moléculas de miosina, y por filamentos delgados constituidos por la unión de moléculas de actina. Cada filamento grueso está compuesto por aproximadamente 300 moléculas de miosina. La molécula de miosina está formada por 6 cadenas polipeptídicas: 2 cadenas pesadas (460 kDa) y 4 cadenas ligeras (**Figura 4A**). Cada cadena pesada de miosina tiene una larga cola (130 nm) dispuesta en una estructura α -helicoidal, y una cabeza con estructura globular. Las colas de las cadenas pesadas se disponen formando el eje principal del filamento (**Figura 4B**). Las cabezas son las que forman los puentes cruzados de unión al filamento delgado y contienen el lugar de hidrólisis del ATP.

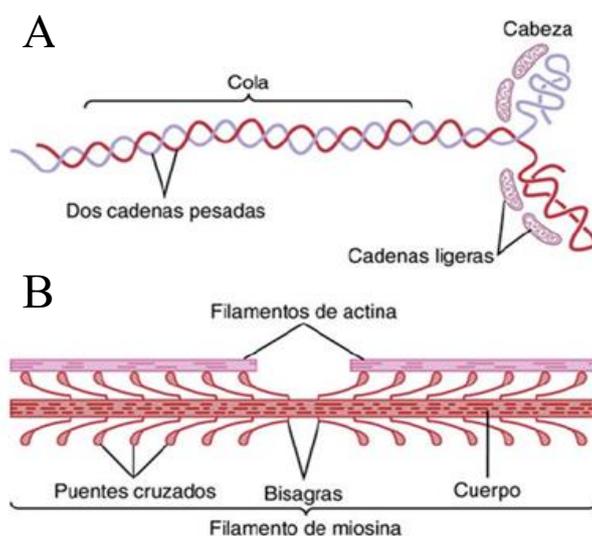


Figura 4. Estructura y disposición de las moléculas de miosina. **A)** Estructura de la molécula de miosina. **B)** Disposición de las moléculas de miosina para formar el filamento grueso y puentes cruzados con los filamentos de actina adyacentes. Adaptada de “Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica” 13th Edition por Hall, JE. , 2016 *ELSEVIER* (15).

Por otro lado, en la **Figura 5** podemos apreciar la estructura de los filamentos delgados formados por actina, tropomiosina y troponina. El eje principal del filamento delgado está compuesto por una molécula de F-actina bicatenaria, formada por 2 hebras dispuestas en una estructura α -helicoidal. Cada una de estas hebras está formada por proteínas globulares de actina G (14,15).

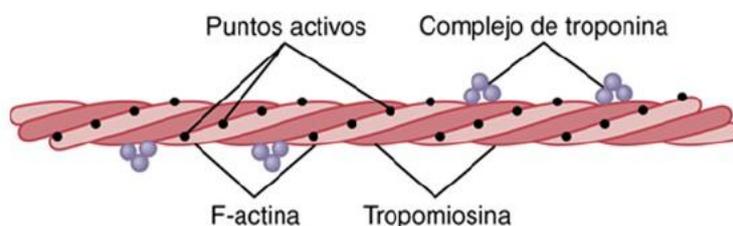


Figura 5. Estructura del filamento delgado. Podemos ver las 2 hebras helicoidales que conforman la molécula de F-actina, y cómo se disponen entre los huecos que hay entre ellas las moléculas de tropomiosina. Vemos un complejo de troponina unido al extremo de cada una de las moléculas de tropomiosina. Tomada de “Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica” 13th Edition por Hall, JE., 2016 *ELSEVIER* (15).

La tropomiosina es una proteína larga y flexible, formada por una doble cadena dispuesta también en una estructura helicoidal, que se encuentra enrollada alrededor de la hélice de F-actina. Cada 7 monómeros de actina encontramos un complejo de troponina unido a la tropomiosina. Las moléculas de troponina están formadas por 3 subunidades proteicas unidas entre sí de forma laxa, y cada una de ellas tiene una función específica en el control de la contracción muscular. La troponina I (TnI) tiene gran afinidad por la actina, la troponina T (TnT) por la tropomiosina y la troponina C (TnC) por los iones Ca^{2+} .

En reposo (**Figura 6A**), situación en la que hay una baja $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular, la TnI se encuentra unida específicamente a la actina, anclando así el complejo TnT-tropomiosina e impidiendo la interacción entre los filamentos de actina y miosina y por tanto la contracción muscular.

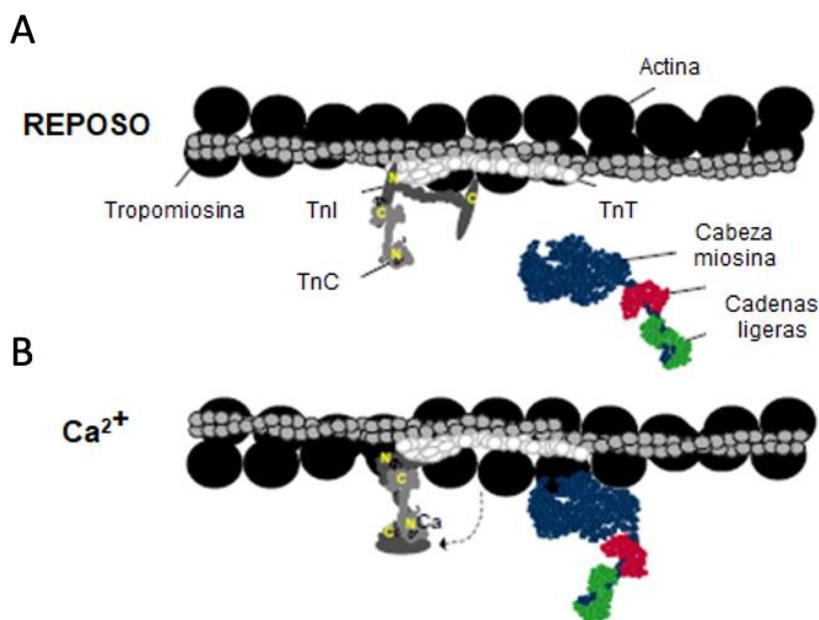


Figura 6. Interacción actina-miosina en el músculo cardíaco. **A)** Interacciones moleculares que se producen en reposo, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ es baja. **B)** Interacciones que se dan cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ aumenta. Adaptada de “Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force” 2nd Edition por Bers, Donald M. , 2001, *Kluwer Academic Press*, p.23 (16).

Cuando se produce un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular (**Figura 6B**) debido a la despolarización de la membrana celular, la TnC se une al Ca^{2+} provocando que la TnI se disocie de la actina. Este cambio hará que la TnT provoque el movimiento de la

tropomiosina, permitiendo que la miosina interactúe con la actina. Esta interacción aumenta la capacidad de la miosina ATPasa para hidrolizar el ATP y transformar la energía química en energía mecánica, produciéndose así la contracción muscular.

Sarcolema y túbulos transversos

Los túbulos transversos o túbulos T son invaginaciones del sarcolema, por lo que en su luz habrá líquido extracelular. Estos túbulos tienen un trayecto transversal a las miofibrillas, siguiendo las líneas Z. Cuando un PA se propaga por el sarcolema del cardiomiocito, los túbulos T son los encargados de transmitir rápidamente este PA hacia el interior de la célula. Sin este proceso, el PA sólo podría alcanzar el centro de la célula muscular por difusión, siendo más lento el tiempo de respuesta de esta.

Sin embargo, existen diferencias en la densidad de túbulos T en los diferentes tipos celulares del corazón de los mamíferos. Mientras que las células ventriculares poseen una elevada densidad de túbulos T organizados de forma regular en las líneas Z, las células auriculares no poseen una extensiva red de túbulos T. El pequeño diámetro que tienen las células auriculares podría explicar que, aún teniendo una baja densidad de túbulos T, esté asegurado su correcto funcionamiento (31,32).

En el sarcolema también podemos encontrar invaginaciones en forma de matraz denominadas caveolas (diámetro entre 50-80 nm). Estas contribuyen en aproximadamente un 10% a aumentar la superficie de la membrana celular, tanto en la superficie como en los túbulos T (33–35).

Finalmente, también encontramos especializaciones de la membrana en la región donde las células se unen unas con otras, que son importantes para la conexión intercelular. Entre estas especializaciones encontramos: las uniones en hendidura o *gap junctions*, la *fascia adherens* o uniones intermedias y la *macula adherens* o desmosomas.

Retículo sarcoplasmático

El RS es un compartimento intracelular, que se extiende por toda la célula formando una extensa red de membranas. Consta de 2 partes principales: las cisternas terminales que

están localizadas junto a los túbulos T, y los túbulos longitudinales que rodean las miofibrillas. En el músculo cardíaco, la unión entre el sarcolema (superficie o túbulos T) con la cisterna terminal del RS adyacente recibe el nombre de diada. Esta unión altamente especializada cuenta con estructuras puente o proteínas de unión que han recibido el nombre de “*feet*” o pilares.

El RS presenta una elevada $[Ca^{2+}]$ en su interior y es el encargado de llevar a cabo la liberación de calcio al sarcoplasma a través de los RyR2, y de su posterior recaptación a través de SERCA2a situada en su membrana.

El canal de liberación de calcio del RS o RyR2 es una proteína tetramérica grande (cada subunidad tiene un peso molecular aproximado de 560 kDa) que se encuentra localizado en la membrana del RS y se organiza con las proteínas que forman parte del “*feet*”. Concretamente, parece que están ligados mediante una matriz organizada de proteínas a los $Ca_v1.2$, situados en la membrana de los túbulos T. La relación RyR: $Ca_v1.2$ que existe en el músculo esquelético es de 1:2, mientras que en el ventrículo de los mamíferos se ha visto una relación de 4:10, dependiendo de la especie (16).

HOMEOSTASIS DEL CALCIO EN CARDIOMIOCITOS

Esquema general del acoplamiento excitación-contracción

El término acoplamiento excitación-contracción se refiere a los mecanismos que unen la excitación eléctrica del miocito con la contracción del corazón. En este proceso, el calcio juega un papel fundamental ya que es el principal mensajero para activar los miofilamentos. La activación de los miofilamentos desencadenará la contracción coordinada de los cardiomiocitos auriculares y ventriculares, dando como resultado la expulsión de sangre de estas cámaras.

El esquema general del acoplamiento excitación-contracción fue propuesto después de que los experimentos de Ringer (36) sugiriesen el importante papel del calcio como activador de la contracción. Durante el acoplamiento excitación-contracción, el PA cardíaco produce una despolarización de la membrana celular que permite la entrada de calcio al interior de la célula gracias a la activación de los $Ca_v1.2$. Este incremento de calcio intracelular

activará la liberación de calcio del RS a través de los RyR2 mediante el fenómeno conocido como CICR. De esta forma, el calcio citosólico se unirá a la TnC y se desencadenará la contracción celular. Por el contrario, para que se produzca la relajación, el calcio citosólico debe ser eliminado. Los principales mecanismos implicados en su eliminación del citosol son la reacumulación en el RS y su expulsión del cardiomiocito a través del intercambiador NCX-1 (16).

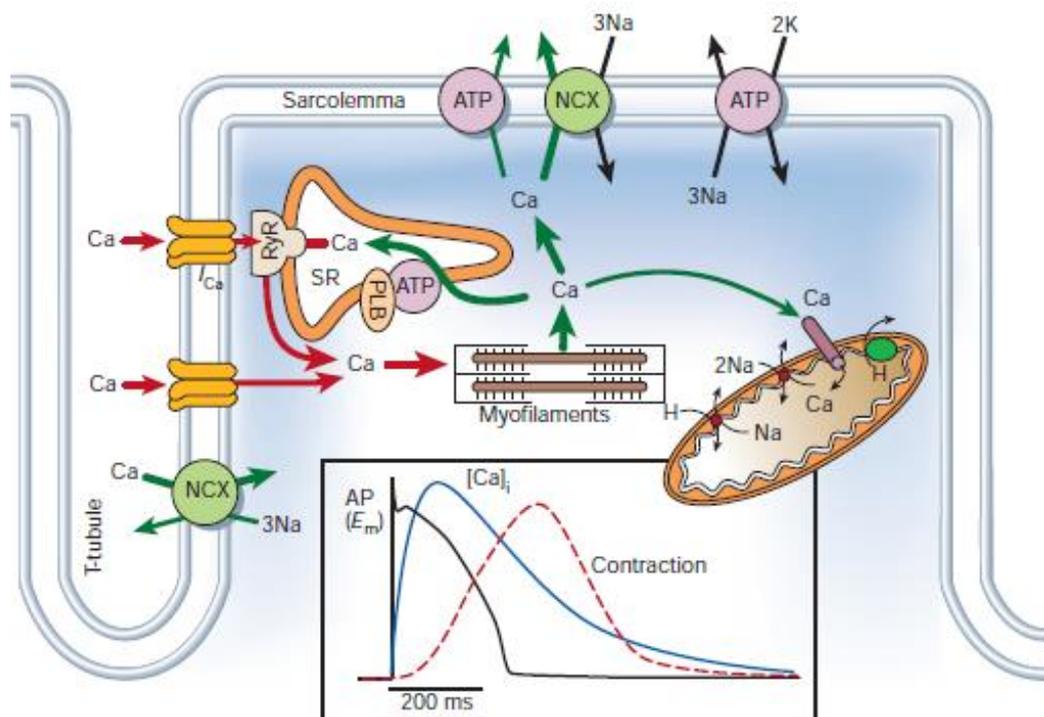


Figura 7. Esquema general de los flujos celulares de calcio. Vemos los flujos cardíacos implicados en el control de la contracción de los cardiomiocitos. En el cuadro situado en la parte inferior de la figura se muestra el curso de tiempo que pasa desde que se inicia el PA, hasta que aumenta la $[Ca^{2+}]$ transitorio y se produce la contracción. NCX: intercambiador Na^+/Ca^{2+} ; ATP: bomba ATPasa; PLB: fosfolamban; SR: retículo sarcoplásmico. Tomada de “Cardiac excitation-contraction coupling” por Bers, DM., 2002, *Nature*, 415, p.198 (2).

Este proceso implica la interacción de una serie de proteínas celulares necesarias para mantener la homeostasis del calcio. Cualquier alteración en la regulación del calcio puede jugar un papel importante en el desarrollo de disfunciones contráctiles y arritmias. En la **Figura 7** encontramos un esquema general de los principales mecanismos que intervienen en la regulación del calcio, que vamos a ir desarrollando a lo largo de este apartado.

Activación de la contracción

Cuando se produce el PA cardíaco, el miocito se despolariza (de ~ -90 mV a $\sim +20$ mV) y los $Ca_v1.2$ se abren. Esto permitirá la entrada de calcio al microdominio que se encuentra entre el sarcolema y el RS adyacente, induciendo así la liberación local de calcio del RS a través de RyR2. Fabiato (37) propuso que el flujo transmembrana de calcio desencadenaba la liberación de calcio del RS, un proceso que nombró CICR. El incremento de calcio en este microdominio va de 100 nM a 10 μ M, y es suficiente para desencadenar el mecanismo de CICR (38). Los estudios de Fabiato también demostraron que la actividad del RyR2 dependía de los niveles citosólicos de calcio, a bajas concentraciones (1-10 μ M) se producía la activación del canal, mientras que a altas concentraciones (>10 μ M) se inhibía (37,39).

Aunque la importancia del flujo de calcio que entra en la célula a través de la membrana es variable según la especie de mamífero, la mayoría de los estudios indican que la principal fuente de calcio para desencadenar la contracción proviene del RS. Los datos sugieren que entre el 70-90% del calcio que activa los miofilamentos proviene de la liberación del RS, mientras que entre el 10-30% restante deriva del flujo de calcio transmembrana durante el PA (16).

Entrada de calcio a través del sarcolema

La corriente de calcio (I_{Ca}) que se da a través del sarcolema se define como una corriente de entrada (40). Hay 2 tipos de canales de calcio en los cardiomiocitos, los $Ca_v1.2$ y los canales de calcio tipo T. Los $Ca_v1.2$ se caracterizan por presentar una gran conductancia, por su capacidad para mantenerse abiertos durante un periodo largo de tiempo, por ser sensibles a 1,4-dihidropiridinas y activarse a V_m más positivos. En cambio, los canales de calcio tipo T se caracterizan por presentar una pequeña conductancia, aperturas transitorias, insensibilidad a las 1,4-dihidropiridinas y activación a V_m más negativos (16).

La I_{CaL} es la I_{Ca} que presentan todos los miocitos cardíacos, mientras que la corriente de calcio tipo T (I_{CaT}) se describió por primera vez en células auriculares (41) y más tarde en células caninas del sistema de Purkinje (42). La elevada presencia de canales de calcio tipo T en las células marcapasos y conductoras, así como su activación a potenciales de membrana típicos de las células marcapasos, ha hecho que se realicen diferentes estudios para comprobar qué papel desempeñan en estas células (43,44). Debido a que la I_{CaT} es

relativamente pequeña y se inactiva muy rápido, el flujo de I_{CaT} total es pequeño en comparación con el flujo de I_{CaL} , y por lo tanto despreciable en la mayoría de los miocitos ventriculares. Estas diferencias, hacen que cada uno tenga su rol, donde I_{CaL} está más involucrada en el desencadenamiento de la liberación de calcio del RS.

La inactivación de la I_{CaL} es más lenta que la de I_{CaT} , pero en ambos casos depende del V_m y de la $[Ca^{2+}]$. La inactivación dependiente de V_m es relativamente lenta, de forma que el aumento de la $[Ca^{2+}]$ debido a la entrada de calcio a través del canal y a su liberación del RS es lo que contribuye en mayor medida a su inactivación. Por tanto, cuanto mayor sea la amplitud del calcio transitorio y la I_{Ca} , más rápida será la inactivación. Durante el PA, la I_{CaL} contribuye poco a la despolarización rápida de las células ventriculares y auriculares, que viene dada básicamente por el Na^+ , pero sí que es responsable de mantener la fase de meseta del PA de éstas. En cambio, en las células del nodo SA y AV la I_{CaL} e I_{CaT} contribuyen en la subida del PA, que se da de una forma más lenta que en las células auriculares y ventriculares (45).

Liberación de calcio del RS a través del RyR2

Como ya se ha comentado anteriormente, los RyR2 son los canales de liberación de calcio del RS. Encontramos 3 isoformas del receptor de rianodina en los mamíferos (RyR1-3). Los RyR2 son los que predominan en el corazón, aunque también podemos encontrar algunos RyR3 (46). Los RyR2 están localizados en clústeres y se estima que 1 clúster está formado aproximadamente por entre 10 y 300 RyRs.

La liberación de calcio del RS a través de los RyR2 se produce en la unión o microdominio que hay entre ellos y los $Ca_v1.2$ del sarcolema. Estas uniones se conocen con el nombre de diadas, y los niveles de calcio presentes en estos microdominios dependerán del flujo de calcio que entra a través de los $Ca_v1.2$ y de su eliminación a través de NCX-1, del mismo modo que servirán para regular la señalización y contractibilidad cardíaca.

Además, los RyR2 se encuentran unidos a una serie de proteínas accesorias, formando un complejo macromolecular. Las interacciones que se pueden dar entre las diferentes proteínas pueden servir para regular la actividad de los RyR2 y la propagación del calcio liberado. En este complejo macromolecular encontramos diferentes proteínas reguladoras como: calsequestrina (CSQ-2), CaMKII, proteínas de unión FK, proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA, anclada a través de mAkap), fosfatasa 1 (PP1, anclada a través

de spinofilina), fosfatasa 2A (PP2A anclada a través de PR130) y fosfodiesterasas (PDEs)(38,46).

En el lumen del RS encontramos la CSQ-2, la proteína encargada de tamponar el calcio dentro del RS, que permite su acumulación en grandes cantidades. Gracias a su baja afinidad al calcio hay alrededor de 100-500 μM de calcio libre en el lumen del RS (47). Esta proteína puede cambiar su forma de oligomérica a monomérica de forma reversible, en función de la $[\text{Ca}^{2+}]$ luminal. Cuando el lumen está lleno de calcio se encuentra en su forma oligomérica, pero cuando se produce la liberación de calcio del RS la forma oligomérica se disocia. Es entonces, cuando la forma monomérica se une al RyR2 (gracias a la proteína intermediaria triadina) e inhibe la actividad del canal (48,49).

La calmodulina (CaM) es otra importante proteína reguladora del RyR2, tanto en su forma libre de Ca^{2+} como en su forma unida al Ca^{2+} (Ca^{2+} -CaM). La unión de la Ca^{2+} -CaM al RyR también inhibe la liberación de calcio a través de este. Cuando el calcio citosólico se reduce el Ca^{2+} se disocia de CaM y CaM se disocia del RyR2, permitiendo que se pueda abrir otra vez (50). Ca^{2+} -CaM también puede activar la CaMKII, que a su vez fosforila diferentes residuos del RyR2 entre los cuales encontramos el residuo ser2808 y ser2814. Esta fosforilación aumentaría la actividad del RyR2, y por tanto la liberación espontánea de calcio (7,51).

Por otro lado, el RyR2 se une con una elevada afinidad a las proteínas de unión FK, concretamente a la isoforma FKBP12.6. Esta unión estabiliza su interacción con otras proteínas para su correcto funcionamiento (52,53). Algunos estudios propusieron que la fosforilación por PKA podía producir la disociación de la proteína FKBP12.6, de forma que aumentase la probabilidad de apertura del RyR2 y consecuentemente las liberaciones espontáneas de calcio y las despolarizaciones tardías de la membrana (DADs) inducidas por la expulsión del calcio liberado por el NCX-1 (54,55).

De la misma forma, la proteína sorcina regula la liberación espontánea de calcio uniéndose al RyR2. Este efecto inhibitorio se pierde si la proteína es fosforilada por PKA (56). Como vemos, la PKA puede fosforilar varias proteínas reguladoras del RyR2, y el resultado de ello siempre supone un incremento de su actividad. Además, al igual que pasa con la CaMKII, la PKA también es capaz de fosforilar algunos residuos del RyR2, entre los cuales los más importante son ser2808 (5,6) y ser2030 (57).

En el complejo macromolecular del RyR2 también se han identificado PDEs, siendo la PDE4D3 la más abundante. Su presencia permite que la cantidad de AMPc alrededor del

RyR2 esté bien regulada y los niveles de esta isoforma parecen estar disminuidos en condiciones patológicas (58). Finalmente, los RyR2 también están asociados a fosfatasas como PP1 y PP2, que son necesarias para llevar a cabo la desfosforilación de las proteínas y volver al estado basal de actividad (59).

En conclusión, podemos decir que la probabilidad de apertura de los RyR2 es mayor cuando aumenta la concentración de calcio citosólico, y disminuye en condiciones de reposo. Aun así, las liberaciones locales de calcio (*calcium sparks*) en reposo, nos indican que la probabilidad de apertura del RyR2 en reposo no es 0 (60). Esto sugiere que el RyR2 también libera calcio durante la fase de relajación del ciclo cardíaco, produciéndose una fuga de calcio diastólica. En condiciones fisiológicas, la fuga de calcio diastólico funciona como una “válvula” que regula el nivel de calcio luminal en el RS. Por tanto, podemos decir que la probabilidad de apertura del RyR2 no sólo depende de la concentración de calcio que entra a la célula, sino también del calcio luminal del RS. Como hemos visto desglosando las diferentes proteínas reguladoras, la probabilidad de apertura del RyR2 puede verse afectada por la fosforilación de diversas proteínas y/o residuos. En condiciones patológicas, la excesiva liberación de calcio en forma de *calcium sparks* u ondas de calcio (*calcium waves*) producida por un elevado contenido de calcio luminal y/o por la fosforilación del RyR2, puede contribuir a la generación de arritmias adquiridas o hereditarias (61,62).

Eliminación de calcio del citosol

Después de que se produzca la contracción cardíaca inducida por el incremento del calcio citosólico, este debe ser eliminado del citosol rápidamente para que se produzca la relajación. La expulsión de calcio de la célula a través del NCX-1 y su recaptación al RS a través de SERCA2a son los mecanismos principales de eliminación de calcio. Aun así, hay otros mecanismos minoritarios que también participan en la eliminación de calcio del citosol, como son la expulsión de calcio por una Ca^{2+} -ATPasa situada en el sarcolema (PMCA) y la recaptación de calcio por las mitocondrias (38,63).

Transportador	% de contribución a la eliminación de Ca^{2+}
Bomba Ca^{2+} -ATPasa-SL	0.86 %
Transporte activo mitocondria	0.62 %
Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	30 %
Bomba Ca^{2+} -ATPasa RS	68.5 %
4 sistemas	100 %

Tabla 2. Contribución de los diferentes transportadores de calcio a la relajación en miocitos ventriculares de conejo. SL es sarcolema. Tabla modificada de “Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force” 2nd Edition por Bers, Donald M. , 2001, *Kluwer Academic Press*, p.54 (16).

Recaptación de calcio por SERCA2a

La recaptación de calcio al RS está mediada por la bomba SERCA, que utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para llevar a cabo su función, transportando 2 moléculas de Ca^{2+} por cada hidrólisis de ATP. Se han identificado 3 isoformas (SERCA1-3) que difieren en su afinidad por el calcio y su capacidad de transporte. SERCA2a es la isoforma mayoritaria en el corazón (64,65).

SERCA2a recicla el calcio del citosol devolviéndolo de nuevo al lumen del RS, mecanismo que ayuda a mantener el nivel de calcio citosólico bajo (alrededor de 100 nM) y el contenido de calcio en el RS alto. Por tanto, podemos decir que existe un elevado gradiente entre el RS y el citosol de la célula. Esto permite que se produzca una rápida liberación de calcio desde el RS cuando los RyR2 se abren, pero también resulta en una fuga constante hacia el citosol a través de los pocos RyR2 que se abren de forma espontánea en reposo (65).

La actividad de SERCA2a depende de varios factores como la concentración citoplasmática de calcio y del contenido de calcio del RS. Cuanto mayor sea la concentración en el citoplasma, mayor será la actividad de SERCA2a. En cambio, a mayor concentración de calcio en el RS, mayor será el gradiente contra el que SERCA2a deberá bombear, por lo que disminuirá su actividad (65).

La actividad de SERCA2a también está regulada por fosfolamban (PLB). Se trata de una proteína transmembrana inhibidora asociada a SERCA2a, que puede modular la actividad de esta última en función de su estado de fosforilación. En su forma inactiva, el PLB está fosforilado y presenta una forma pentamérica. Su fosforilación previene la

interacción con SERCA2a, aumentando la actividad de la bomba y la acumulación de calcio en el RS (38). El resultado de este aumento en la recaptación de calcio facilita la relajación (efecto lusitrópico) y aumenta la posterior contracción (efecto inotrópico)(66). En cambio, en su estado desfosforilado, se despolimeriza y los monómeros de PLB se unen a SERCA2a, inhibiendo su actividad (67). PLB suele presentar su forma desfosforilada cuando la célula está en reposo.

PLB se puede fosforilar en 3 lugares: Ser-16 por PKA, Thr-17 por CaMKII y Ser-10 por proteína quinasa C (PKC), facilitando así su regulación por diferentes vías de señalización (65,68). Además, CaMKII está presente en un complejo multiproteico con SERCA2a, por lo que la puede fosforilar directamente, potenciando así su actividad (69–71).

Expulsión de calcio de la célula por NCX-1

NCX-1 es la isoforma cardíaca de este intercambiador. Es el responsable de expulsar aproximadamente la misma cantidad de calcio que entra a través de los $Ca_v1.2$ (72). La función del NCX depende del gradiente electroquímico, por lo que normalmente expulsará 1 ion Ca^{2+} e introducirá 3 iones Na^+ , generando así una corriente de entrada (I_{NCX}). Sin embargo, cuando la concentración de Na^+ es elevada en el interior de la célula y/o la célula está despolarizada, puede actuar de forma contraria. En este último caso, expulsaría 3 iones Na^+ e introduciría 1 ion Ca^{2+} , produciendo una corriente de salida (E_{NCX})(38).

En conclusión, el mantenimiento de los gradientes de Na^+ y Ca^{2+} extra e intracelular es crítico en la regulación de la actividad de NCX-1. En particular, el Na^+ intracelular debe mantenerse bajo para el correcto funcionamiento de NCX-1. Esto es posible gracias a la bomba Na^+ -ATPasa que expulsa el Na^+ que ha entrado durante el PA (73–75).

NCX-1 puede ser fosforilado por PKA y PKC (76,77). Además, interacciona con diferentes proteínas accesorias entre las cuales encontramos fosfoleman, que tiene un efecto inhibitorio (78,79). En el complejo macromolecular de NCX se ha identificado PKA con su proteína de anclaje mAKAP, PKC, PP1 y PP2 (80). Esto sostiene una robusta teoría de que estas pueden fosforilar y regular la actividad de NCX y fosfoleman.

Mecanismos minoritarios: bomba Ca^{2+} -ATPasa del sarcolema y recaptación mitocondrial

La función principal de PMCA es expulsar iones de Ca^{2+} de la célula a cambio de protones (H^+). Hay 4 isoformas de PMCA (PMCA1-4), de las cuales PMCA1, PMCA4 y en menor medida PMCA2, son las que se han detectado en el músculo cardíaco (81). Puesto que PMCA ha presentado una alta afinidad al calcio pero una baja velocidad para transportarlo, se piensa que participa sutilmente en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular durante la diástole, y que su contribución en la expulsión del calcio es minoritaria (82). Sin embargo, se han realizado experimentos con un bloqueador PMCA específico (carboxiosina)(83) y se ha visto que PMCA también es importante en la relajación de los miocitos ventriculares de hurón, conejo, rata, cobaya y ovejas (84–86). PMCA también puede afectar al contenido de calcio del RS y a la amplitud del calcio transitorio en miocitos ventriculares de rata, hurón y cobayas (85,87,88).

El calcio mitocondrial desempeña un papel cuantitativo muy pequeño en los flujos de calcio asociados al acoplamiento excitación-contracción. Aun así, el calcio puede ser importante para la función mitocondrial y energética. El calcio entra en las mitocondrias mediante transporte activo, gracias a un gran gradiente electroquímico generado por la extrusión de protones vinculada al paso de electrones por el sistema citocromo en la cadena respiratoria (16). Además, se ha descrito la existencia de un microdominio RS-mitocondria gracias al cual se produce un movimiento importante de calcio entre estos dos compartimentos que puede regular varios procesos. El calcio puede transferirse directamente desde el RS a las mitocondrias y controlar funciones mitocondriales clave como la apoptosis y la generación de energía (89). Por otro lado, la captación local y rápida de calcio por parte de la mitocondria puede prevenir el aumento excesivo de calcio citosólico y controlar la señal de calcio para que sólo se produzca localmente (90). La transferencia efectiva de calcio entre el RS y la mitocondria está mediada por un complejo de múltiples proteínas, entre las cuales encontramos el RyR2 (91), el canal aniónico voltaje-dependiente (VDAC) unido a IP3R (92) o la mitofusina (93).

REGULACIÓN NEURO-HORMONAL DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR

Los receptores acoplados a proteínas G juegan un papel muy importante en la regulación de la función cardíaca, razón por la cual muchos de ellos son la diana de varias terapias farmacológicas. Dentro de este grupo encontramos los receptores adrenérgicos, colinérgicos y purinérgicos, entre otros.

Receptores adrenérgicos

El sistema nervioso simpático induce el incremento de la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico positivo), aumenta la contractibilidad cardíaca (efecto inotrópico positivo), aumenta la relajación cardíaca (efecto lusitrópico positivo), acelera la conducción AV (efecto dromotrópico positivo), disminuye la capacitancia venosa y aumenta la resistencia periférica. Estos fenómenos se producen con el objetivo de preparar al corazón para una situación de estrés, y están mediados por la unión específica de las catecolaminas (adrenalina o noradrenalina) a los receptores adrenérgicos (94,95).

Se han identificado varios subtipos de receptores adrenérgicos: los receptores α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), los receptores α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) y los receptores β (β_1 , β_2 , β_3) (96). Las proteínas G acopladas a estos receptores actúan estimulando (proteína Gs) o inhibiendo (proteína Gi) la enzima adenilil ciclasa (AC), o bien activando (proteína Gq) la fosfolipasa C (PLC).

El corazón humano expresa receptores β_1 y β_2 en una ratio 70:30, y su activación aumenta la actividad cardíaca. También tiene receptores β_3 , que suelen estar inactivos en condiciones fisiológicas. Los receptores β_1 activan proteínas Gs, mientras que los β_2 pueden activar tanto proteínas Gs como Gi (97). La estimulación de los receptores β por parte de las catecolaminas tiene como resultado final la disociación del ATP en AMPc. Este último, a su vez, se unirá a la PKA que puede fosforilar varias dianas, entre las cuales encontramos los $Ca_v1.2$ (98), los canales f (99), PLB (en ser16)(100), RyR2 (en ser2808 o ser2030)(57,101), la TnI y la proteína C de unión a la miosina (100).

El corazón humano también presenta receptores α_1 aunque en menor medida que los β (20%). Su expresión en las arterias más importantes juega un papel fundamental en la regulación del flujo sanguíneo. La activación de los receptores α_1 incrementa la concentración intracelular de calcio así como la sensibilidad de los miofilamentos al calcio, resultando en un efecto inotrópico positivo y un modesto efecto lustrópico negativo (102).

Por otro lado, la estimulación de los receptores α_2 (acoplados a proteínas G_i) presentes en el músculo liso vascular hace que se produzca una vasoconstricción transitoria. En cambio, la activación de los α_{2A} centrales inhibe el tono simpático a nivel central, disminuyendo la presión arterial. Además, la liberación de noradrenalina por las fibras nerviosas simpáticas está controlada a nivel presináptico por los receptores α_{2A} y α_{2C} (103).

Receptores colinérgicos

El sistema nervioso parasimpático, cuyo principal neurotransmisor es la acetilcolina (ACh), regula la función del sistema cardiovascular actuando en los receptores muscarínicos (M1-M5)(104). Los receptores M1 y M3 se expresan en el endotelio y en las células del músculo liso vascular (105), donde pueden actuar produciendo una vasodilatación o vasoconstricción en función del balance del tono vascular (106). Se ha visto que los M1 y M3 también se expresan en corazón, aunque en menor medida que los M2 (107).

Varios estudios han demostrado la presencia de receptores M2 en el corazón humano, concretamente parece que su expresión es 2.5 veces superior en aurícula que en ventrículo (108). La estimulación de los M2 tiene un efecto directo e indirecto en la función de los canales iónicos. Por un lado, el efecto directo resulta en una hiperpolarización que disminuye la frecuencia cardíaca y dificulta la conducción del impulso a través del nodo AV. Por otro lado, se ha visto que pueden modular de forma indirecta la respuesta dependiente de AMPc activada por la estimulación de los receptores β (107). También podemos encontrar M2 en el endotelio de los vasos coronarios, donde tendrían un efecto vasodilatador (109).

Receptores purinérgicos

La adenosina (ADO) interviene en la señalización de varias funciones biológicas, fisiológicas y patológicas actuando en 4 receptores diferentes: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 (110). Los receptores A_1 y A_{2A} parecen ser los que tienen un papel más importante en la regulación de la función cardíaca, aunque también regulan la función vascular. En cambio, los receptores A_{2B} y A_3 parecen tener su papel en la regulación de la función vascular (111). La activación de los receptores A_1 produce un efecto cronotrópico e inotrópico negativo (112).

En cuanto a los receptores A_{2A} , estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la aurícula derecha humana expresaba receptores A_{2A} , y que su estimulación inducía un

aumento de liberaciones espontáneas de calcio del RS mediado por PKA (113). Por otro lado, algunos estudios documentaron que niveles elevados de ADO durante un proceso isquémico podrían contribuir al inicio de la FA (114). De acuerdo con esto, otro estudio de nuestro laboratorio demostró que los pacientes con FA presentaban una mayor expresión de receptores A_{2A} , sugiriendo que podría ser un mecanismo que indujese la arritmia a través del aumento de las liberaciones espontáneas de calcio del RS por encima del nivel basal. Además, también se observó un cambio en la señalización de los A_{2A} en pacientes sin FA pero con dilatación auricular similar a la remodelación que presentan los pacientes con riesgo de FA, sugiriendo que los cambios en la expresión de A_{2A} que influyen en la regulación del calcio podrían preceder a la FA (5).

MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS Y FACTORES ETIOLÓGICOS PARA EL DESARROLLO DE FIBRILACIÓN AURICULAR

En cuanto a los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan la FA, primero debemos conocer que el ritmo cardíaco normal muestra una descarga de impulsos rítmicos regulares en el nodo SA, seguido de la activación auricular y ventricular. Cualquier alteración en la formación o conducción de este impulso puede producir arritmias cardíacas (115). Entre los principales mecanismos fisiopatológicos para el desarrollo de FA que iremos desarrollando a continuación, encontramos: la actividad ectópica focal, la presencia de sustratos de reentrada eléctrica funcionales y la presencia de sustratos de reentrada eléctrica físicos.

Mecanismos arritmogénicos

Actividad ectópica

En la **Figura 8** tenemos representados los mecanismos que pueden producir actividad ectópica focal en la aurícula: automaticidad auricular, DADs y despolarizaciones espontáneas de membrana tempranas (EADs).

Como ya se ha desarrollado anteriormente, las células auriculares normales presentan un V_m de reposo de -80 mV, y al producirse la despolarización se vuelve muy positivo. Después, gracias a diferentes fases de repolarización, vuelven al V_m de reposo en el que permanecen hasta el siguiente PA (116).

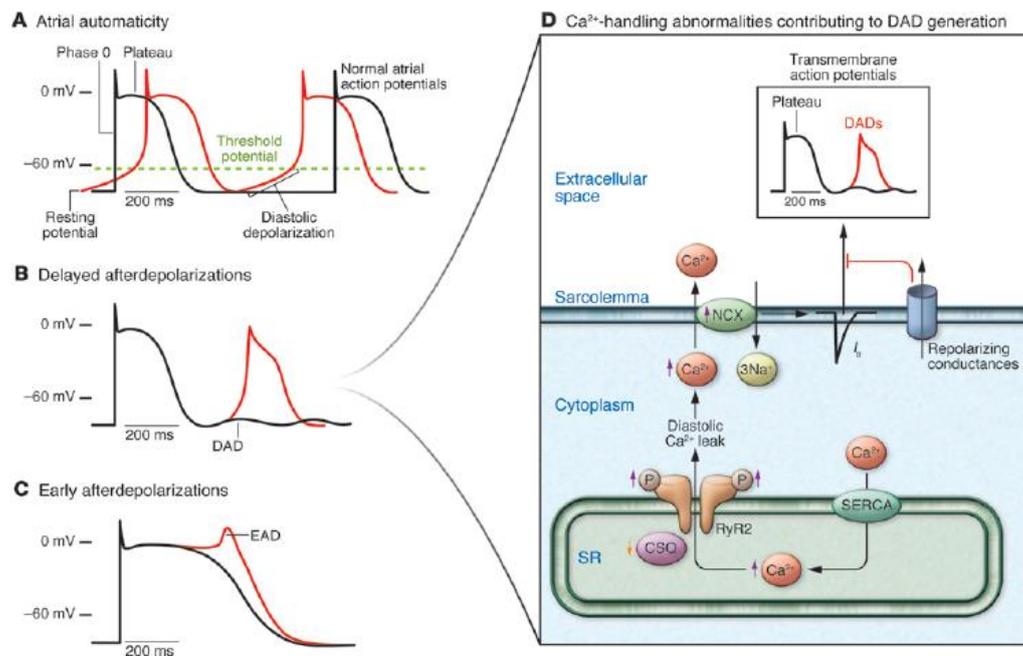


Figura 8. Mecanismos celulares que contribuyen a la aparición de focos ectópicos. **A)** El registro en **negro** corresponde con los PA normales en las células auriculares, y el registro en **rojo** corresponde con la actividad automática auricular anormal resultado de una despolarización diastólica espontánea que llega al umbral de descarga y desencadena un PA. **B)** DADs: despolarizaciones espontáneas de la membrana anormales después de la repolarización completa. **C)** EADs: despolarizaciones espontáneas de la membrana anormales que se producen antes de que se haya completado la repolarización. **D)** Se muestran los principales mecanismos que contribuyen a la generación de DADs. Tomada de “Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation” por Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D and Nattel S. 2011, *Journal of Clinical Investigation*, 121, p.2957 (116).

La actividad automática se da cuando hay un aumento en el tiempo de despolarización. Esto puede producirse por las corrientes de entrada de Na^+ o Ca^{2+} (aumentando las cargas positivas en el interior de la célula), o cuando hay una disminución de la corriente de repolarización producida por la salida de iones K^+ (disminuyendo las cargas positivas que salen del interior de la célula). En estos casos será más fácil alcanzar el umbral de descarga y que se produzca actividad automática. Si la descarga automática se produce antes del latido normal (sinusal), resulta en una activación ectópica auricular (116).

Las DADs (**Figura 8B-D**) son unos de los mecanismos más importantes en la aparición de arritmias auriculares focales. Cuando el calcio entra a la célula a través de los $Ca_v1.2$ durante la fase de meseta del PA, se desencadena una liberación de calcio del RS a través del RyR2. Esta liberación de calcio sistólica es la responsable de la contracción cardíaca. Durante la relajación cardíaca diastólica, la repolarización de la célula se produce cuando el calcio se elimina del citosol por SERCA2a y NCX-1. Las DADs son el resultado de una liberación espontánea de calcio del RS durante la fase diastólica, después de la repolarización (117). Parte del calcio liberado espontáneamente, será expulsado a través de NCX-1 intercambiando 1 ion de Ca^{2+} por 3 de Na^+ , creando una corriente de entrada transitoria o I_{TI} de una carga positiva por cada ion de Ca^{2+} que da lugar a una DAD. Las DADs con una amplitud suficientemente grande para alcanzar el umbral de descarga de los canales de Na^+ , generaran focos ectópicos. Si las DADs se producen de forma repetitiva es fácil que se produzcan taquicardias auriculares.

Las liberaciones espontáneas de calcio del RS pueden ser resultado de una sobrecarga de calcio en el RS o de una disfunción del RyR2. La excesiva fosforilación del RyR2 hace que aumente su probabilidad de apertura, y que por tanto haya más posibilidad de que se produzcan liberaciones espontáneas capaces de inducir arritmias. Por otro lado, la pérdida o disfunción de CSQ-2, también hace que los RyR2 liberen calcio con más facilidad (118).

Una prolongación excesiva de la duración del PA, hace que los canales de calcio tengan tiempo de recuperarse de su inactivación y permite que se pueda dar otra corriente de entrada de Ca^{2+} durante el PA, lo que produciría un EAD (**Figura 8C**). La producción de EADs hace que aumente el umbral de descarga de las células adyacentes, permitiendo que estas se despolaricen y se produzca un foco de actividad ectópico (119).

Mecanismos de reentrada

Para que se produzca un fenómeno de reentrada eléctrica tiene que haber un sustrato vulnerable a este fenómeno en el tejido. Los sustratos vulnerables de reentrada pueden estar causados por alteraciones electrofisiológicas o por un remodelado estructural del tejido.

El tejido cardíaco presenta un periodo refractario, que hace referencia al intervalo después del último PA en el que el tejido es inexcitable y que depende de la duración del PA. Si nos fijamos en la **Figura 9A-C**, se muestra un latido prematuro que surge en el punto “i”. Este impulso es conducido hacia el punto “ii” que ya no se encuentra en periodo refractario,

de forma que sigue su camino hacia el punto “iii”. Pero al llegar al punto “iii” la conducción se bloquea porque todavía se encuentra en periodo refractario, de forma que no se produce el fenómeno de reentrada. En condiciones normales, el tiempo de conducción desde el punto “i” al punto “iii” es más corto que el periodo refractario, por ello no se perpetuará este impulso (**Figura 9A**).

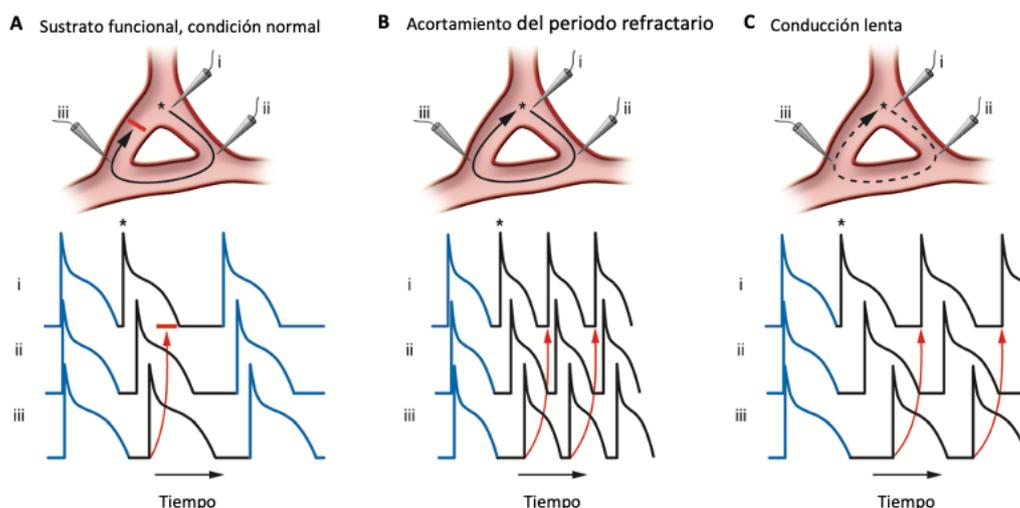


Figura 9. Factores electrofisiológicos que promueven el fenómeno de reentrada. A) Tejido auricular normal que no permite que se produzca el fenómeno de reentrada. **B)** Fenómeno de reentrada producido por un acortamiento del periodo refractario. **C)** Fenómeno de reentrada producido por una conducción lenta. Adaptada de “Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation” por Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D and Nattel S. 2011, *Journal of Clinical Investigation*, 121, p.2958 (116).

En cambio, en la **Figura 9B** podemos ver que cuando se produce una disminución de la duración del PA, el periodo refractario también se ve reducido. Esto hará que se restaure la excitabilidad antes y que al llegar el impulso al punto “iii” se produzca una reentrada en el circuito y se perpetúe en el tiempo. Por otro lado, en la **Figura 9C** se puede apreciar que la reducción en la velocidad de conducción del impulso, sin necesidad de un acortamiento en la duración del PA, también puede favorecer el mecanismo de reentrada. Una velocidad lenta de conducción del impulso proporciona un tiempo adicional para que se acabe el periodo refractario en la región “iii”, y que por lo tanto al llegar a esta zona el tejido sea excitable y se desencadene el mecanismo de reentrada (116).

En la **Figura 10** se muestra un sustrato vulnerable de reentrada físico debido a un remodelado estructural. La dilatación auricular junto a la presencia de tejido fibrótico hace

que las vías de conducción se alarguen y que por lo tanto la conducción de los impulsos por estas sea más lenta. Estas remodelaciones del tejido ponen barreras a la conducción que favorecen la iniciación y mantenimiento de múltiples circuitos de reentrada irregulares que perpetúan la FA (120).

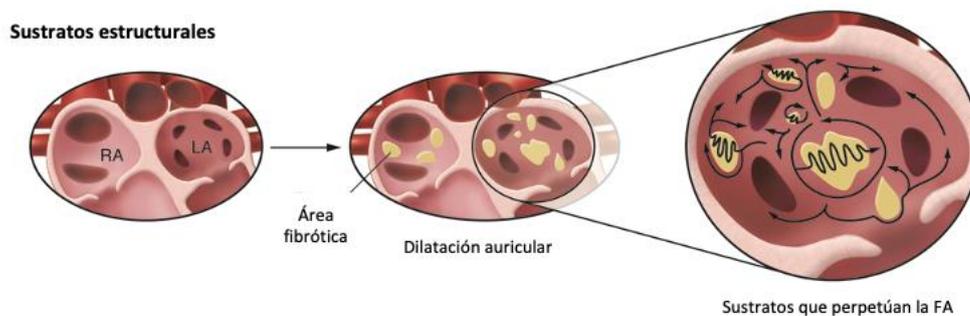


Figura 10. Remodelado estructural del tejido que promueve el fenómeno de reentrada. Diferentes condiciones cardíacas producen sustratos estructurales de reentrada caracterizados por fibrosis y dilatación auricular. Adaptada de “Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation” por Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D and Nattel S. 2011, *Journal of Clinical Investigation*, 121, p.2958 (116).

Factores etiológicos

Para comprender mejor la enfermedad, debemos tener en cuenta los principales factores etiológicos (enfermedades cardíacas, factores extracardíacos y determinantes genéticos), y estudiar como pueden éstos influir y desencadenar los principales mecanismos fisiopatológicos (actividad ectópica, sustratos de reentrada funcionales y sustratos de reentrada físicos) para el desarrollo de FA. En la mayoría de los pacientes, la aparición de esta arritmia es el resultado de la contribución de múltiples factores que actúan de forma simultánea.

El 70% de los casos están asociados a enfermedades cardíacas (121). La edad es uno de los factores de riesgo más importantes, mayoritariamente debido al remodelado estructural que se produce (122,123). El fallo cardíaco congestivo, la hipertensión, las alteraciones en las válvulas cardíacas y las enfermedades coronarias son factores que contribuyen de forma habitual (123). Hay otros factores predisponentes menos comunes como la pericarditis/miocarditis, los mixomas auriculares y la cardiomiopatía hipertrófica.

Por otro lado, tenemos factores extracardíacos que también contribuyen a la aparición de FA. Entre ellos, encontramos el consumo excesivo habitual de alcohol (124), el hipertiroidismo (125), la apnea del sueño, la obesidad (126) y el tono del sistema nervioso autónomo (127).

Variantes genéticas que pueden afectar a la homeostasis del calcio y predisponer a la aparición de fibrilación auricular

Excepto mutaciones puntuales en los genes que codifican para diferentes canales iónicos que se han asociado a la FA familiar, que solamente explican una minoría de los casos de FA (<10%)(9,128,129), se desconocían los factores genéticos que podían influir en la aparición de FA. Gracias a estudios recientes de GWAS la información sobre la predisposición genética a padecer FA ha aumentado exponencialmente. Así, se ha relacionado la FA con diferentes locus de SNPs en las regiones cromosómicas 4q25, 1q21 y 16q22, entre otras (11,130). Meta-análisis más recientes han ampliado el número de variantes de riesgo (10,131–135). Aún así, todavía queda mucho trabajo por delante para determinar qué mecanismos fisiopatológicos están detrás de todos los SNPs que se han asociado a la FA.

El *odds ratio* (OR) del riesgo que confiere tener un SNP está entre 1.2 y 1.7. Sin embargo, estos SNP son relativamente comunes entre la población, y dado que ya se conocen más de 100 variantes hay un número elevado de individuos que son portadores de varios alelos de riesgo, por lo que se podría esperar que en estos casos el OR fuese superior (10). Estos estudios nos han proporcionado un punto de partida muy importante a partir del cual podemos estudiar los mecanismos moleculares que están detrás de esta asociación. Además, es importante que también se valore la interacción que puede haber entre las variantes, para poder entender mejor los mecanismos claves en el desarrollo de la FA e identificar las combinaciones de variantes con OR más elevados.

Variantes de la región cromosómica 4q25

En la región 4q25, los SNPs relacionados con la FA están localizados en una región intergénica en la que no se conoce ningún gen. Esto sugiere que su efecto podría estar mediado por genes próximos. Entre ellos, el gen candidato más próximo es PITX2 que

codifica para un factor de transcripción crucial durante el desarrollo cardíaco. El factor de transcripción Pitx2c está involucrado en la determinación de la asimetría izquierda-derecha del corazón (136,137). Además, PITX2c suprime la formación del nodo SA en la aurícula izquierda durante el desarrollo, y también es crucial para la formación del miocardio de la vena pulmonar (138,139).

Un estudio reciente con ratones Pitx2c *knock-out* sometidos a una estimulación programada, ha mostrado que los ratones adultos presentan mayor incidencia de arritmias auriculares. Estudios de microarrays e “*in situ*” apuntan a que PITX2c está involucrado de forma directa, junto a otros genes, en la formación del nodo SA (140). Por otro lado, el rol de PITX2 en el desarrollo de la aurícula izquierda y las venas pulmonares encaja con los hallazgos de algunos estudios, en los que se demuestra que el inicio de la FA paroxística en algunos casos viene dado por focos ectópicos originados en el miocardio de la vena pulmonar (141). Esto ha llevado a que cada vez sea más frecuente el aislamiento de venas pulmonares como tratamiento de FA (142).

Por ello, se postuló que la disfunción de PITX2c podría ser responsable del desarrollo de FA (130). Estudios de diferentes laboratorios, incluido el nuestro, evidencian que la pérdida de función de PITX2c predispone a la arritmogénesis auricular (140,143,144) y provoca alteraciones en la homeostasis del calcio (145).

Aunque se han identificado muchos SNPs, parece que las variantes arritmogénicas más importantes están localizadas en 4q25 (12), y se ha descrito que algunas de ellas aumentan el riesgo de tener FA recurrente después de la ablación por catéter (146,147), así como pueden afectar al efecto de los tratamientos antiarritmogénicos (148).

Además, un estudio de nuestro laboratorio demostró que los portadores de la variante de riesgo rs13143308T presentaban un aumento en la expresión de SERCA2a y un aumento de la fosforilación del RyR2 en el residuo ser2808 respecto a la variante normal rs13143308G. Esta modificación en las proteínas reguladoras del calcio en pacientes portadores de la variante de riesgo, tuvo como resultado un incremento en la frecuencia de liberaciones espontáneas de calcio, I_{TS} y DADs, lo cual podría desencadenar actividad eléctrica espontánea e inducir la aparición de FA (13).

Variantes de la región cromosómica 1q21

También se han identificado variantes localizadas en la región 1q21 que parecen estar asociadas a mayor riesgo de padecer FA. El SNP rs13376333 está en el intrón 1 del gen KCNN3 (149) que codifica para los canales SK3, también conocidos como KCa2.3.

Se conocen 3 isoformas de canales SK (SK1-3), codificados por la familia de genes KCNN, y las 3 se han identificado en el corazón de humanos y ratones (150,151). Sin embargo, se ha visto que la expresión de canales SK en humano es mayor en células auriculares que en ventriculares, y que la expresión de SK2 y SK3 en aurícula es mayor que la de SK1 (152).

En un modelo de conejo de estimulación en ráfaga, el bloqueo farmacológico de estos canales resultó en una inhibición de la estimulación inducida y un acortamiento de la duración del PA de las aurículas y venas pulmonares (153). El acortamiento de los PA auriculares, hace que se reduzca el periodo refractario de los miocitos, predisponiendo el desarrollo y mantenimiento de la FA (119). A pesar de esto, en este modelo no se detectó un cambio en la expresión de KCNN3. Sin embargo, sí que se vio un incremento en la expresión de KCNN2 (153). El enlace funcional de estos 2 canales podría explicarse por el co-ensamblaje heteromultimérico formado por complejos de KCNN2 y KCNN3 (154). Este co-ensamblaje puede ser importante, ya que se ha visto en ratones que cuando hay un incremento en la expresión de KCNN2 se produce una alteración de la duración del PA, afectando a las células marcapasos así como a la actividad espontánea (155), y aumentando la presión arterial (156).

Por esta razón, el KCNN3 es un potencial candidato de estar involucrado en la fisiopatología de la FA, y podría ser una interesante diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad. Se ha demostrado en varios modelos animales que la inhibición de los canales de la familia SK puede ayudar a acabar con la FA y a proteger contra la aparición recurrente de esta (157).

Otras variantes de riesgo asociadas a la FA

En estudios de GWAS realizados entre 2007 y 2018 se identificaron muchos nuevos *loci* relacionados con la FA (12,130–134,149). Uno de los hallazgos importantes fue la identificación del locus *TIN* que codifica para la titina, una proteína esencial para la estructura de los sarcómeros del tejido muscular. Su expresión en el corazón es muy elevada,

tanto en aurículas como ventrículos. Por eso, una disfunción de la titina podría alterar la estructura de los cardiomiocitos (158).

Por otro lado, otro hallazgo interesante fue el descubrimiento de variantes localizadas en loci del gen *KCNN2*, que codifica para los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , concretamente para la isoforma SK2. Los SK2 pueden formar complejos con SK3, codificados por el gen *KCNN3* asociado previamente a FA en estudios de GWAS anteriores (149). Varios grupos están desarrollando bloqueantes de los canales SK2 como potencial tratamiento para la FA (159–161).

Finalmente, Roselli et al. (134) apuntan al gen *SCN5A* que codifica para los canales de Na^+ más importantes en el tejido cardíaco, así como al gen *KCNH2* que codifica para una subunidad del canal de K^+ , como objetivos primarios de los antiarrítmicos que ya se utilizan y tienen como mecanismo principal el bloqueo de estos canales.

En conclusión, el descubrimiento de estas nuevas variantes genéticas proporciona una visión optimista en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para tratar la FA, ya que muchos de los genes identificados pueden ser una potencial diana farmacológica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Aunque algunos estudios de GWAS han relacionado varios SNPs a un mayor riesgo de presentar FA, los mecanismos que están detrás de cada uno de ellos todavía son desconocidos. Por otro lado, varios estudios han demostrado que factores como tener enfermedad en la válvula mitral, la edad o la función del ventrículo izquierdo pueden afectar a la homeostasis intracelular del calcio y a la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos. Sin embargo, aunque hay estudios que demuestran que la epidemiología de la FA es diferente entre hombres y mujeres, sólo se ha analizado el efecto del sexo sobre la homeostasis intracelular del calcio en modelos animales.

Por tanto, la hipótesis de este estudio postula que la asociación específica de los diferentes SNPs con mecanismos moleculares y consecuencias electrofisiológicas concretas podría ser utilizada como biomarcador para la prevención del desarrollo de FA, así como para el tratamiento personalizado de pacientes teniendo en cuenta el efecto del sexo.

Para estudiar esta hipótesis, se han propuesto los siguientes objetivos:

- ◆ Profundizar en los mecanismos moleculares que alteran la homeostasis del calcio en los portadores de múltiples variantes de riesgo de la región 4q25.
- ◆ Investigar el efecto que tienen las variantes de riesgo de la región 1q21 sobre la corriente SK3 y la actividad eléctrica, así como la influencia de la homeostasis del calcio sobre la corriente SK3 en miocitos auriculares humanos.
- ◆ Analizar las posibles interacciones que se pueden dar entre las diferentes variantes de riesgo 4q25 y 1q21, y cómo afectarían estas a la función de los miocitos auriculares humanos.
- ◆ Determinar la influencia del sexo en la homeostasis intracelular del calcio en pacientes con FA.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE MIOCITOS AURICULARES HUMANOS

Obtención de tejido auricular humano

Las muestras de tejido auricular se obtuvieron de pacientes sometidos a cirugía cardíaca en la Unidad de Cardiología y Cirugía Cardíaca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Concretamente, las muestras se extraen previamente a la canulación de la aurícula derecha en operaciones que requieren circulación extracorpórea. De otra forma, este trozo de tejido sería descartado durante la operación. El permiso para la utilización de este tejido se obtiene de cada paciente. El estudio está aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundació de Gestió Sanitària del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (Código: AF-RISK_2015, adjunto en el [Anexo II](#)).

Para asegurar la calidad de las muestras y los resultados, estas se transportaron al laboratorio con la mayor brevedad posible en solución Tyrode sin Ca^{2+} , oxigenada y fría, a la que añadimos monoxima-2,3-butenodiona (BDM) 30mM para impedir el consumo de energía y la contracción celular. La composición de la solución Tyrode está descrita posteriormente en la **Tabla 1**.

Aislamiento de cardiomiocitos auriculares humanos

Los miocitos auriculares humanos se aislaron siguiendo un protocolo establecido por el laboratorio. El tejido se limpió y se cortó en pequeños trozos (de 1 x 1 mm aproximadamente) que se introdujeron en una solución Tyrode sin Ca^{2+} con colagenasa 1.2mg/ml (Worthington type 4, 300 U/mg), proteinasa 0.30 mg/ml (Sigma type XXIV, 11 U/mg) y BSA (2mg/ml) y se incubaron a 37°C durante 25 minutos. Tras la primera digestión, las células se disociaron removiendo los trozos de tejido en solución Tyrode sin Ca^{2+} con ayuda de una pipeta Pasteur. El tejido restante volvió a ponerse 4-5 veces más durante 15 minutos, esta vez en una solución enzimática fresca que contenía colagenasa 0.7mg/ml y BSA (2mg/ml) a 37°C para continuar con su digestión. El calcio extracelular se incrementó gradualmente hasta llegar a una concentración de 600 μM . Sólo las células alargadas, estriadas y sin granulación fueron utilizadas para realizar los experimentos.

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
Tyrode sin Ca ²⁺	88 mM sucrosa, 88 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 4 mM NaHCO ₃ , 0.3 mM NaH ₂ PO ₄ , 1.1 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES, 20 mM taurina, 10 mM glucosa, 5 mM piruvato sódico. El pH se ajusta a 7.4 con NaOH 1N a temperatura ambiente.

Tabla 1. Composición de la solución utilizada para realizar el aislamiento de cardiomiocitos auriculares humanos.

El rendimiento del aislamiento de miocitos a partir de muestras auriculares humanas es variable, por lo que no se llevan a cabo todos los protocolos experimentales en todos los pacientes. Tal como se muestra en la **Figura 1**, las muestras de tejido de tamaño pequeño se congelan inmediatamente y se utilizan posteriormente para realizar análisis mediante la técnica de *western-blot*. Las muestras de tamaño mediano se utilizan para llevar a cabo el aislamiento de miocitos. Si el rendimiento de miocitos obtenidos es bajo, se utilizan para realizar técnicas de *patch-clamp*. En cambio, si el rendimiento es elevado, los miocitos obtenidos se utilizan para realizar las técnicas de inmunofluorescencia y *calcium imaging*. Cuando el tamaño del tejido es grande, una parte se congela inmediatamente y la otra se utiliza para realizar el aislamiento celular.

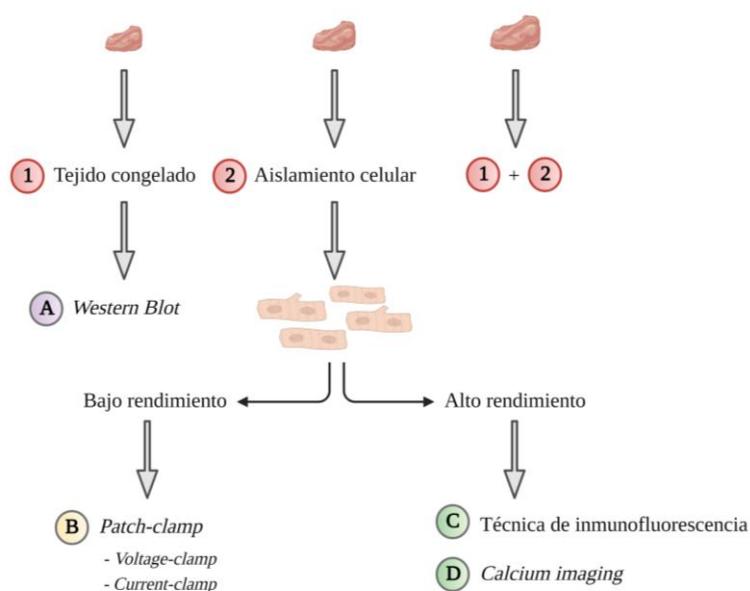


Figura 1. Diagrama de flujo del procesamiento de tejido auricular humano. Creado con Biorender.com

MEDICIONES ELECTROFISIOLÓGICAS

Las corrientes iónicas fueron medidas con la técnica de *patch-clamp* (**Figura 2**) en la configuración de célula entera, utilizando un amplificador EPC-10 (HEKA Elektronik, Germany). Los experimentos de *patch-clamp* se realizaron a temperatura ambiente.

Primero, se preparó una placa de Petri con la solución extracelular correspondiente en función de la técnica y los protocolos que tuviésemos que realizar (ver composición en la **Tabla 2**), y se añadió BSA para formar una película al fondo de la placa que evitase la adhesión de los miocitos a la placa. Después de limpiar la placa con solución extracelular, se pusieron unas gotas de la solución que contenía las células en suspensión y esperamos a que los cardiomiocitos sedimentaran al fondo de la placa.

Seguidamente se fabricó una pipeta de cristal con un estirador de pipetas, cuya resistencia debía estar entre 1.2-1.6 M Ω , aunque la resistencia óptima varía dependiendo del tipo de célula con la que vayamos a hacer el experimento. Para realizar experimentos de *patch-clamp* con la configuración de célula perforada, la pipeta se rellenó con solución intracelular que contenía anfotericina (250 μ g/ml). Esta última se encarga de la formación de poros en la membrana celular que se encuentra dentro de la micropipeta, permitiendo el paso de iones monovalentes y el control del potencial de membrana.

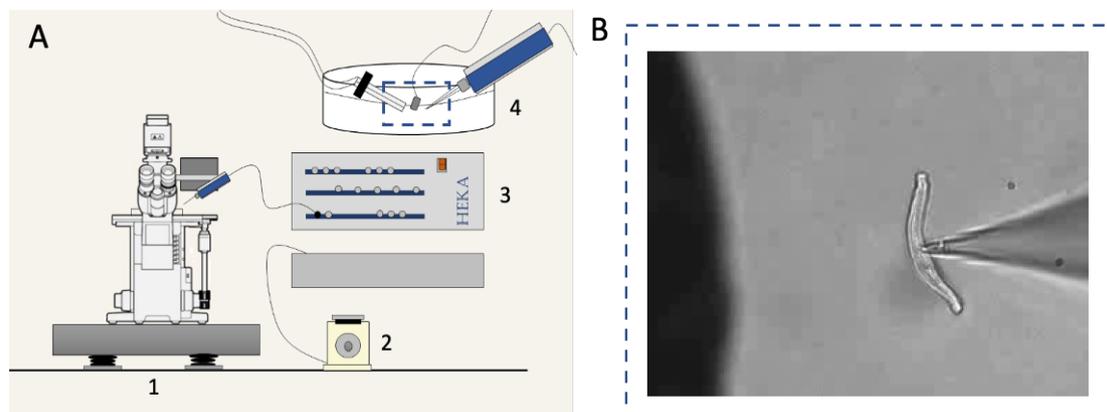


Figura 2. Esquema de la técnica de *patch-clamp*. **A)** Esquema de la técnica de *patch-clamp*. 1: Microscopio con mesa anti-vibratoria; 2: Micromanipulador motorizado; 3: Amplificador HEKA; 4: placa de Petri con solución extracelular, en la que encontramos (de izquierda a derecha) el sistema de perfusión, el electrodo de referencia y la micropipeta. **B)** Ampliación de la zona marcada con línea discontinua en el panel A. Se muestra una imagen de un cardiomiocito adherido a la micropipeta de *patch-clamp*. La sombra que se aprecia a la izquierda se corresponde con una parte de los capilares del sistema de perfusión.

Una vez fabricada, la pipeta se introdujo en el baño, se situó muy próxima a la célula con un micromanipulador motorizado y se atrajo hacia la pipeta mediante la aplicación de presión negativa. Esto hizo que se formara un sello entre la membrana celular y la pipeta, aumentando la resistencia de 2-5 MΩ a 2-20 GΩ. Una vez capturada la célula, se situó delante de un sistema de perfusión que contenía solución extracelular, mediante el cual las células pudieron perfundirse con los fármacos deseados en función del protocolo experimental a realizar. Los protocolos experimentales realizados en esta tesis se iniciaron una vez que la resistencia de acceso fue estable e inferior a 20 MΩ, parámetro que nos indicó que se había obtenido una perforación satisfactoria de la membrana.

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
Medio extracelular para <i>voltage-clamp</i>	127 mM NaCl, 5 mM TEA, 4 mM NaHCO ₃ , 0.33 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 mM CaCl ₂ , 1.8 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES, 10 mM glucosa, 5 mM piruvato sódico. El pH se ajusta a 7.4 con NaOH 1N a temperatura ambiente.
Medio intracelular para <i>voltage-clamp</i> (<i>Perforated patch</i>)	109.2 mM DL-Ácido aspártico (no K ⁺ salt). CsOH hasta que se disuelva, 46.8 mM CsCl, 3 mM Mg ₂ ATP, 1mM MgCl ₂ , 5 mM Na ₂ PC, 0.42 mM LiGTP, 10 mM HEPES. El pH se ajusta a 7.2 con CsOH 1N a temperatura ambiente.
Medio extracelular para <i>current-clamp</i>	132 mM NaCl, 4 mM KCl, 4 mM NaHCO ₃ , 0.33 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 mM CaCl ₂ , 1.6 mM MgCl ₂ , 10mM HEPES, 5 mM glucosa, 5 mM ácido pirúvico. El pH se ajusta a 7.4 con NaOH 1N a temperatura ambiente
Medio intracelular para <i>current-clamp</i> (<i>Perforated patch</i>)	109.2 mM DL-Ácido aspártico (K ⁺ salt), 47 mM KCl, 3 mM Mg ₂ ATP, 1 mM MgCl ₂ , 5 mM Na ₂ PC, 0.42 mM LiGTP, 10 mM HEPES. El pH se ajusta a 7.2 con KOH 1N a temperatura ambiente.

Tabla 2. Composición de las diferentes soluciones utilizadas para realizar los experimentos de *patch-clamp* en sus distintas configuraciones.

Medición de la corriente de calcio tipo L

El registro de la I_{Ca} se obtuvo utilizando la técnica de fijación de voltaje (*voltage-clamp*) perforado, en la configuración de célula entera. En esta técnica se utilizaron soluciones intra y extracelulares en las que se substituye el K^+ por Cs^+ para bloquear el flujo de iones K^+ a través de los canales de potasio (ver composición en la **Tabla 2**).

El protocolo para la medición de la I_{Ca} consiste en la inactivación de la corriente de Na^+ (I_{Na}) con un prepulso de 50 ms, que lleva el potencial de membrana de -80 mV a -45mV. Seguidamente, se produce una despolarización de 200 ms a 0mV que induce la apertura de los canales de calcio, dando lugar a la I_{Ca} (**Figura 3**).

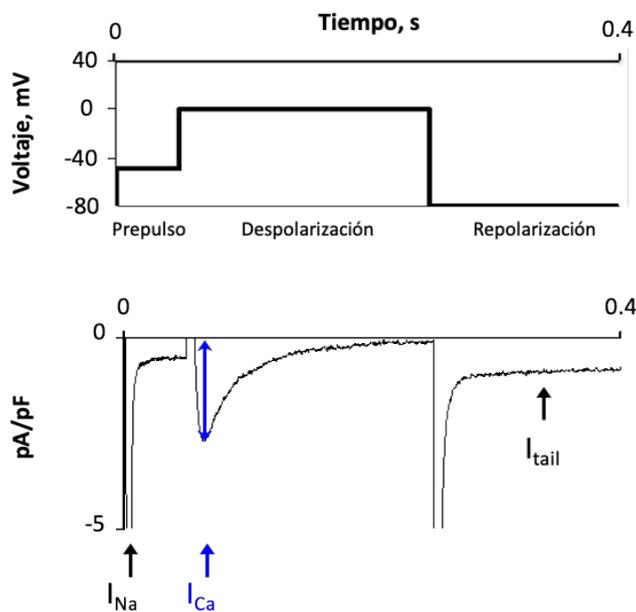


Figura 3. Protocolo de estimulación representativo en el que podemos ver el potencial de membrana aplicado al cardiomiocito y el registro de las correspondientes corrientes generadas. Las corrientes que se activan en cada parte del protocolo están indicadas como: I_{Na} (corriente de Na^+), I_{Ca} (corriente de calcio tipo L), I_{tail} (Ca^{2+} expulsado de la célula a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+}).

La amplitud de la I_{Ca} se midió como la diferencia entre el pico de la corriente de entrada y el valor de la corriente al final de los 200 ms de despolarización a 0 mV. Además, esta despolarización permitió medir la corriente de cola (I_{tail}) producida por la expulsión de calcio de la célula a través del intercambiador NCX-1, desencadenada durante la repolarización de la célula a -80 mV.

Estas dos corrientes de entrada (I_{Ca} y I_{tail}) representan el flujo de calcio que atraviesa la membrana. En la I_{Ca} entran 2 cargas positivas por ion de Ca^{2+} que atraviesa la membrana, mientras que en el caso de la I_{tail} el NCX-1 hace que haya una carga neta de entrada por ion de Ca^{2+} que se expulsa, asumiendo que por cada ion de Ca^{2+} expulsado entran 3 iones de Na^+ .

Determinación de la relación intensidad-voltaje (I-V) para la I_{Ca}

Para estudiar la relación I-V para la I_{Ca} , la célula se despolarizó a potenciales de membrana entre -40 y +50 mV durante 200 ms, precedido por un pre-pulso de 50 ms a -45 mV para inactivar la I_{Na} (Figura 4).

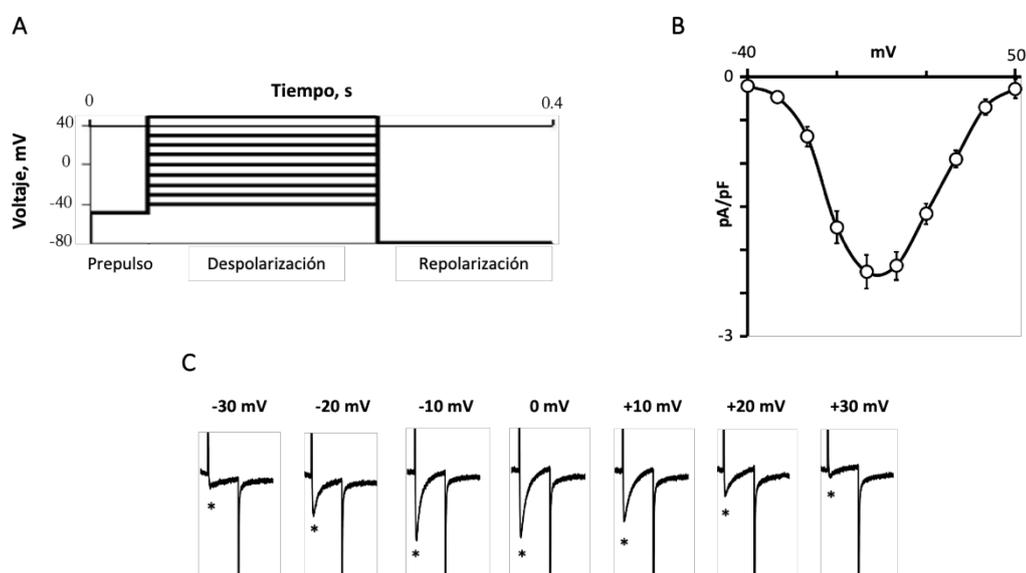


Figura 4. Relación intensidad-voltaje de la I_{Ca} . **A)** Protocolo de estimulación representativo a diferentes potenciales de membrana (desde -40 mV a +50 mV). **B)** El gráfico obtenido que nos muestra la relación I-V. **C)** Registros representativos de las I_{Ca} registradas a los potenciales que se indican en la parte superior. Los * marcan los picos de I_{Ca} .

Determinación de la inactivación de la I_{Ca}

Para medir la velocidad de inactivación de los canales de calcio, lo que es equivalente a la fase de desaparición de la I_{Ca} , se calcularon las constantes de tiempo para su desaparición y se ajustaron con una doble exponencial. De esta forma obtuvimos una constante de tiempo

para la inactivación rápida (τ_1) y una constante de tiempo para la inactivación lenta (τ_2) (**Figura 5**).

$$y(x) = y_0 + \text{ampl}_1 * \exp(-x / \tau_1) + \text{ampl}_2 * \exp(-x / \tau_2)$$

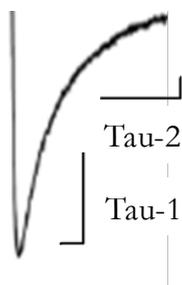


Figura 5. Desaparición de la I_{Ca} . Inactivación de la I_{Ca} donde podemos ver las constantes de inactivación dependientes del tiempo τ_1 (rápida) y τ_2 (lenta) en la fase de desaparición de la I_{Ca} .

Por otro lado, para evaluar la dependencia de la inactivación de los canales de calcio al voltaje aplicado, se realizó un protocolo con pre-pulsos a diferentes potenciales de membrana (de -50 mV a 0 mV) previamente al pulso de estimulación (0 mV) para evaluar cambios en la I_{Ca} (**Figura 6**). Se utilizó la ecuación de Boltzman para determinar el voltaje necesario para inactivar el 50% de la I_{Ca} .

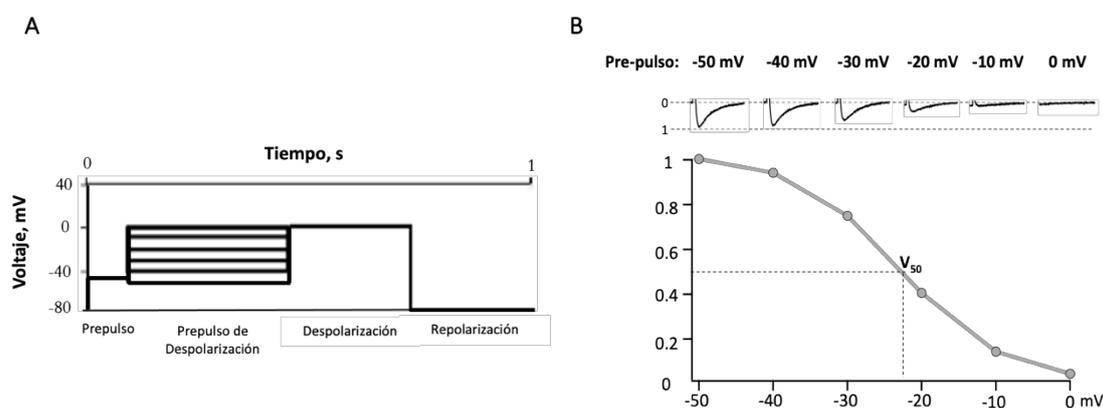


Figura 6. Inactivación de la I_{Ca} dependiente de voltaje. **A)** Protocolo de estimulación. **B)** Los registros de I_{Ca} representativos se obtuvieron en la segunda despolarización a 0 mV después de los pre-pulsos a los diferentes potenciales de membrana que se indican en el protocolo, y se normalizaron a la amplitud de la I_{Ca} registrada después de un pre-pulso de -50 mV. El voltaje de cada pre-pulso está indicado para cada registro. El gráfico voltaje-dependiente de la inactivación de la I_{Ca} normalizada al pico máximo (-50 mV) se muestra debajo de los registros de corriente.

Determinación de la recuperación de la inactivación de la I_{Ca}

Para determinar el tiempo necesario para la total recuperación de los canales de calcio después de la inactivación debido al pulso de despolarización a 0 mV, utilizamos un protocolo con intervalos de tiempo crecientes (de 50 a 600 ms) antes de una segunda despolarización para desencadenar la I_{Ca} mostrada en la **Figura 7**.

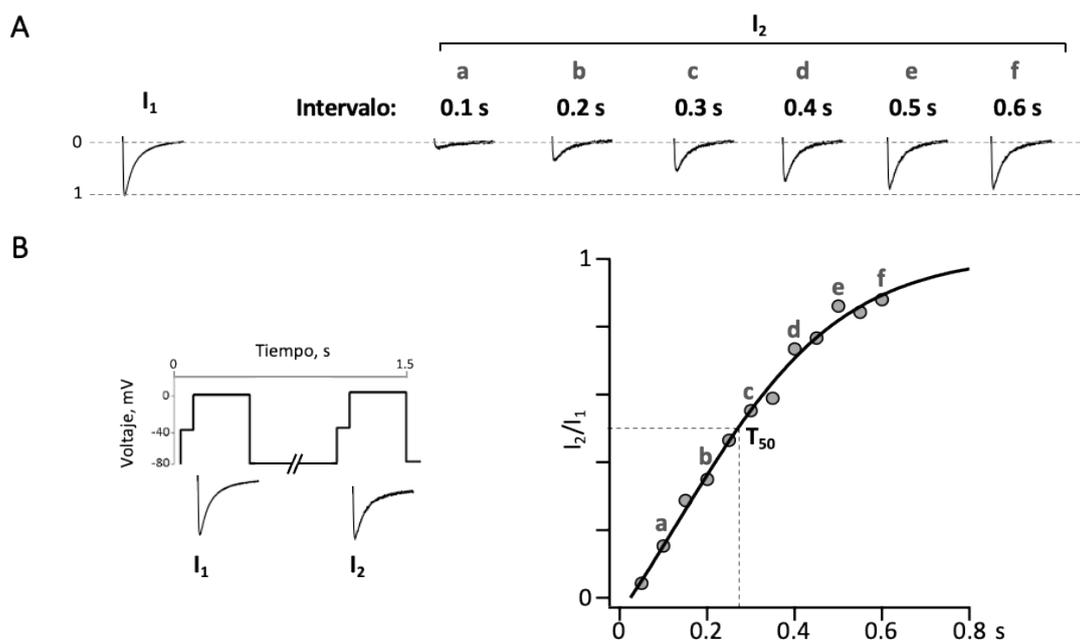


Figura 7. Recuperación de I_{Ca} de la inactivación. **A)** Los registros de I_{Ca} representativos (I_2) se generaron como resultado de un segundo pulso de despolarización a diferentes tiempos (indicado en la parte superior de cada registro) desde el primer pulso de estimulación. Los registros I_2 se normalizaron a la amplitud de la I_{Ca} generada por el primer pulso de estimulación (I_1). **B)** A la izquierda se muestra el protocolo de estimulación representativo, y a la derecha el gráfico de recuperación de I_{Ca} de la inactivación normalizado al pico del primer pulso (I_1).

Determinación del contenido de calcio del RS y de las liberaciones espontáneas de calcio

Para calcular el calcio acumulado en el RS de las células, estas se perfundieron de forma rápida y transitoria (5-10s) con 10 mM de cafeína. Ésta última, actúa abriendo los RyR2, liberando el contenido de calcio del RS al citosol, que a continuación será expulsado de la célula a través de NCX-1. La cantidad de calcio liberado por el RS se expresa en amoles

(10^{-18} mol), y se calculó a partir de la integral de la corriente de entrada que se genera por el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (I_{NCX}) inducida por cafeína, asumiendo una estequiometría de 3 Na^+ : 1 Ca^{2+} del NCX (**Figura 8A**).

Además, también se registraron los I_{TI} inducidos por la liberación espontánea de calcio del RS en miocitos con el potencial de membrana fijado de -80 a -50 mV durante intervalos de 30 s (**Figura 8B**).

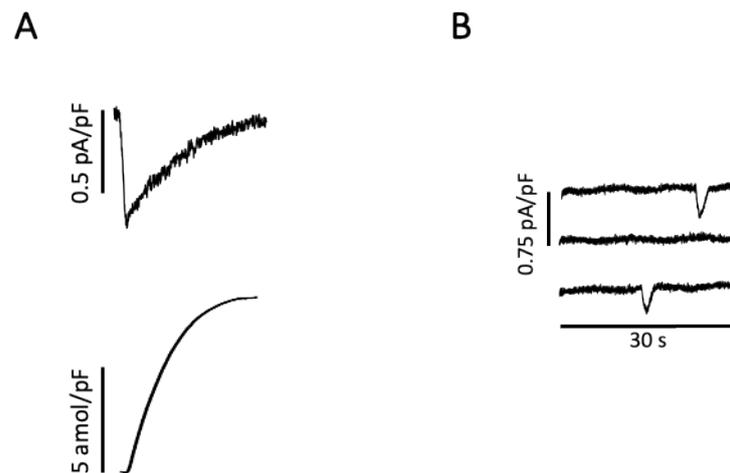


Figura 8. Corriente de entrada transitoria generada por la aplicación de cafeína o la liberación espontánea de calcio. **A)** La exposición de la célula a 10 mM de cafeína genera una corriente de entrada como la que se muestra en la parte superior de este panel. La integral de la corriente generada se muestra en la parte inferior del panel. **B)** Corrientes espontáneas de entrada inducidas por la liberación espontánea de calcio del RS registradas con el potencial de membrana fijado a -80 mV.

Determinación de la corriente SK sensible a apamina

La determinación de la corriente SK sensible a apamina realizada en el [Capítulo III](#) se llevó a cabo utilizando la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula perforada en miocitos auriculares humanos. Concretamente, para realizar estos experimentos se utilizó la técnica de *current-clamp* con las soluciones extra e intracelular específicas para *current-clamp*. La solución intracelular contiene K^+ , necesario para poder determinar la corriente SK producida por los canales SK3. Para valorar esta corriente, inicialmente se realizó un protocolo *IV-ramp* en la configuración de *voltage-clamp* para determinar la relación I-V. Este protocolo consiste

en la aplicación de un voltaje controlado que cambia gradualmente y a un ritmo constante, a la vez que la corriente también se registra de forma continua. Se calculó la relación I-V en control, y posteriormente las células se perfundieron con apamina (100 nM), un bloqueador selectivo de los canales SK3. De esta forma, restando la corriente registrada tras la aplicación de apamina a la corriente registrada en situación control se obtuvo la corriente sensible a apamina, que nos proporcionó información de la corriente neta generada por los canales SK3. Además, se realizaron 3 protocolos I-V (IV-step, IV-ramp y IV-ramp inverso) y se compararon para comprobar si diferían mucho entre ellos (**Figura 9**). Finalmente, se decidió utilizar el protocolo IV-ramp, ya que los protocolos no diferían mucho entre ellos y era el protocolo en el que disponíamos de más pacientes.

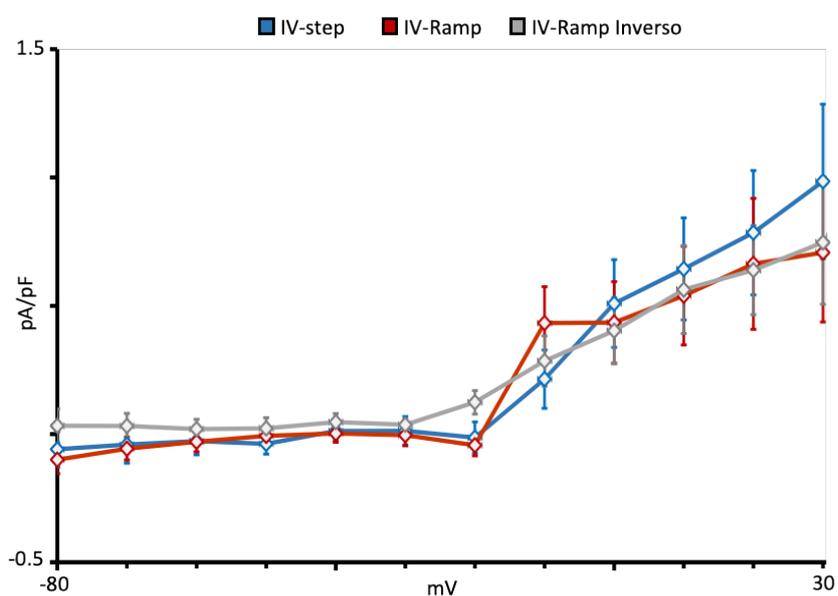


Figura 9. Comparación de las curvas I-V en los diferentes protocolos. Las curvas IV de la gráfica se registraron en las mismas 9 células con diferentes protocolos, siendo IV-step el azul, IV-Ramp el rojo y IV-Ramp inverso el gris.

Determinación de despolarizaciones espontáneas de membrana en reposo y bajo estimulación eléctrica

Los potenciales de membrana de reposo se midieron con la configuración de fijación de corriente (*current-clamp*), utilizando medios intra y extracelular que contienen K^+ (ver su composición en la **Tabla 2**).

En esta configuración, la intensidad de la corriente inyectada (I_h) se modificó para determinar la amplitud y frecuencia de las despolarizaciones espontáneas de membrana a diferentes potenciales de membrana de reposo (entre -80 y -60 mV). Los resultados de eventos grabados se agruparon en 3 intervalos: de -85 a -75 mV; de -75 a -65 mV; y >-65 mV.

De la misma forma, la I_h se cambió para conseguir un potencial de reposo de -80 mV y poder evaluar la amplitud y la frecuencia de las despolarizaciones espontáneas de membrana a diferentes frecuencias de estimulación (0.5, 1. 1.3 y 2 Hz), evitando así un posible factor de confusión debido a las diferencias en el potencial de membrana de reposo que presentan las células.

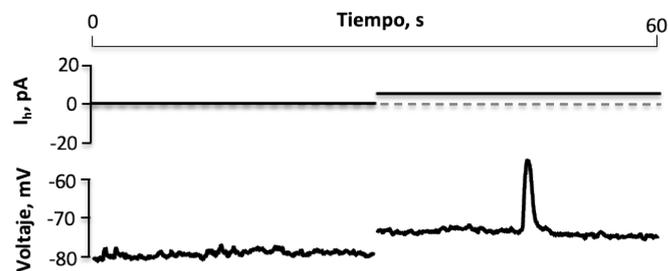


Figura 10. Protocolo representativo para medir las despolarizaciones espontáneas de la membrana. En la parte superior podemos ver la corriente de mantenimiento (I_h) para llevar el potencial de membrana a diferentes voltajes. Los registros de las despolarizaciones de membrana se muestran en la parte inferior.

En los miocitos utilizados para realizar los experimentos de *current-clamp*, también se midió la frecuencia de I_{T1} a potenciales entre -80 y -60 mV cambiando a la configuración de *voltaje-clamp*.

VISUALIZACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Se utilizó un microscopio confocal de rastreo resonante ultra-rápido (Leica TCS SP5 AOBS) para visualizar los cambios que se producían en el calcio citosólico en cada despolarización. Para ello, los cardiomiocitos se cargaron con un indicador de calcio fluorescente.

Concretamente, para medir la emisión fluorescente en verde se utilizó fluo-4 AM o CAL-520 AM. La concentración utilizada y el tiempo de incubación varió en función del indicador de calcio utilizado:

- Fluo-4 AM. Se utilizó a una concentración de 2.5 μ M y las células se cargaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron al menos durante 30 minutos con solución extracelular fisiológica (ver composición en **Tabla 3**) antes de iniciar los experimentos.
- CAL-520 AM. Se utilizó una concentración de 2 μ M y las células se cargaron durante 20 minutos. De la misma forma, se lavaron durante 30 minutos con solución extracelular fisiológica (ver composición **Tabla 3**).

Tanto el Fluo-4 como el CAL-520 se excitan a 488 nm y la emisión de fluorescencia se recoge entre 500 y 650 nm. La fluorescencia emitida en el plano confocal de la célula reflejará el nivel de calcio en esta sección del miocito, permitiendo visualizar diferencias locales.

Los miocitos aislados se cargaron y los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Las imágenes de fluorescencia se grabaron con un objetivo de 63x a una resolución de 512x150 píxeles y una frecuencia de muestreo de 90 Hz.

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
Medio fisiológico extracelular	132 mM NaCl, 4 mM KCl, 4 mM NaHCO ₃ , 0.33 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 mM CaCl ₂ , 1.6 mM MgCl ₂ , 10mM HEPES, 5 mM glucosa, 5 mM ácido pirúvico. El pH se ajusta a 7.4 con NaOH 1N a temperatura ambiente

Tabla 3. Composición del medio extracelular utilizado para realizar los experimentos de *calcium imaging*.

Detección de *calcium sparks*

Para analizar las propiedades, la distribución espacial y la frecuencia de las liberaciones espontáneas locales de calcio (*calcium sparks*) se utilizó un algoritmo (**Spark_Simple**) de procesamiento de imágenes de células vivas, hecho a medida en colaboración con el grupo ANCORA- Anàlisi i control del ritme cardíac de la Universitat Politècnica de Catalunya.

Esta herramienta identifica potenciales candidatos de *calcium sparks* y sus propiedades temporales, espaciales y cinéticas. Seguidamente, filtra estos candidatos delimitando las dimensiones de los candidatos a *sparks*, así como la distancia mínima temporal y espacial entre *sparks*. La **Figura 11** muestra un ejemplo de la detección que lleva a cabo el algoritmo de análisis.

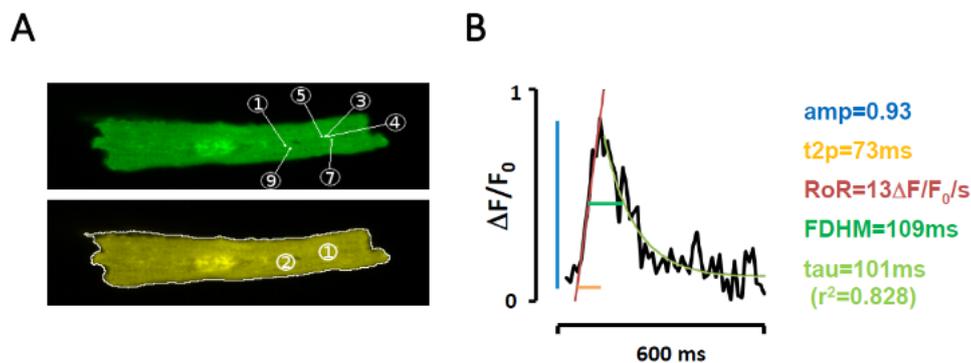


Figura 11. Ejemplo de la detección de *calcium sparks* y sus propiedades en un miocito auricular humano. **A)** Imagen de un miocito auricular humano donde se indica la distribución espacial de 6 *calcium sparks* (imagen superior, verde) divididos en 2 focos de *sparks* indicados con un círculo (imagen inferior, amarilla). **B)** Ejemplo de un *spark*, en el cual vemos indicadas las propiedades del *spark* determinadas por el algoritmo de detección, siendo: amp = la amplitud relativa máxima desde la línea basal; t2p=tiempo hasta el pico máximo; RoR= “rate of rise” o tasa de subida del *spark*; FDHM= duración a la mitad de la amplitud relativa del *spark*; tau=la constante de tiempo del ajuste de la desaparición; r²=el coeficiente de determinación del ajuste exponencial.

Para ajustar los parámetros de filtrado del algoritmo, los candidatos a *sparks* sugeridos por el programa fueron inspeccionados manualmente y aceptados o rechazados como *sparks* válidos utilizando un subprograma de validación dentro del programa **Spark_Simple**.

Después, los *sparks* aceptados que coincidían espacialmente dentro de un radio de 2 μm , se consideraron de un mismo foco de *sparks*. Esto permitió la determinación de los focos de *sparks*, la densidad de focos y la frecuencia de *sparks* por foco.

TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Tras el aislamiento de cardiomiocitos, algunas células se utilizaron para realizar la técnica de inmunofluorescencia para el marcaje de clústeres de RyR2, así como de su fosforilación en los residuos ser2808 o ser2814, y también para el marcaje de Ca_v1.2, CSQ-2 y SK3.

Una vez aisladas, las células se pegaron en placas que habían estado previamente incubadas con laminina durante al menos 2h a 37°C. Una vez pegados, los miocitos se incubaron con solución control o con el tratamiento correspondiente, y posteriormente se fijaron con PBS- formalina 10%. A continuación, las células se incubaron con PBS-Glicina 0.1M durante 10 minutos y consecutivamente con PBS/0.2% Tritón 100-X durante 15 minutos para permeabilizar las células y permitir la entrada de los anticuerpos. Seguidamente, para bloquear los lugares de marcaje no específico, las células se incubaron con PBS/0.2% Tween 20/ Horse serum al 10% durante 30 minutos.

Después de este paso, las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante al menos 1h. Concretamente, los RyR2 totales y RyR2 fosforilados en el residuo de ser2808 y ser2814 se marcaron con los anticuerpos primarios anti-RyR2 de ratón (1:1200; NR07, Calbiochem), anti-phospho-ser2808 de conejo (1:1200; A010-30, Badrilla), y anti-phospho-ser2814 de conejo (1:1200; A010-31, Badrilla) respectivamente. Por otro lado, el Ca_v1.2 se marcó con un anti-Ca_v1.2 de cobaya (1:600; AGP-001, Alomone), la CSQ-2 se marcó con un anti-CSQ-2 (1:500; Ab-3516, Abcam) y los canales SK3 (y SK2) con un anti-SK2 de cabra (1:100; ab111939, Abcam), que no diferencia entre SK2 y SK3. Finalmente, se utilizaron los anticuerpos secundarios AlexaFluor 488 anti-ratón (1:2000; A21200, Molecular Probes), AlexaFluor 594 anti-conejo (1:1500; A11012, Molecular Probes), AlexaFluor 594 anti-cobaya (1:1000; A11076, Molecular Probes) y Alexa Fluor 594 anti-cabra (1:1000; A11058, Molecular Probes). Las células se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado durante 1 h para marcar en verde los RyR2 totales y en rojo la fosforilación del RyR2 en el residuo ser2808 o ser2814, CSQ-2, Ca_v1.2 o SK3. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal de rastreo resonante ultra-rápido (Leica SP5 AOBS), con el objetivo de inmersión de glicerol 63x a una resolución de 1024x256 píxeles.

Análisis de imágenes

Con el objetivo de analizar las imágenes y detectar los RyR2 y sus propiedades se desarrolló un programa (**RyR_Simple**) en colaboración con el grupo ANCORA- Anàlisi i control del ritme cardíac de la Universitat Politècnica de Catalunya

El programa inicialmente procesa las imágenes estimando la fluorescencia basal que tienen, y las normaliza en base a esta. A continuación, se convolucionan las imágenes pasándolas por un filtro, teniendo en cuenta la morfología que tienen los RyR2, que en este caso es una forma gaussiana de la medida de la *Point Spread Function* del microscopio, con un radio de 0.2-0.33 μm . Este procedimiento permitirá resaltar los RyR2.

Posteriormente, se aplica un umbral de intensidad para separar los clústeres de RyR2 del ruido de fondo y se extraen las características de cada RyR2 como son: la intensidad de fluorescencia media, el radio del clúster de RyR2 y las características de distribución espacial de los RyR2 en la célula. Para poder comparar las propiedades entre el centro y la membrana de la célula, se realizó una función para que el programa dividiese la célula en capas concéntricas (**Figura 12**). De esta forma, los resultados que obtenemos nos indican la media de todos los parámetros de interés por cada capa de la célula.

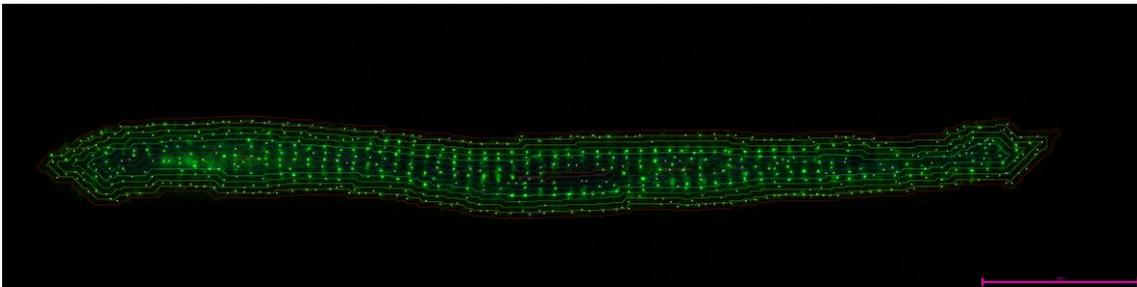


Figura 12. Ejemplo de la detección de RyR2 en un miocito auricular humano dividido en capas concéntricas. Cada punto blanco se corresponde con la detección de un clúster de RyR2, esta es la imagen que revisamos para comprobar que el análisis se ha realizado correctamente.

Para evitar los falsos positivos se realiza un filtraje posterior a la detección de los RyR2, donde nosotros podemos modificar los parámetros si vemos que la detección no se ha llevado bien a cabo.

En varios estudios se ha visto que las alteraciones en la fosforilación de algunos residuos del RyR2 afectan a su probabilidad de apertura. Por ello, una de las funciones que se desarrolló en el programa consiste en comparar la fluorescencia que emite el anticuerpo que marca los RyR2 totales y la fluorescencia que emite el anticuerpo que marca la fosforilación de los residuos ser2808 o ser2814 del RyR2, obteniendo así la ratio de fosforilación de cada RyR2.

TÉCNICA DE WESTERN BLOT

Se utilizó la técnica de western blot para cuantificar la expresión de diferentes proteínas como SERCA2a, NCX-1, PLB, PLB-s16 y PLB-t17. Se pulverizó el tejido humano (20 mg aprox.) con nitrógeno líquido, y a continuación se homogeneizó en 200 μ l de tampón de lisis frío que contiene HEPES 50 mM, 0.1% (v/v) Tween 20, NaCl 100 mM, EGTA 2.5 mM, glicerol-2-fosfato 10 mM, 10 % (v/v) glicerol y DTT, suplementado con inhibidor de proteasa. La concentración de proteínas se midió utilizando BCA protein assayTM. Las proteínas (10 μ g) se separaron mediante electroforesis en gel de poliacridamida-dodecilsulfato de sodio al 5 o 10% (SDS-PAGE). Posteriormente, se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore) usando un sistema de transferencia semiseco y se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios diluidos en 5% de leche desnatada en polvo. Se utilizaron los anticuerpos anti-SERCA2 de conejo (#9580, Cell Signaling Technology), anti-CSQ-2 de conejo (ab3516, Abcam), anti-NCX1 de conejo (ab135735, Abcam), anti-PLB-L15 de conejo (Santa Cruz), anti-PLB-s16 de conejo y anti-PLB-t17 de conejo (Badrilla) y anticuerpos anti- α -actinina de conejo. La detección se realizó con IgG marcada con peroxidasa de rábano y el sistema de detección *SupersignalTM West Dura* (Pierce). Se utilizaron los estándares de masa molecular (Bioline) para estimar el tamaño de la proteína y se utilizó α -actinina como proteína control. Las imágenes se digitalizaron (GS-800 Calibrated Densitometer; Bio-Rad) y se analizaron con el software Quantity One 4.6.3 (Bio-Rad).

GENOTIPADO DE SNPs

Las muestras de sangre se enviaron a genotipar al Laboratory for Molecular Cardiology (Department of Biomedical Sciences) de la Universidad de Copenhagen en Dinamarca. Se determinó en todos los pacientes la presencia de las variantes de riesgo de 4q25 rs1448818, rs6817105, rs2200733, rs13143308, rs6843082, rs10033464, rs3853445 y rs6838973, así como de las variantes de riesgo de 1q21 rs1051614, rs6666258 y rs13376333. Posteriormente, se relacionó el genotipo de cada paciente con los datos experimentales existentes.

Primero se purificó el DNA de las muestras de sangre y se almacenó a -20°C . A continuación, las muestras se genotiparon en deCODE genetics utilizando Global Screening Array de Illumina. La matriz contiene un contenido actualizado con >650000 SNPs y un chip personalizado optimizado para su comparación con el chip Illumina Omni Express. Todos los datos obtenidos del genotipado se procesaron simultáneamente para su control de calidad e imputación. Brevemente, se realizó un control de calidad de los datos en el que se excluyeron las muestras que presentaban ascendencia genética no europea, los individuos con aneuploidías en los cromosomas sexuales o que presentaban diferencias en el sexo inferido y el recuento de cromosomas sexuales, y aquellos que presentaban valores atípicos de heterocigosidad. Posteriormente, los datos se clasificaron utilizando Eagle2 y se imputaron utilizando una base de datos de referencia que consiste en el genoma completo de 8429 daneses junto a 7146 muestras del noroeste de Europa.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los experimentos se realizaron sin conocer los datos clínicos ni genéticos, y los médicos que recopilaron los datos clínicos no conocían los resultados experimentales. A menos que se indique lo contrario, los valores se determinaron para cada paciente (se promediaron las múltiples mediciones de cada uno de los pacientes) y se expresaron como $\text{media} \pm \text{SEM}$ (en los Capítulos I, II y III) o $\text{media} \pm \text{IC}$ (Capítulo IV). El análisis estadístico utilizado en cada caso se indica en el apartado correspondiente, pero aquí lo mencionaremos brevemente.

En los Capítulos I, II y III para contrastar la independencia de las variables se utilizó la prueba de Chi-Cuadrado. Para el cálculo de ORs se utilizó la fórmula:

$$(a/b)/(c/d)$$

Siendo *a* el número de pacientes con FA y variante de riesgo, *b* el número de pacientes con FA y sin variante de riesgo, *c* el número de pacientes sin FA y con variante de riesgo, y *d* el número de pacientes sin FA y sin variante de riesgo. Para determinar si el efecto era significativo se utilizó la prueba exacta de Fisher. Para separar los efectos específicos de los diferentes SNPs sobre la I_{Ca} , la tau de I_{Ca} , el contenido de calcio del RS, la fosforilación del RyR2, y la amplitud de I_{Tl} se utilizó un modelo de regresión lineal. En cambio, para separar los efectos específicos de los diferentes SNPs sobre la frecuencia de I_{Tl} se utilizó un modelo de regresión lineal con una distribución binomial negativa. En los modelos de regresión lineal no se pudieron incluir a la vez las variantes rs2200733, rs13143308 y rs10033464 ya que se trata de información redundante, por lo que se realizó el análisis con rs13143308 o con rs2200733 y rs10033464. Las comparaciones entre 2 medias se realizaron mediante la prueba t de Student o la prueba de Wilcoxon, en función de si los datos presentaban una distribución normal o no. Para ver la interacción de las variables en las curvas I-V se utilizó la prueba ANOVA para medidas repetidas. Para la comparación de múltiples efectos se utilizó ANOVA o Kruskal Wallis en función de si los datos presentaban una distribución normal o no.

Por otro lado, en el caso del Capítulo IV el análisis estadístico se realizó mediante un modelo de regresión lineal multivariado para los datos con una distribución normal (I_{Ca}) o un modelo lineal generalizado con una distribución de Poisson (I_{Tl}). Para este análisis, los pacientes se dividieron en hombres ($n=189$) y mujeres ($n=78$) sin FA, y con FA permanente y se incluyeron en el análisis estadístico datos clínicos y ecocardiográficos clave, así como tratamientos farmacológicos. No se incluyeron los pacientes a los que se les realizó una sustitución o reparación de la válvula mitral para evitar los efectos confusores de la enfermedad de la válvula mitral, ya que se ha demostrado que esta enfermedad altera la homeostasis del calcio en pacientes sin FA (162). Para validar la robustez de este análisis, los resultados se analizaron utilizando 1) un modelo de regresión lineal no ajustado con interacción entre el sexo y el ritmo auricular 2) un modelo totalmente ajustado teniendo en cuenta los efectos de confusión de factores clínicos comunes que muestran un sesgo entre sexos, así como los factores sospechosos de alterar la homeostasis del calcio y 3) un modelo ajustado para los factores más relevantes. Los 3 modelos de regresión lineal arrojaron

resultados similares. En los análisis del Capítulo IV, los datos se analizaron utilizando un modelo de regresión lineal tal como se indica. De lo contrario, se utilizó una prueba exacta de Fisher para datos categóricos. Se utilizó la prueba t de Student o la prueba de rango de Wilcoxon para las comparaciones pareadas o no pareadas.

En todos los casos, el umbral del valor p que define la significación estadística se estableció en <0.05 . El análisis estadístico se realizó utilizando la versión 3.5.2 del software R, la versión 9.4 del software SAS o el software SPSS.

RESULTADOS

Los resultados de esta tesis están estructurados en diferentes capítulos. Los capítulos I, II y III se centran en investigar el impacto de los diferentes SNPs asociados a la FA sobre la homeostasis intracelular del calcio y la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos, que abarcarían el objetivo principal de esta tesis. En el capítulo IV se han incluido los datos de un estudio que se ha realizado en paralelo y cuyo objetivo era determinar la influencia del sexo sobre la homeostasis del calcio en pacientes con FA.

El capítulo I está dedicado a estudiar en profundidad el efecto de diferentes variantes de riesgo de la región 4q25 del cromosoma 4 sobre la I_{Ca} en miocitos auriculares humanos. Por otro lado, el capítulo II incluye el estudio del efecto de las variantes de riesgo de 4q25 sobre la actividad eléctrica espontánea inducida por liberación de calcio en miocitos auriculares humanos.

El capítulo III incluye el estudio del efecto de las variantes de riesgo de la región 1q21 del cromosoma 1 sobre la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos, así como las posibles interacciones funcionales entre las variantes 1q21 y 4q25.

Finalmente, el capítulo IV incluye el estudio de la influencia del sexo sobre la homeostasis del calcio en pacientes con FA. Sus resultados están incluidos en un artículo titulado “Influence of sex on intracellular calcium homeostasis in patients with atrial fibrillation”(163), publicado en la revista Cardiovascular Research recientemente.

I- EFECTO DE LAS VARIANTES DE RIESGO DE 4q25 SOBRE LA I_{Ca} EN MIOCITOS AURICULARES HUMANOS

INTRODUCCIÓN

La FA se ha asociado con numerosas alteraciones electrofisiológicas, moleculares y estructurales en los miocitos auriculares (3). Concretamente, la reducción de la I_{Ca} es uno de los hallazgos asociados a FA (164–166), y se ha reportado que esta reducción puede producir arritmogénesis auricular debido a la reducción de la duración del PA y del periodo refractario (167–169).

Mientras se siguen haciendo numerosos estudios sobre las alteraciones electrofisiológicas y mecánicas en la FA, la investigación de sus bases genéticas sigue siendo escasa. Principalmente, se conocen mutaciones puntuales en los genes que codifican para diferentes canales iónicos que se han asociado a la FA familiar, pero estas sólo explican una minoría de los casos (<10%)(9,128,129). Durante la última década, se han realizado estudios de GWAS que han relacionado la FA con diferentes locus de SNPs en 4q25, 1q21 y 16q22, entre otros (11,130). Estudios más recientes han determinado la asociación de nuevas variantes a la FA, aunque las localizadas en 4q25 parecen seguir siendo las que podrían tener mayor impacto (12). Hay estudios que demuestran que algunas de las variantes de 4q25 pueden modificar el riesgo de recurrencia de FA después de la ablación por catéter (146,147), así como la respuesta al tratamiento con fármacos antiarritmogénicos (148).

Los SNPs de 4q25 que se han relacionado con la FA están localizados en una región intergénica, de la que no se tiene conocimiento que codifique para ningún gen. Esto sugiere que su efecto podría estar mediado por genes próximos. Entre ellos, el gen candidato más próximo es el homodominio PITX2 que codifica para un factor de transcripción crucial durante el desarrollo cardíaco (136,137), y la formación de las venas pulmonares (139). Por ello, se postuló que la disfunción de PITX2c podría ser responsable del desarrollo de FA (130). Estudios de diferentes laboratorios, incluido el nuestro, evidencian que la pérdida de función de PITX2c predispone a la arritmogénesis auricular (140,143–145) y provoca alteraciones en la homeostasis del calcio (145).

Por otro lado, nuestro laboratorio vinculó recientemente la variante de riesgo rs13143308T de 4q25 con una excesiva liberación espontánea de calcio que podría asociarse a determinados cambios observados, entre los cuales encontramos el aumento de la

expresión de SERCA2a, el aumento de la carga de calcio del RS y el aumento de la fosforilación en el residuo de ser-2808 del RyR2 (13).

En vista de la asociación de la variante de riesgo rs13143308T de 4q25 con la alteración de la homeostasis intracelular del calcio, este capítulo tiene como objetivo estudiar con mayor profundidad el efecto de todas las variantes de riesgo localizadas en la región 4q25 sobre la I_{Ca} para comprobar si estas variantes inducen una reducción en la I_{Ca} similar a la reducción observada en pacientes con FA.

RESULTADOS

Frecuencia de las variantes de riesgo de 4q25

Se genotiparon un total de 898 muestras de sangre para las variantes de riesgo localizadas en la región 4q25 del cromosoma 4: rs1448818, rs6817105, rs2200733, rs13143308, rs6843082, rs10033464, rs3853445 y rs6838973. Para facilitar la identificación de cada variante, así como la presencia de los alelos de riesgo, se ha utilizado un código de colores que se mantendrá durante todo el capítulo de resultados (**Figura 1**). El blanco corresponde con la presencia de 2 alelos normales, el color claro de cada variante se corresponde con la presencia de 1 alelo de riesgo, y el color oscuro indica que el paciente presenta 2 alelos de riesgo. Las variantes de riesgo se han ordenado en el mismo orden en el que se encuentran en la región 4q25.

Algo que también nos permitió observar el esquema gráfico es que las variantes rs6817105 y rs2200733, las variantes rs6843082 y rs13143308 y las variantes rs3853445 y rs6838973 parecían moverse juntas. Por otro lado, también pudimos apreciar que las variantes rs2200733, rs13143308 y rs10033464 segregan juntas genéticamente. Es decir, siempre que hay una variante de riesgo en rs13143308, también hay una variante de riesgo en rs2200733 o en rs10033464. Si nos fijamos, podemos ver que incluso en unos pocos casos los pacientes presentan la variante de riesgo en las 3 regiones a la vez.

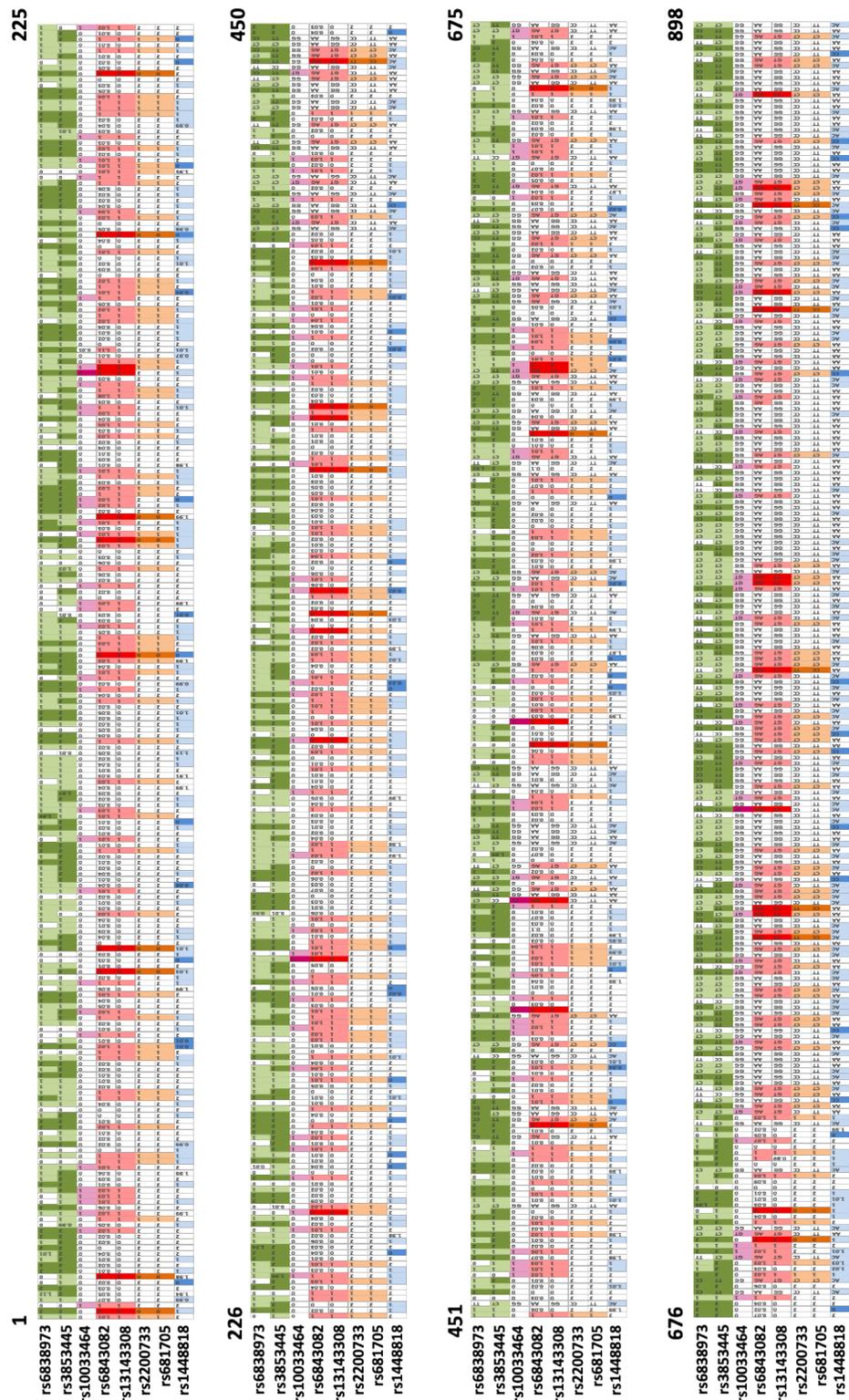


Figura 1. Esquema gráfico de las variantes de riesgo localizadas en 4q25 que presentan los pacientes del estudio. Las casillas blancas indican la presencia de 2 alelos normales, las de color claro se corresponden con la presencia de 1 alelo de riesgo, y las de color oscuro indican que el paciente presenta 2 alelos de riesgo.

Se calcularon las frecuencias de homocigotos de referencia, heterocigotos y homocigotos de riesgo (**Figura 2A**), así como la frecuencia y OR del alelo de riesgo en pacientes sin FA y con FA (**Figura 2B**) en las variantes de riesgo rs1448818, rs6817105, rs2200733, rs13143308, rs6843082, rs10033464, rs3853445 y rs6838973 localizadas en la región 4q25.

Por otro lado, también se calculó la frecuencia fenotípica y OR en pacientes sin y con FA considerando que el efecto del alelo de riesgo era dominante (**Figura 2C**) o recesivo (**Figura 2D**).

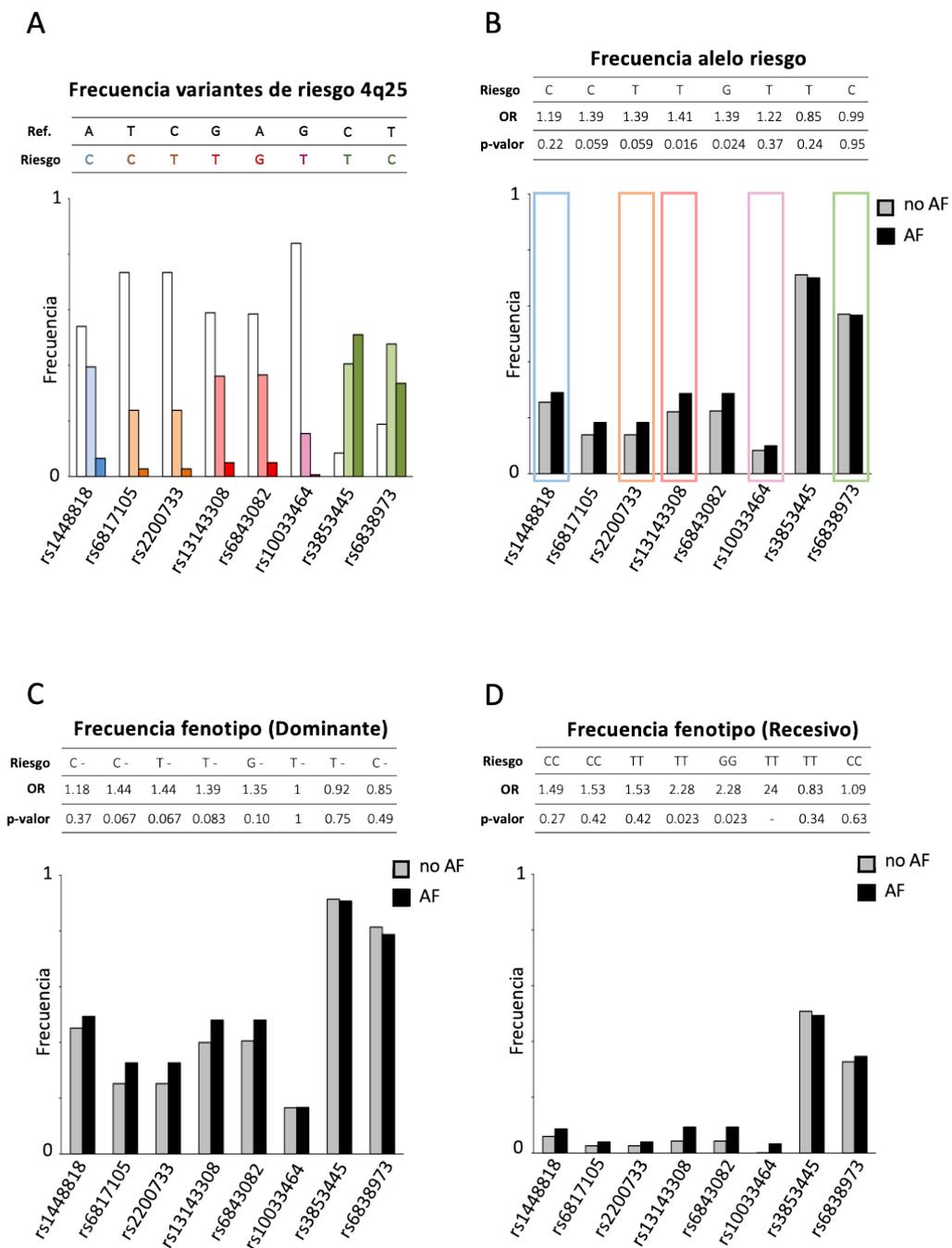


Figura 2. Frecuencias y OR de las variantes de riesgo localizadas en 4q25. **A)** Frecuencia de homocigotos de referencia (barras blancas), de heterocigotos (barras tonos claros) y homocigotos de riesgo (barras tonos oscuros) en las variantes de riesgo localizadas en 4q25. En la parte superior se indica los alelos que se han considerado como referencia y riesgo. Se ha utilizado la prueba de Chi-Cuadrado para determinar si las variantes de riesgo están ligadas genéticamente. **B)** Frecuencias del alelo de riesgo de las variantes de 4q25 en pacientes sin y con FA. **C)** Frecuencias fenotípicas de las variantes de 4q25 calculadas en pacientes con y sin FA, considerando que el alelo de riesgo tiene un efecto dominante. **D)** Frecuencias fenotípicas de las variantes de 4q25 calculadas en pacientes con y sin FA, considerando que el alelo de riesgo tiene un efecto recesivo. En la parte superior de las figuras B, C y D se indica el alelo o fenotipo que se ha considerado de riesgo, así como el OR calculado con la prueba exacta de Fisher y el p-valor.

El cálculo de las frecuencias y OR realizado mostró que las variantes rs6817105 y rs2200733, así como las variantes rs13143308 y rs6843082 presentaban exactamente la misma frecuencia, confirmándose que están ligadas genéticamente. Las variantes rs3853445 y rs6838973 no mostraban exactamente la misma frecuencia, pero la prueba de Chi cuadrado confirmó que también estaban ligadas genéticamente ($p < 0.00001$). Lo mismo ocurrió con las variantes rs13143308 y rs2200733 (prueba de Chi cuadrado, $p < 0.00001$), así como con las variantes rs13143308 y rs10033464 (prueba de Chi cuadrado, $p < 0.00001$). Por esa razón, se realizó una selección de las variantes con las que íbamos a seguir presentando los resultados, ya que muchas de ellas presentaban una frecuencia idéntica. Así, se eligieron las variantes rs1448818, rs2200733, rs13143308, rs10033464 y rs6838973, señaladas en la **Figura 2B** con recuadros.

El genotipado de los 898 pacientes de nuestro estudio únicamente confirmó la asociación de la variante rs13143308 a la FA, en la que la frecuencia de esta variante fue significativamente superior en pacientes con FA ($p = 0.016$). Sin embargo, las frecuencias del alelo de riesgo en nuestra población de estudio se asemejan a datos de estudios anteriores con un tamaño de muestreo más grande (135,170), donde el resto de las variantes de riesgo también se asociaron de forma significativa a la FA.

Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio

Las muestras de tejido auricular humano incluidas en este estudio se obtuvieron de 58 pacientes sin FA sometidos a cirugía cardíaca en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Los datos clínicos y ecocardiográficos, así como los tratamientos farmacológicos de dichos pacientes están recogidos en la **Tabla 1**.

	No FA
N	58
Hombres	40 (69%)
Mujeres	18 (31%)
Índice DAI	2.34 [2.26;2.43]
Edad	67.0 [65.0;69.0]
Fumadores	9 (15.5%)
Ex fumadores	22 (37.9%)
Alcohol	3 (5.2%)
Hipertensión	39 (67.2%)
Diabetes	23 (39.7%)
Dislipemia	40 (69.0%)
FEVI	57.0 [55.0;59.0]
SVM	5 (8.6%)
SVA	29 (50%)
SVT	1 (1.7%)
CABG	37 (63.8%)
IECA	25 (43.1%)
β-Bloqueantes	23 (39.7%)
ARA-II	13 (22.4%)
Antagonistas- Ca	11 (19%)
Dicumarinas	5 (8.6%)
Digoxina	0 (0%)
Aspirina	32 (55.2%)
Estatinas	44 (75.9%)

Tabla 1. Características clínicas de la población de estudio para el análisis electrofisiológico. Los valores categóricos corresponden al número de pacientes y el % de pacientes se da entre paréntesis. Los valores continuos corresponden a la media ± error estándar entre paréntesis. Abreviaciones: Índice DAI: índice diámetro aurícula izquierda; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; SVA: sustitución válvula aórtica; SVT: sustitución válvula tricúspide; CABG: *coronary artery bypass graft* o derivación aortocoronaria con injerto; IECA: inhibidor de la enzima convertora de la angiotensina; ARA-II: antagonistas de los receptores de angiotensina II.

Efecto de las variantes de 4q25 sobre la I_{Ca}

Para comprobar si la reducción de la I_{Ca} observada en los pacientes con FA (164–166) podría estar vinculada a la presencia de variantes de riesgo, se analizó el efecto individual que tenían las variantes de riesgo de 4q25 sobre la amplitud y las propiedades de la I_{Ca} en 58

pacientes sin FA. Inicialmente, tal como se muestra en la **Tabla 2**, los datos de cada variante se dividieron en 3 grupos: homocigotos de referencia, heterocigotos y homocigotos de riesgo.

Como se puede apreciar, el número de pacientes que presentan 2 alelos de riesgo en algunas variantes es muy bajo como para considerarlo un grupo individual y poder extraer conclusiones sólidas. Así que teniendo en cuenta el número de pacientes, los resultados de la **Tabla 2** y con la ayuda de los OR observados en la **Figura 2**, se tomó la decisión de seguir analizando los resultados considerando que el alelo de riesgo tenía un efecto dominante en todas las variantes.

	rs1448818			rs2200733			rs13143308			rs10033464			rs6838973		
ALELO RIESGO	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2
I_{Ca}	-2.44 ± 0.2	-1.77 ± 0.23	-0.47 ± 0.17	-2.2 ± 0.18	-1.80 ± 0.31	-1.03	-2.01 ± 0.19	-2.27 ± 0.26	-1.03	-1.94 ± 0.16	-2.79 ± 0.38	-	-1.42 ± 0.25	-2.23 ± 0.23	-2.26 ± 0.27
N	34	21	3	45	12	1	34	23	1	47	11	0	10	29	19

Tabla 2. Amplitud de I_{Ca} en homocigotos de referencia, heterocigotos y homocigotos de riesgo. Para cada variante, los pacientes se han dividido en función de si presentan 0, 1 o 2 alelos de riesgo. En la fila del medio encontramos la media de la amplitud de I_{Ca} ± error estándar de cada grupo, y en la fila inferior el número de pacientes de cada grupo.

El análisis del efecto de las variantes de riesgo de 4q25 sobre la amplitud de la I_{Ca} (**Figura 3A**) mostró que no había diferencias significativas entre los pacientes que presentaban la variante de riesgo en rs2200733 o en rs13143308 y los que no. Sin embargo, demostró que la presencia de la variante de riesgo en rs1448818 producía una reducción significativa de la I_{Ca} . Además, se observó que en aquellos pacientes que presentaban la variante de riesgo en rs10033464 la amplitud de la I_{Ca} estaba aumentada significativamente. Finalmente, un hallazgo curioso fue apreciar una reducción significativa de la I_{Ca} en aquellos pacientes que presentaban la variante normal de rs6838973.

Además, para analizar el efecto específico de cada una de las 5 variantes teniendo en cuenta la presencia del resto de variantes se realizó un modelo de regresión lineal multivariado para la I_{Ca} , ya que presenta una distribución normal. Este análisis confirmó el efecto de las variantes rs1448818 ($p=0.031$), rs10033464 ($p=0.023$) y rs6838973 ($p=0.041$).

En cambio, al analizar la relación intensidad-voltaje (I-V) (**Figura 3B**) se pudo apreciar que no había diferencias en la forma de la curva entre los pacientes que presentaban las variantes de riesgo y los que no, indicando que, aunque algunas variantes afectaban a la amplitud de I_{Ca} , no alteraban las propiedades de apertura de los $Ca_v1.2$.

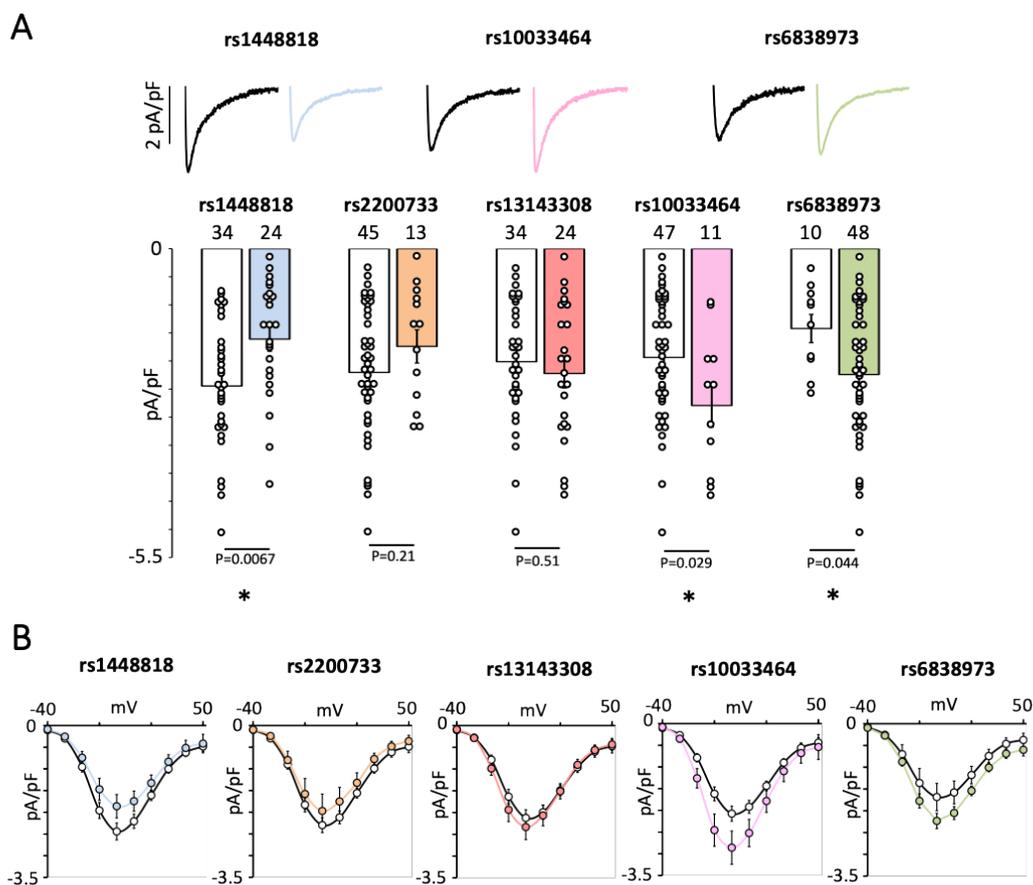


Figura 3. Amplitud de I_{Ca} en las diferentes variantes de riesgo 4q25. A) En la parte superior se muestran registros representativos de I_{Ca} para las variantes rs1448818, rs10033464 y rs6838973. Los grupos de pacientes que presentan el fenotipo normal están representados en negro y los que presentan el fenotipo de riesgo están representados en el color que corresponde a cada variante. En la parte inferior se muestra la media de la amplitud de I_{Ca} para cada grupo de pacientes, donde las barras blancas corresponden a los pacientes que presentan fenotipo normal, y las de color a aquellos que presentan el fenotipo de riesgo. Para la comparación de medias en cada variante se ha utilizado la prueba t de Student. Los p-valor se dan para la comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra encima de cada barra. Los * indican las variantes que han resultado tener un efecto significativo cuando se ha realizado el modelo de regresión lineal multivariado, siendo $*: < 0.05$. **B)** Se muestra la media de las curvas I-V para cada variante en pacientes que no presentan variante de riesgo (curvas negras) y en pacientes que presentan variante de riesgo (curvas de color en función de la variante). El análisis ANOVA de medidas repetidas de las curvas I-V sólo mostró una interacción significativa entre el voltaje y la variante de riesgo en rs10033464 ($p < 0.01$).

Tras el hallazgo sorprendente de una menor amplitud de I_{Ca} en pacientes con variante normal en rs6838973, quisimos analizar la presencia de otras variantes en estos pacientes. Como se puede apreciar en la **Figura 4**, 6 de los 10 pacientes que presentaban variante normal en rs6838973 presentaban variante de riesgo en rs1448818, sugiriendo que la influencia de la variante de riesgo en rs1448818 podría contribuir a la reducción observada en pacientes con variante normal en rs6838973.

I_{Ca}	rs1448818 A C	rs2200733 C T	rs13143308 T G	rs10033464 T G	rs6838973 C T
-0.818678851	0	0	0	0	2
-0.670218251	2	0	0	0	2
-2.4542979	0	0	0	0	2
-0.334572491	1	0	0	0	2
-0.945783	0	0	1	1	2
-2.0188868	1	0	1	1	2
-1.395099267	1	1	1	0	2
-2.632268425	1	0	0	0	2
-1.961187102	0	0	0	0	2
-0.991661032	1	0	1	1	2

Figura 4. Distribución de variantes de riesgo en 4q25 en los pacientes que presentaban la variante normal en rs6838973.

Además, quisimos analizar las características clínicas de los pacientes con y sin variante de riesgo en rs1448818 o en rs10033464 (**Tabla 3**) para ver si estas eran significativamente diferentes como para influir en el efecto observado. Sólo se tuvieron en cuenta aquellos datos clínicos más relevantes. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para los datos categóricos de la **Tabla 3**, y la prueba t de Student para los datos continuos.

Para la variante rs1448818, el análisis estadístico mostró un p-valor significativo para el tratamiento con ARA-II ($p=0.028$) y con AAS ($p=0.033$), por lo que no se podría descartar que estos factores clínicos también pudieran influir en el efecto de las variantes de riesgo.

En cambio, el análisis de los datos clínicos para la variante rs10033464 no mostró ninguna diferencia significativa entre los pacientes portadores de variante de riesgo y los no portadores. Aún así, no se podría descartar la influencia de los factores clínicos ya que el grupo que presenta variante de riesgo es muy pequeño, por lo que podría ser que el poder estadístico no fuese suficiente para poder determinar alguna asociación si es que la hubiese.

	rs1448818			rs10033464		
	No riesgo	Riesgo	p-valor	No riesgo	Riesgo	p-valor
N	34	24		47	11	
Hombres	25 (73.5%)	15 (62.5%)	ns	32 (68%)	8 (72.7%)	ns
Mujeres	9 (26.5%)	9 (37.5%)	ns	15 (31.9%)	3 (27.3%)	ns
Índice DAI	2.41 [2.27;2.56]	2.27 [2.18;2.37]	ns	2.34 [2.25;2.43]	2.36 [2.07;2.65]	ns
Edad	67 [65.0;69.0]	67 [65.0;69.0]	ns	67 [65.0;69.0]	66 [62.0;70.0]	ns
Fumadores	8 (23.5%)	1 (4.2%)	ns	6 (12.8%)	3 (27.3%)	ns
Ex fumadores	12 (35.3%)	10 (41.7)	ns	18 (38.3%)	4 (36.4%)	ns
Hipertensión	20 (58.8%)	18 (75%)	ns	32 (68.1%)	7 (63.6%)	ns
Diabetes	14 (41.1%)	9 (37.5%)	ns	19 (40.4%)	4 (36.4%)	ns
Dislipemia	26 (76.5%)	14 (58.3%)	ns	32 (68.1%)	8 (72.7%)	ns
FEVI	57 [55.0;59.0]	58 [55.0;61.0]	ns	57 [55.0;59.0]	57 [52.0;62.0]	ns
SVA	14 (41.2%)	15 (62.5%)	ns	14 (29.8%)	6 (54.5%)	ns
CABG	25 (73.5%)	12 (50%)	ns	27 (57.4%)	5 (45.5%)	ns
IECA	15 (44.1%)	10 (41.7%)	ns	17 (36.2%)	2 (18.2%)	ns
β-Bloqueantes	15 (44.1%)	8 (33.3%)	ns	15 (31.9%)	1 (9.1%)	ns
ARA-II	4 (11.8%)	9 (37.5%)	0.028	5 (10.6%)	3 (27.3%)	ns
Antagonistas- Ca	6 (17.6%)	5 (20.8%)	ns	5 (10.6%)	3 (27.3%)	ns
Aspirina	23 (67.6%)	9 (37.5%)	0.033	22 (46.8%)	3 (27.3%)	ns
Estatinas	29 (85.3%)	15 (62.5%)	ns	29 (61.7%)	6 (54.5%)	ns

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes sin y con variante de riesgo en rs1448818 o rs10033464. Los valores categóricos corresponden al número de pacientes y el % de pacientes se da entre paréntesis. Los valores continuos corresponden a la media \pm error estándar entre paréntesis. Abreviaciones: Índice DAI: índice diámetro aurícula izquierda; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; SVA: sustitución válvula aórtica; CABG: *coronary artery bypass graft* o derivación aortocoronaria con injerto; IECA: inhibidor de la enzima convertora de la angiotensina; ARA-II: antagonistas de los receptores de angiotensina II; ns: no significativo.

De acuerdo con una modulación de la constante de desaparición de la I_{Ca} (tau) por la propia I_{Ca} , también se apreciaron diferencias significativas en tau (**Figura 5A**). Así, se observó que aquellos pacientes con variante de riesgo en rs1448818 presentaban una tau significativamente más lenta. Por el contrario, se pudo apreciar que la presencia de variante de riesgo en rs10033464 mostraba una tendencia a que tau fuese más rápida, aunque no fue significativamente diferente. En la **Figura 5B** se puede apreciar que existe una correlación positiva moderada entre la amplitud de la I_{Ca} y tau ($r= 0.47$, $p<0.001$).

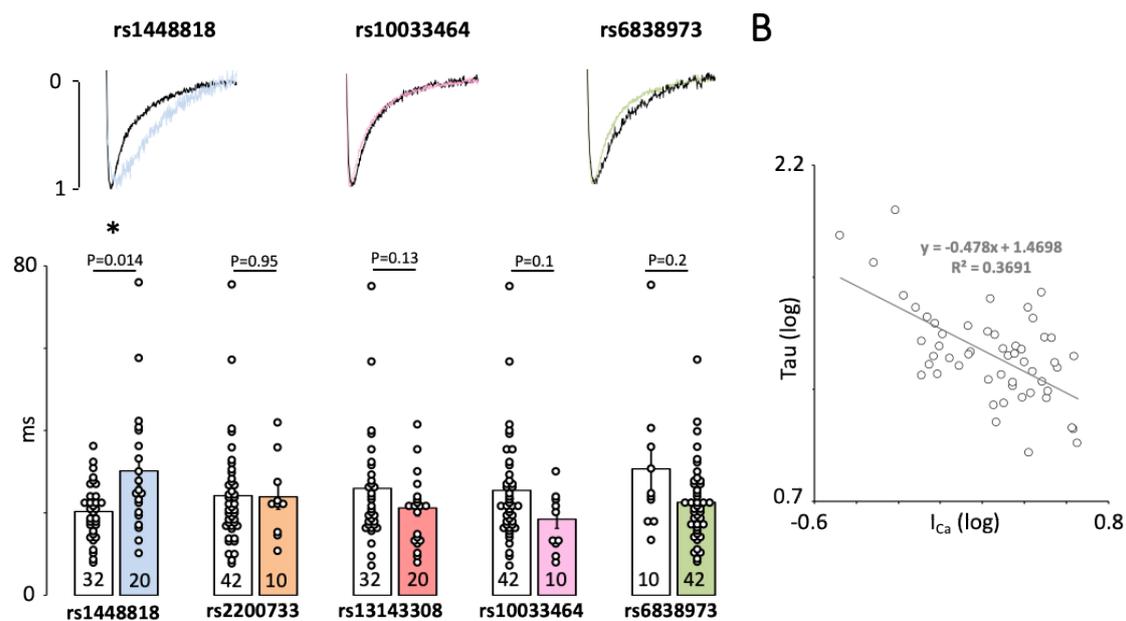


Figura 5. Constante de desaparición de I_{Ca} (tau) y correlación entre amplitud de I_{Ca} y tau. A) En la parte superior se muestran registros representativos de I_{Ca} superpuestos para las variantes rs1448818, rs10033464 y rs6838973. Los grupos de pacientes que presentan el fenotipo normal están representados en negro y los que presentan el fenotipo de riesgo están representados en el color que corresponde a cada variante. En la parte inferior se muestra la media de la tau de I_{Ca} para cada grupo de pacientes, donde las barras blancas corresponden a los pacientes que presentan fenotipo normal, y las de color a aquellos que presentan el fenotipo de riesgo. Para la comparación de medias en cada variante se ha utilizado la prueba t de Student. Los p-valor se dan para la comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra en cada barra. El * indica la variante que ha resultado tener un efecto significativo cuando se ha realizado el modelo de regresión lineal multivariado, siendo $*: < 0.05$. **B)** Gráfico de correlación entre tau y amplitud de I_{Ca} . Los valores de ambas variables se transformaron a su valor logarítmico.

En este caso, también se analizó el efecto específico de cada una de las 5 variantes teniendo en cuenta la presencia del resto de variantes con un modelo de regresión lineal multivariado. Este análisis confirmó el efecto de la variante rs1448818 ($p=0.023$), pero no mostró un efecto significativo para el resto de variantes.

Al igual que ocurrió al analizar la relación I-V, la comparación de la inactivación voltaje-dependiente de la I_{Ca} (**Figura 6A**) o la recuperación de la inactivación (**Figura 6B**) entre los pacientes con fenotipo normal y los pacientes con fenotipo de riesgo reveló que no había diferencias, afirmando que las propiedades de cierre, inactivación y re-apertura de los $Ca_v1.2$ no se vieron alteradas por la presencia de las variantes de riesgo.

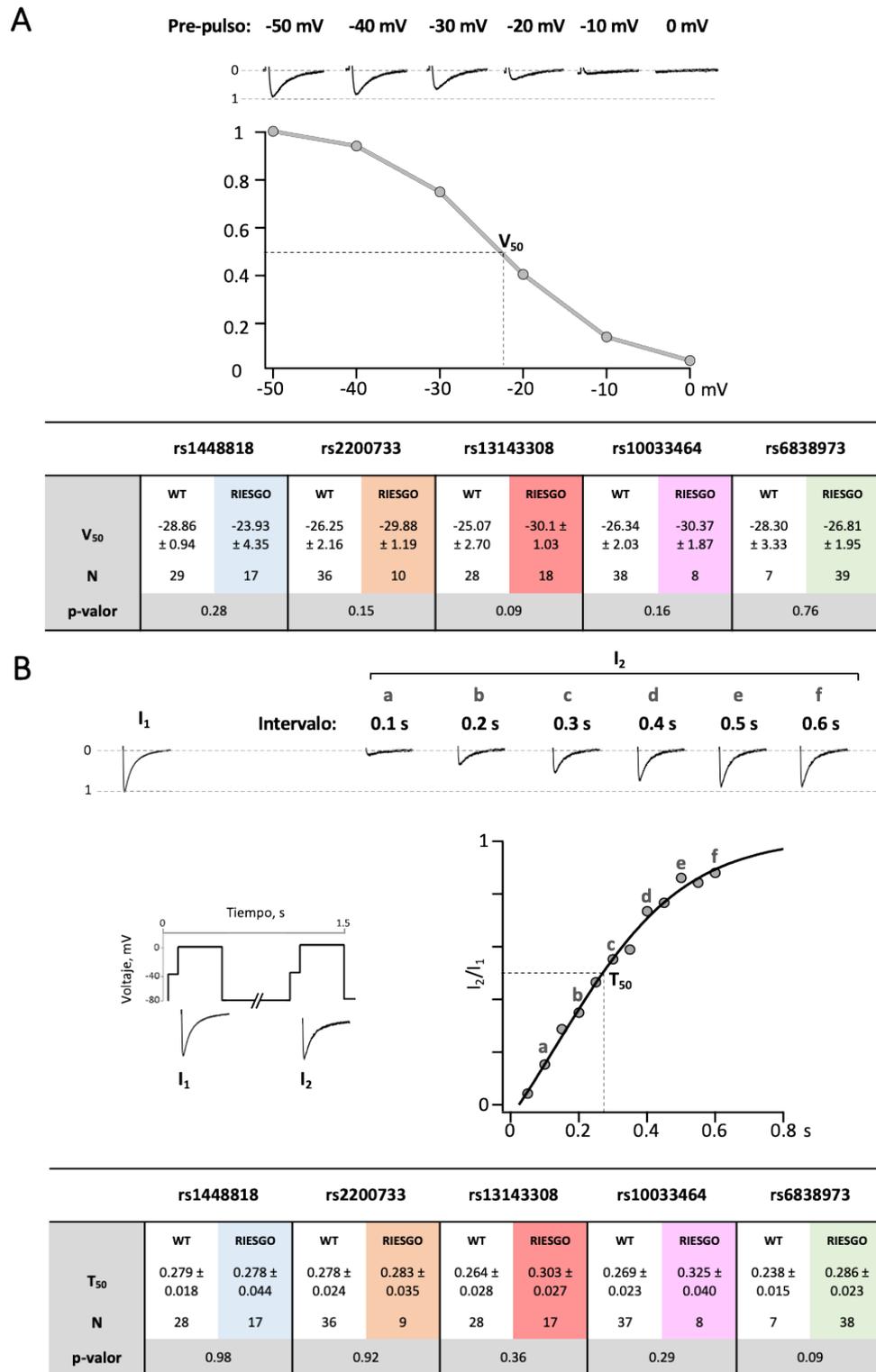


Figura 6. La presencia de las variantes de riesgo de 4q25 no altera las propiedades de apertura de los $Ca_v1.2$ **A)** En la parte superior se muestran registros representativos de I_{Ca} para cada voltaje de la curva de inactivación. En la curva de inactivación se muestra el V_{50} que es el voltaje al cual la I_{Ca} está inactivada al 50%, el cual se utiliza para comparar la inactivación de I_{Ca} . En la parte inferior se muestra una tabla en la que se compara para cada variante de riesgo de 4q25 la media de V_{50} entre pacientes con y

sin variante de riesgo. La tabla contiene el número de pacientes de cada grupo, así como el p-valor obtenido tras realizar la prueba t de Student. **B)** En la parte superior se muestran registros representativos de I_{Ca} para cada intervalo entre pulsos. Justo debajo de los registros se muestra el protocolo utilizado para medir la recuperación de la inactivación a la izquierda, y la curva de recuperación de la inactivación de I_{Ca} a la derecha. En la curva se muestra el T_{50} que es el tiempo que ha tenido que transcurrir para que la amplitud de I_{Ca} se haya recuperado un 50%, y es el valor que se utiliza para comparar la recuperación de la inactivación de I_{Ca} . En la parte inferior se muestra una tabla en la que se compara para cada variante de riesgo de 4q25 la media de T_{50} entre pacientes con y sin variante de riesgo. La tabla contiene el número de pacientes de cada grupo, así como el p-valor obtenido tras realizar la prueba t de Student.

Para comprobar si la diferencia apreciada en la amplitud de la I_{Ca} era debida a una diferencia en la expresión de los $Ca_v1.2$, estos se marcaron mediante la técnica de marcaje inmunofluorescente. Aunque para algunas variantes el número de pacientes era limitado, el análisis del marcaje inmunofluorescente mostró que no parecía haber diferencias en la densidad de los $Ca_v1.2$ entre los pacientes con y sin variante de riesgo (**Figura 7**).

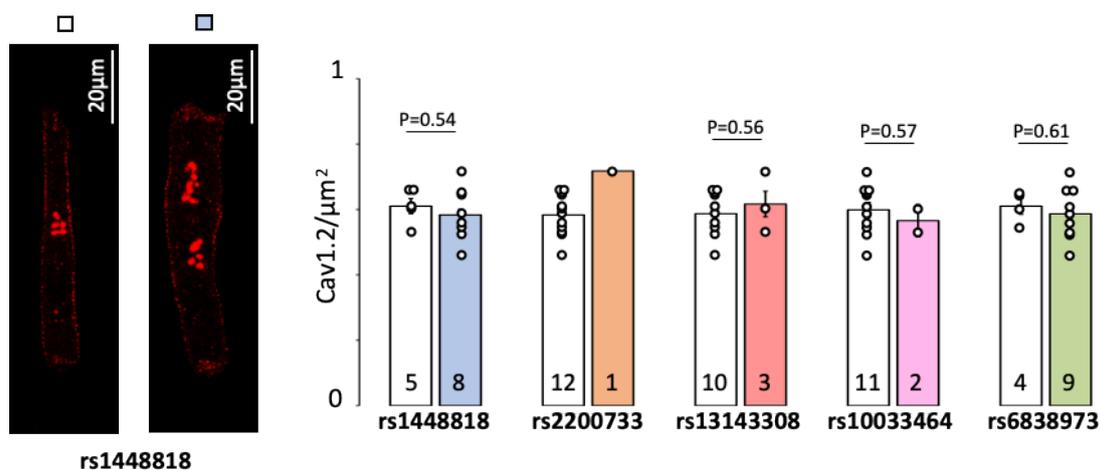


Figura 7. Comparación de la densidad de $Ca_v1.2$ para las diferentes variantes de 4q25 entre pacientes que presentan fenotipo normal y los que presentan fenotipo de riesgo. A la izquierda se muestran imágenes representativas de miocitos auriculares aislados que presentan los $Ca_v1.2$ marcados en rojo mediante la técnica de inmunofluorescencia. Tenemos una imagen representativa para el grupo de pacientes con variante normal de rs1448818, y otra para el grupo de pacientes que presenta la variante de riesgo. A la derecha se muestra la media de densidad de I_{Ca} para cada grupo de pacientes. Para la comparación entre medias en cada variante se ha utilizado la prueba t de Student. La n se da en cada barra y el p-valor se muestra para cada comparación entre barras.

Hallazgos principales

Este estudio es el primero en analizar con detalle las variantes de riesgo de la región de 4q25 que se segregan de forma independiente con el objetivo de investigar el efecto específico de estas variantes de riesgo sobre la homeostasis del calcio en miocitos auriculares humanos. Este análisis demostró que la presencia de la variante de riesgo en rs1448818 y rs10033464 afecta a la amplitud de la I_{Ca} de forma significativa. En el caso de los pacientes con variante de riesgo en rs1448818 se pudo apreciar una reducción significativa de I_{Ca} . Por el contrario, en los pacientes que presentaban la variante de riesgo en rs10033464 se observó un aumento significativo en la amplitud de I_{Ca} . Estos hallazgos demuestran que hay diferentes bloques genéticos dentro de la región 4q25 con efectos funcionales distintos, precisando la determinación del mecanismo subyacente en cada una de ellos para así poder identificar dianas terapéuticas específicas.

II- EFECTO DE LAS VARIANTES 4q25 SOBRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN MIOCITOS AURICULARES HUMANOS

INTRODUCCIÓN

La FA se ha asociado a varios factores de riesgo como la hipertensión, la obesidad, enfermedades cardiovasculares previas y historia de FA familiar (171). La aparición de focos ectópicos eléctricos en las venas pulmonares y la aparición de rotores eléctricos son algunos de los mecanismos propuestos para el desarrollo de FA (172). Además, el remodelado estructural involucrado en la fibrosis auricular o en la dilatación auricular se ha asociado con el inicio de la FA (173,174). Por otro lado, a nivel molecular la FA se ha asociado con diferentes alteraciones en la homeostasis del calcio como la reducción de la corriente de entrada de calcio a través de los $Ca_v1.2$ (164–166), el incremento de liberaciones espontáneas de calcio del RS (4,5,7,166,175) y el incremento de despolarizaciones tardías de la membrana inducidas por liberaciones espontáneas de calcio (175). El remodelado eléctrico por un acortamiento en el periodo refractario auricular y la duración del PA también se han propuesto como mecanismos responsables del desarrollo de FA (176).

Aunque la prevalencia de la FA es elevada, sus bases genéticas no están claras. Se han asociado algunas mutaciones en diversos canales iónicos a la FA familiar (128), pero son una minoría de los casos. Varios estudios de GWAS han identificado variantes de riesgo asociadas a FA en distintos cromosomas (12,130–135), pero en este capítulo nos vamos a centrar en las variantes de riesgo localizadas en 4q25. Hay estudios que demuestran que algunas de las variantes de 4q25 pueden modificar el riesgo de recurrencia de FA después de la ablación por catéter (146,147), así como la respuesta al tratamiento con fármacos antiarritmogénicos (148).

Los SNPs de 4q25 que se han relacionado con la FA están localizados en una región intergénica no codificante próxima al gen *PITX2* (130) que codifica para un factor de transcripción crucial durante el desarrollo cardíaco (136,137) y la formación de las venas pulmonares (139). Por ello, se postuló que la disfunción de *PITX2c* podría ser responsable del desarrollo de FA (130). Estudios de diferentes laboratorios, incluido el nuestro,

evidencian que la pérdida de función de PITX2c predispone a la arritmogénesis auricular (140,143,144,177) y provoca alteraciones en la homeostasis del calcio (145).

Por otro lado, nuestro laboratorio vinculó recientemente la variante de riesgo rs13143308T de 4q25 con un aumento en la fosforilación del RyR2 en ser2808, en la liberación espontánea de calcio y con un incremento de la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos (13).

Por ello, este capítulo tiene como objetivo ver si otras variantes de riesgo en la región de 4q25 también tienen efecto sobre la actividad eléctrica espontánea en miocitos auriculares humanos, y estudiar con mayor profundidad los mecanismos subyacentes.

RESULTADOS

Efecto de las variantes de riesgo de 4q25 sobre los I_{T1}

El estudio electrofisiológico se ha llevado a cabo en los mismos 58 pacientes utilizados para el estudio de la I_{Ca} realizado en el Capítulo I, por lo que en las características clínicas de los pacientes se pueden ver en la **Tabla 1** del Capítulo I. Además, los resultados de este capítulo se presentan siguiendo el mismo código de colores que en el Capítulo I, ya que seguimos analizando el efecto de las mismas variantes.

Un estudio previo de nuestro laboratorio ya asoció la variante de riesgo rs13143308T a un incremento de las liberaciones espontáneas de calcio y de la actividad eléctrica (13), pero en vista de los hallazgos del efecto de las variantes rs1448818 y rs10033464 sobre la I_{Ca} quisimos investigar con mayor detenimiento el efecto de todas las variantes de riesgo de 4q25 sobre la frecuencia y amplitud de I_{T1} .

Tal como se había reportado por Herraiz-Martinez et al. (13), el análisis de las corrientes I_{T1} realizado a -80 mV (**Figura 1A-B**) demuestra que la presencia de la variante de riesgo en rs13143308 produce un incremento significativo de la frecuencia de I_{T1} . Además, se pudo apreciar que la presencia de la variante de riesgo en rs10033464 también produce un incremento significativo de la frecuencia de I_{T1} . El hecho de que la presencia de la variante de riesgo en rs13143308 siempre vaya acompañada de una variante de riesgo en rs2200733 o

en rs10033464, hace que el efecto apreciado en la variante de riesgo de rs13143308 tenga la influencia de ambas y que los controles no tengan ninguna variante de riesgo en rs2200733 o en rs10033464.

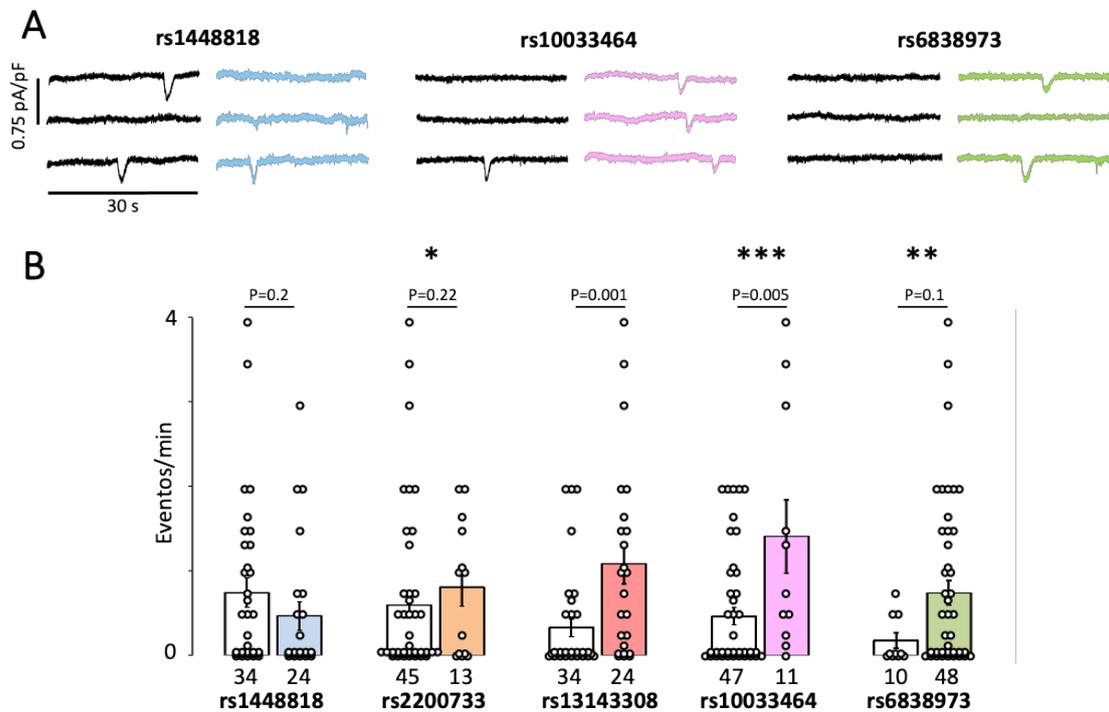


Figura 1. Efecto de las variantes de 4q25 sobre las corrientes transitorias de membrana inducidas (I_{T1}) por la liberación espontánea de calcio. A) Registros representativos de I_{T1} en miocitos auriculares humanos de pacientes que no presentan variante de riesgo (registros negros) y de pacientes que presentan la variante de riesgo (registros del color correspondiente a cada variante). **B)** Media de la frecuencia de I_{T1} en miocitos de pacientes sin variante de riesgo (barras blancas) y con variante de riesgo (barras del color correspondiente a cada variante) medidas a -80 mV. Para la comparación de medias en cada variante se utilizó la prueba de Wilcoxon (no paramétrico). Los p-valor se dan para la comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra debajo de cada barra. Los * indican las variantes que han resultado tener un efecto significativo cuando se ha realizado el modelo de regresión lineal con distribución binomial negativa, siendo *:<0.05; **:<0.01; ***:<0.001.

Además, para analizar el efecto específico de cada una de las 5 variantes teniendo en cuenta la presencia del resto de variantes se realizó un modelo de regresión lineal con distribución binomial negativa para los I_{T1}, ya que los datos se ajustan mejor a esta distribución que a una distribución normal. Este análisis confirmó el efecto de las variantes rs2200733 (p=0.035), rs10033464 (p<0.001) y rs6838973 (p=0.001).

Al igual que en el Capítulo I, se analizó si había diferencias en las características clínicas de los pacientes con y sin variante de riesgo en rs13143308 (**Tabla 1**), para ver si estas podrían influir en el efecto observado. Se analizó en la variante rs13143308 porque los grupos de riesgo en la variante rs2200733 y rs10033464 son muy pequeños, por lo que el poder estadístico podría no ser suficiente para determinar si las características clínicas pueden influir en el efecto de las variantes. Sólo se tuvieron en cuenta aquellos datos clínicos más relevantes. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para los datos categóricos y la prueba t de Student para los datos continuos. En este caso el análisis estadístico no mostró diferencias significativas para ninguna de las características clínicas, por lo que parece que estas no influirían en el efecto de las variantes de riesgo sobre los I_{TI}.

	rs13143308		
	No riesgo	Riesgo	p-valor
N	34	24	
Hombres	24 (70.6%)	16 (66.7%)	ns
Mujeres	10 (29.4%)	8 (33.3%)	ns
Índice DAI	2.27 [2.17;2.37]	2.41 [2.27;2.56]	ns
Edad	68 [66.0;70.0]	65 [63.0;68.0]	ns
Fumadores	5 (14.7%)	4 (16.7%)	ns
Ex fumadores	12 (35.3%)	8 (33.3%)	ns
Hipertensión	21 (61.8%)	17 (70.8%)	ns
Diabetes	15 (44.1%)	7 (29.2%)	ns
Dislipemia	23 (67.6%)	16 (66.7%)	ns
FEVI	59 [57.0;61.0]	56 [53.0;58.0]	ns
SVA	15 (44.1%)	14 (58.3%)	ns
CABG	25 (73.5%)	12 (50.0%)	ns
IECA	16 (47.0%)	9 (37.5%)	ns
β-Bloqueantes	15 (44.1%)	8 (33.3%)	ns
ARA-II	8 (23.5%)	5 (20.8%)	ns
Antagonistas- Ca	6 (17.6%)	5 (20.8%)	ns
Aspirina	19 (55.9%)	13 (54.2%)	ns
Estatinas	26 (76.5%)	18 (75.0%)	ns

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes sin y con variante de riesgo en rs13143308. Los valores categóricos corresponden al número de pacientes y el % de pacientes se da entre paréntesis. Los valores continuos corresponden a la media ± error estándar entre paréntesis. Abreviaciones: Índice DAI: índice diámetro aurícula izquierda; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; SVA: sustitución válvula aórtica; CABG: *coronary artery bypass graft* o derivación aortocoronaria con injerto; IECA: inhibidor de la enzima convertora de la angiotensina; ARA-II: antagonistas de los receptores de angiotensina II; ns: no significativo.

Por otro lado, al analizar la amplitud de los I_{T1} (**Figura 2A-B**) se pudo apreciar una cierta tendencia a que el aumento de la frecuencia de I_{T1} se acompañase de una reducción de su amplitud, aunque en ningún caso fue significativa, y no se pudo demostrar una correlación entre la frecuencia y amplitud de I_{T1} ($r=-0.17$; $p=0.4$).

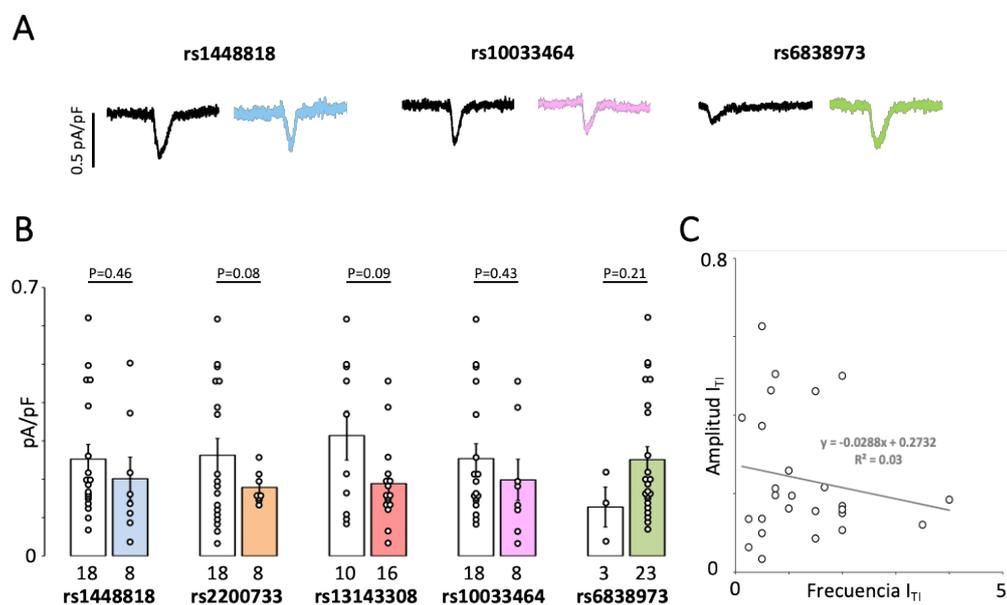


Figura 2. Las variantes de riesgo en 4q25 no modifican la amplitud de los I_{T1} . **A)** Registros representativos en los que se muestra la amplitud de I_{T1} en miocitos auriculares humanos de pacientes sin variante de riesgo (registros negros) y con variante de riesgo (registros del color correspondiente a cada variante) en 4q25. **B)** Media de la amplitud de I_{T1} en miocitos de pacientes sin variante de riesgo (barras blancas) y con variante de riesgo (barras del color correspondiente a cada variante). Para la comparación de medias en cada variante se ha utilizado la prueba t de Student. Los p-valor se dan para la comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra debajo de cada barra. **C)** Gráfico de correlación entre la frecuencia (eventos/min) y amplitud (pA/pF) de I_{T1} .

Efecto de las variantes 4q25 sobre el contenido de calcio del RS

Los I_{T1} se generan debido a la expulsión, a través de NCX-1, del calcio liberado de forma espontánea del RS. Por ello, se analizó el efecto de las variantes de riesgo de 4q25 sobre el contenido de calcio del RS, ya que un aumento del contenido de calcio del RS podría inducir un incremento de liberaciones espontáneas del RS. El análisis reveló que los pacientes que presentaban variante de riesgo en rs13143308 tenían un incremento significativo en el contenido de calcio del RS. Sin embargo, en el resto de variantes de riesgo no se apreciaron diferencias significativas (**Figura 3**).

En cambio, al analizar el efecto específico de cada una de las 5 variantes teniendo en cuenta la presencia del resto de variantes con un modelo de regresión lineal multivariado, este mostró que la variante rs10033464 también tenía un efecto significativo ($p=0.037$) sobre el contenido de calcio del RS.

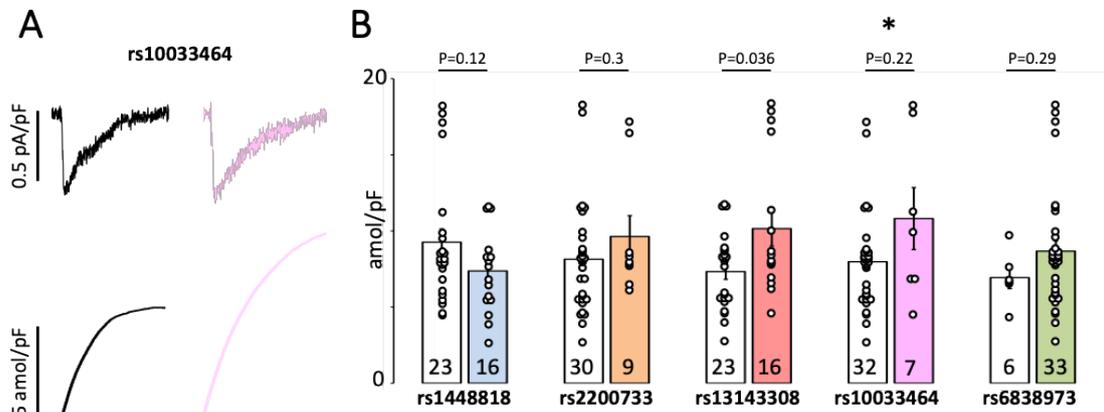


Figura 3. Efecto de las variantes de riesgo en 4q25 sobre el contenido de calcio del RS. **A)** Se muestran registros representativos de la corriente generada por la aplicación de cafeína (10 mM) y su respectiva integral en miocitos auriculares de pacientes que no presentan variante de riesgo (negros) y de pacientes que presentan la variante de riesgo en rs10033464 (color correspondiente a dicha variante). **B)** Se muestra para cada variante de riesgo de 4q25, la media del contenido de calcio del RS en pacientes que no presentan la variante de riesgo (barras blancas) y en pacientes que presentan la variante de riesgo (barras de color correspondiente a cada variante). Para la comparación de medias en cada variante se ha utilizado la prueba t de Student. Los p-valor se dan para la comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra en cada barra. El * indica la variante que ha resultado tener un efecto significativo cuando se ha realizado el modelo de regresión lineal multivariado, siendo $*: <0.05$.

Efecto de las variantes de riesgo en 4q25 sobre la densidad y fosforilación del RyR2

Para determinar si el mecanismo detrás del incremento de I_{TT} en los pacientes que presentaban variante de riesgo en rs2200733, rs13143308 y en rs10033464 podría ser debido a un incremento en la fosforilación del RyR2, se midió la densidad y el estado de fosforilación de cada clúster de RyR2 en su residuo ser2808 y ser2814. Este análisis mostró que en ninguna de las variantes de riesgo de 4q25 asociadas a FA había diferencias en la densidad de RyR2 entre los pacientes que presentaban variante de riesgo y los que no (**Figura 4A**). Sin embargo, el análisis de la fosforilación del RyR2 en el residuo ser2808 reveló que los pacientes con variante de riesgo en rs2200733 o rs13143308 presentaban un incremento significativo de la

fosforilación respecto a los que no presentaban variante de riesgo (**Figura 4B**). Además, el modelo de regresión lineal multivariado confirmó el efecto significativo de la variante rs2200733 ($p=0.003$) sobre la fosforilación del RyR2 en ser2808.

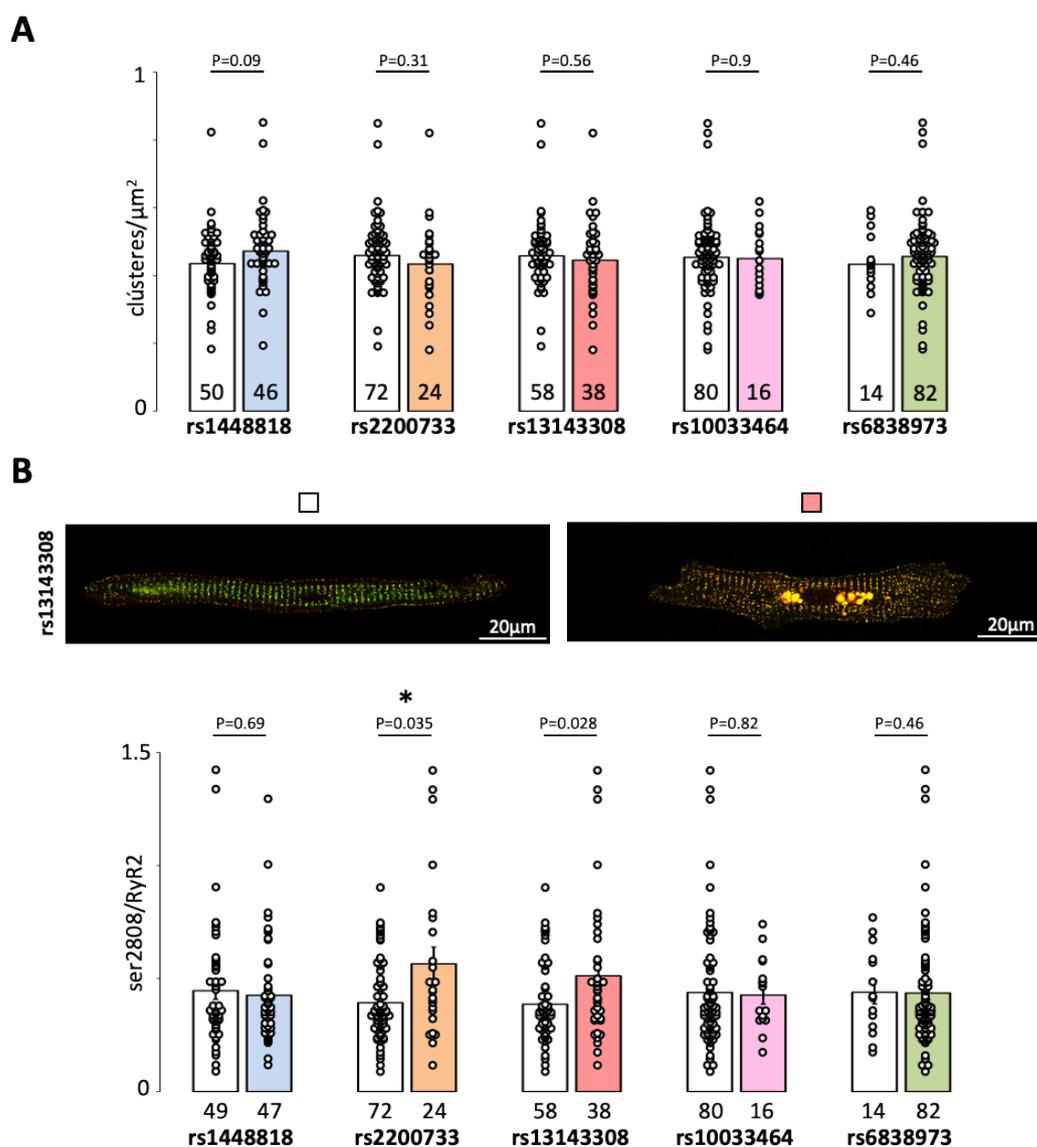


Figura 4. Efecto de las variantes de riesgo de 4q25 sobre la densidad y fosforilación del RyR2 en ser2808. **A)** Media de la densidad de clústeres de RyR2 en un plano central de miocitos auriculares de los pacientes que no presentan variante de riesgo (barras blancas) y los pacientes que presentan variante de riesgo (barras del color correspondiente a cada variante). **B)** En la parte superior se muestran imágenes superpuestas de clústeres de RyR2 totales (verde) y de RyR2 fosforilados en el residuo ser2808 (en rojo) de un paciente sin y otro con variante de riesgo en rs13143308. En la parte inferior tenemos la media de la fosforilación del RyR2 en ser2808 medida como la ratio de la intensidad de fluorescencia (ser2808/RyR2) para todos los clústeres de RyR2. Para la comparación de medias en cada variante se ha utilizado la prueba t de Student. Los p-valor se dan para la comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra en cada barra o debajo de cada barra. El * indica la variante que ha resultado tener un efecto significativo cuando se ha realizado el modelo de regresión lineal multivariado, siendo $*:<0.05$.

Por otro lado, al analizar la fosforilación del RyR2 en el residuo ser2814 no se apreciaron diferencias significativas en ninguna de las variantes de 4q25 entre los pacientes portadores de la variante de riesgo y los no portadores (**Figura 5**).

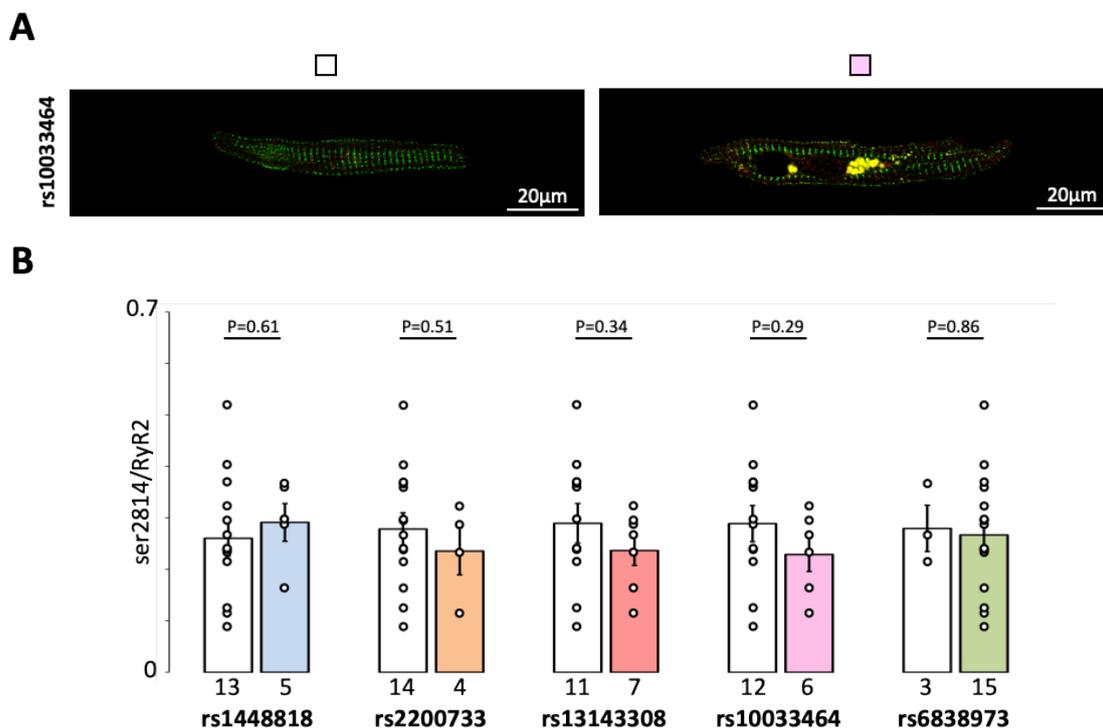


Figura 5. Efecto de las variantes de riesgo de 4q25 sobre la fosforilación del RyR2 en ser2814. A) Imágenes superpuestas de clústeres de RyR2 totales (verde) y de RyR2 fosforilados en el residuo ser2814 (en rojo) de un paciente sin y otro con variante de riesgo en rs10033464. **B)** Media de la fosforilación del RyR2 en ser2814, medida como la ratio de la intensidad de fluorescencia (ser2814/RyR2) para todos los clústeres de RyR2, en pacientes no portadores de variante de riesgo (barras blancas) y en pacientes portadores de la variante de riesgo (barras de color correspondiente a cada variante). Para la comparación de medias en cada variante se ha utilizado la prueba t de Student. Los p-valor se dan para la comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra en cada barra o debajo de cada barra.

Efecto de las variantes de riesgo en 4q25 sobre los niveles de ADO y actividad de adenosina desaminasa en plasma

Se ha demostrado previamente que los pacientes con FA presentan una mayor densidad de receptores A_{2A} que conlleva un aumento en la fosforilación de los RyR2 en ser2808 y un aumento de la liberación espontánea de calcio, desencadenando así corrientes I_{TI} y despolarizaciones espontáneas (5,113). Además, hemos demostrado recientemente que los pacientes con FA presentan un incremento de los niveles plasmáticos de ADO y una

reducción de la actividad de adenosina desaminasa (ADA) (178). Por ello, decidimos analizar los niveles de ADO y la actividad ADA en plasma de pacientes con y sin variantes de riesgo en 4q25. El análisis en los niveles de ADO en plasma (**Figura 6A**) no reveló diferencias pronunciadas en ninguna de las variantes de 4q25 entre los pacientes que presentaban variante de riesgo y los que no. Por el contrario, los pacientes con variante de riesgo en rs2200733 o en rs13143308 presentaron una disminución significativa en la actividad de ADA (**Figura 6B**).

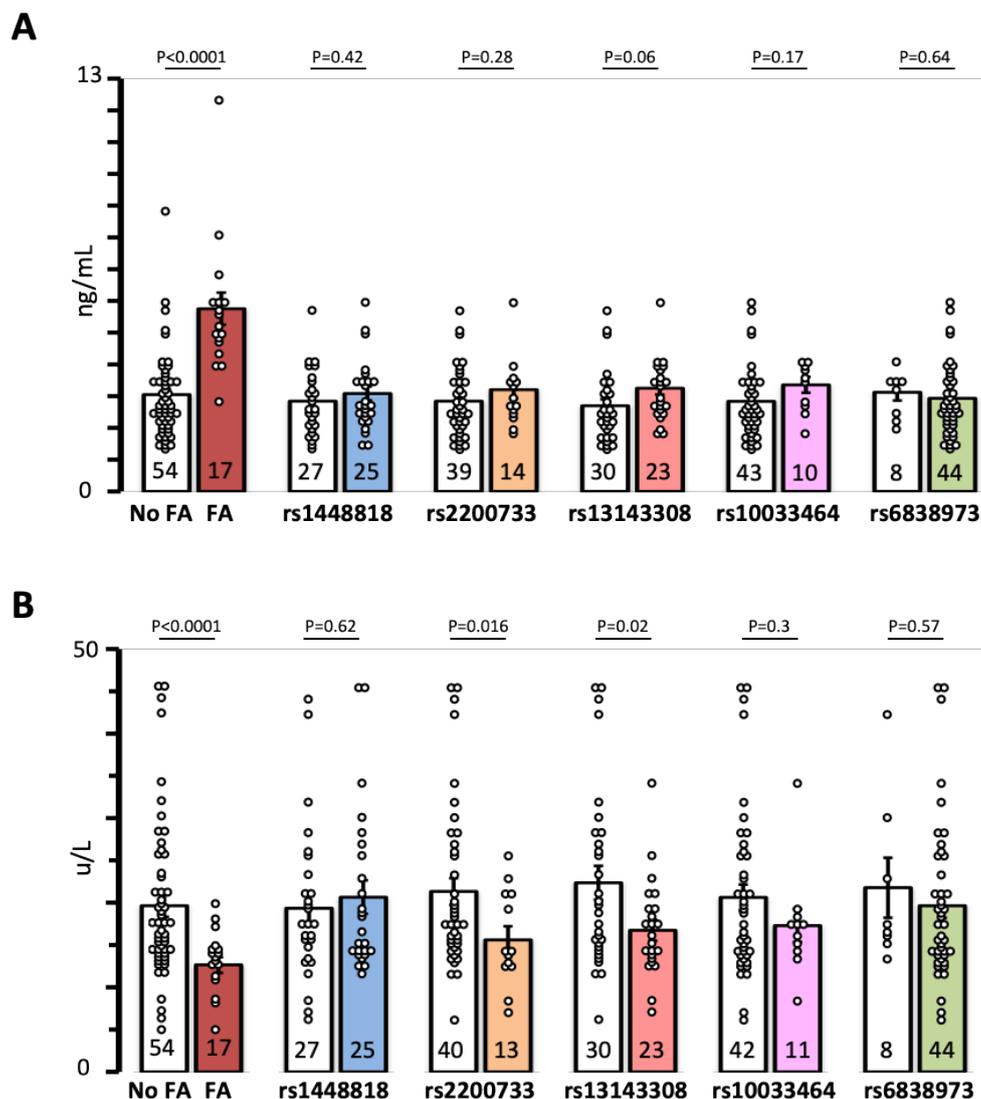


Figura 6. Efecto de las variantes de riesgo de 4q25 sobre los niveles de ADO y la actividad de ADA en plasma. **A)** Media de los niveles de ADO (ng/ml) en plasma para los pacientes sin y con FA, y para cada variante de riesgo de 4q25. **B)** Media de la actividad de ADA (u/l) medida en plasma para los pacientes sin y con FA, y para cada variante de riesgo de 4q25. Para la comparación de medias se ha utilizado la prueba t de Student. Los p-valor se dan para la comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra en cada barra.

Hallazgos principales

Este estudio es el primero en analizar con detalle toda la región de 4q25 con el objetivo de investigar el efecto específico de las diferentes variantes de riesgo de esta región sobre la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos y los mecanismos subyacentes. El análisis desarrollado durante todo el apartado de resultados, así como el modelo de regresión lineal sobre la frecuencia de I_{T1} , demostró que la presencia de las variantes de riesgo en rs2200733, rs13143308 y rs10033464 afectaban de forma significativa a la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos. Además, los pacientes que presentaban variante de riesgo en rs13143308 y en rs10033464 presentaban un incremento significativo en el contenido de calcio del RS. Por otro lado, los pacientes que presentaban la variante de riesgo en rs2200733 y rs13143308 mostraban un incremento en la fosforilación del RyR2 en su residuo de ser2808. Finalmente, al analizar los niveles de ADO y la actividad de ADA en plasma se pudo apreciar que no había diferencias significativas en los niveles de ADO, pero los pacientes que presentaban variante de riesgo en rs2200733 y en rs13143308 presentaban una reducción significativa de la actividad de ADA. La reducción de la actividad de ADA tiene como consecuencia una disminución de la degradación de ADO, pudiendo producir una mayor estimulación de los receptores A_{2A} que contribuya al incremento de la actividad eléctrica espontánea observada en los miocitos auriculares humanos de los portadores de estas variantes de riesgo.

III- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA VARIANTE rs13376333 de 1q21 Y SU INTERACCIÓN CON LAS VARIANTES 4q25

INTRODUCCIÓN

La regulación del calcio intracelular es muy importante en el desarrollo de disfunciones contráctiles y arritmias como la FA. El calcio que entra a la célula a través de los $Ca_v1.2$ es importante para el correcto funcionamiento de la contractibilidad cardíaca, pero también para activar varias vías de señalización en respuesta a cambios en el potencial de membrana. En los últimos años, el estudio de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (SK, K_{Ca2}) ha avanzado mucho ya que parecen tener un papel importante en la regulación de la excitabilidad cardíaca (179).

Se conocen 3 isoformas de canales SK (SK1-3), codificados por la familia de genes KCNN. La coexpresión de las diferentes isoformas de canales SK en un sistema de expresión heterólogo produce canales heteroméricos (180). Se han identificado las 3 isoformas en el corazón de humanos y ratones (150,151). Sin embargo, se ha visto que la expresión de canales SK en humano es mayor en células auriculares que en ventriculares, y que la expresión de SK2 y SK3 en aurícula es mayor que la de SK1 (152).

Los canales SK se activan por los cambios en la concentración intracelular de calcio que se producen durante el latido cardíaco por la vía de CaM. Cuando aumenta el calcio intracelular, la CaM se une al extremo C-terminal del canal SK, produciendo cambios conformacionales que activan el canal (181–183). Además, algunos estudios han demostrado que la unión de CaM al canal SK independiente de Ca^{2+} es necesaria para su expresión en la superficie celular (179).

Estudios anteriores en modelos murinos sugirieron que el calcio liberado mediante los RyR2 del RS era necesario para la activación de los canales SK (184,185). Por otro lado, un estudio reciente de Zhang et al. (182) estableció la relación entre los canales SK2 y los $Ca_v1.2$, así como entre los canales SK2 y RyR2 mediante imágenes de súper-resolución en miocitos ventriculares de conejo. Por tanto, esto sugiere que la entrada de calcio a través de los $Ca_v1.2$ así como el calcio liberado por los RyR2 del RS proporcionan un microdominio de calcio eficiente para la activación de los canales SK en los cardiomiocitos, y que ambos mecanismos son importantes.

Existen varios estudios que evidencian la importancia de los canales SK en la FA. Algunos de ellos han demostrado un incremento en la expresión de canales SK2 en un modelo de FA en conejo, que resultaba en un acortamiento de la duración del PA (153). Por otro lado, también se mostró en un modelo canino un incremento de la corriente SK más significativo en las venas pulmonares que en la aurícula izquierda, y que estaba regulada por la taquicardia auricular (186). Estos hallazgos podrían ser el resultado de la regulación de los canales SK por el calcio que entra a través de la membrana durante los protocolos de estimulación rápida (187). Sin embargo, también se ha demostrado una menor expresión de canales SK en pacientes con FA. Concretamente, la expresión de canales SK1, SK2 y SK3, así como la corriente sensible a apamina se ve reducida en pacientes con FA crónica (152,188). Sin embargo, aunque estos estudios demuestran un rol importante de los canales SK en la FA, el tiempo exacto en el que se pueden observar estos cambios en la expresión y función de los canales en los pacientes con FA sigue sin estar claro.

Ellinor et al. (149) identificaron mediante GWAS variantes localizadas en 1q21 asociadas a un mayor riesgo de padecer FA. Concretamente, algunas de ellas están localizadas en el intrón 1 del gen KCNN3, que codifica para el canal SK3. Así, viendo la importancia que pueden tener los canales SK en el desarrollo de arritmias, el objetivo de este estudio es determinar el efecto que tienen las variantes 1q21 asociadas a la FA sobre la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos.

RESULTADOS

Frecuencia de las variantes de riesgo de 1q21

Se genotiparon un total de 891 muestras de sangre para las variantes de riesgo localizadas en la región 1q21 del cromosoma 1: rs1051614, rs6666258 y rs13376333. Para facilitar la identificación de cada variante, así como la presencia de los alelos de riesgo, se ha utilizado un código de colores que se mantendrá durante todo el capítulo de resultados (**Figura 1**). El blanco corresponde con la presencia de 2 alelos de referencia, el color claro de cada variante se corresponde con la presencia de 1 alelo de riesgo, y el color oscuro indica que el paciente presenta 2 alelos de riesgo.

Se calcularon las frecuencias de homocigotos de referencia, heterocigotos y homocigotos de riesgo (**Figura 2A**). Como se puede apreciar a simple vista, las variantes rs6666258 y rs13376333 presentan exactamente la misma frecuencia, lo que indica que están ligadas genéticamente. Por otro lado, la variante rs1051614 no presenta exactamente la misma frecuencia, pero el test estadístico confirmó que también está ligada a las otras (prueba Chi-Cuadrado, $p < 0.0001$). Por esta razón, se decidió continuar con la variante rs13376333 para la presentación del resto de resultados. Así, en la **Figura 2B** se ha calculado la frecuencia y OR del alelo de riesgo en rs13376333 en pacientes sin FA y con FA, así como la frecuencia fenotípica y OR considerando que el alelo de riesgo fuese dominante o recesivo.

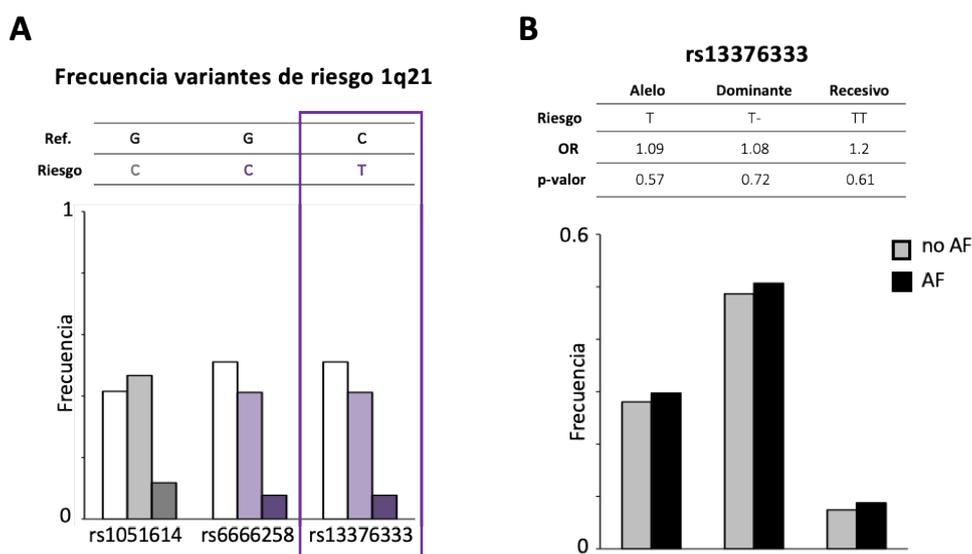


Figura 2. Frecuencias y OR de las variantes de riesgo localizadas en 1q21. A) Frecuencia de homocigotos de referencia (barras blancas), de heterocigotos (barras tonos claros) y homocigotos de riesgo (barras tonos oscuros) en las variantes de riesgo localizadas en 1q21. El recuadro lila indica la variante de riesgo con la que se va a seguir el estudio. En la parte superior se indican los alelos que se han considerado como referencia y riesgo. Se ha utilizado la prueba de Chi-Cuadrado para determinar si las variantes de riesgo están ligadas genéticamente. **B)** Frecuencias del alelo de riesgo de la variante rs13376333 en pacientes sin y con FA, y frecuencias fenotípicas en pacientes sin y con FA, considerando que el alelo de riesgo tiene un efecto dominante o recesivo. En la parte superior se indica el alelo o fenotipo que se ha considerado de riesgo, así como el OR calculado con la prueba exacta de Fisher y el p-valor.

El genotipado de los 891 pacientes no permitió asociar de forma significativa la variante rs13376333 de 1q21 a la FA. Sin embargo, las frecuencias del alelo de riesgo en nuestra población de estudio se asemejan a datos de estudios anteriores (135), en los que la variante rs13376333 sí que se asoció de forma significativa a la FA.

Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio

Las muestras de tejido auricular humano incluidas en este estudio para valorar el efecto de las variantes de 1q21 se obtuvieron de 26 pacientes sin FA sometidos a cirugía cardíaca en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Los datos clínicos y ecocardiográficos, así como los tratamientos farmacológicos de dichos pacientes están recogidos en la **Tabla 1**.

	rs13376333		
	No riesgo	Riesgo	p-valor
N	14	12	
Hombres	10 (71.4%)	8 (66.7%)	ns
Mujeres	4 (28.6%)	4 (33.3%)	ns
Índice DAI	2.29 [2.15;2.43]	2.05 [1.98;2.13]	ns
Edad	67.0 [64.0;70.0]	68.0 [64.0;72.0]	ns
Fumadores	2 (14.3%)	3 (25.0%)	ns
Ex fumadores	6 (42.9%)	1 (8.3%)	ns
Hipertensión	10 (71.4%)	6 (50.0%)	ns
Diabetes	4 (28.6%)	2 (16.7%)	ns
Dislipemia	7 (50.0%)	6 (50.0%)	ns
FEVI	48.0 [43.0;52.0]	53.0 [49.0;57.0]	ns
SVA	8 (57.1%)	7 (58.3%)	ns
CABG	9 (64.3%)	6 (50.0%)	ns
IECA	5 (35.7%)	7 (58.3%)	ns
β-Bloqueantes	8 (57.1%)	4 (33.3%)	ns
Antagonistas- Ca	3 (21.4%)	4 (33.3%)	ns
Aspirina	6 (42.9%)	7 (58.3%)	ns
Estatinas	9 (64.3%)	7 (58.3%)	ns

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes sin y con variante de riesgo en rs13376333 de 1q21. Los valores categóricos corresponden al número de pacientes y el % de pacientes se da entre paréntesis. Los valores continuos corresponden a la media \pm error estándar entre paréntesis. Abreviaciones: Índice DAI: índice diámetro aurícula izquierda; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; SVA: sustitución válvula aórtica; CABG: *coronary artery bypass graft* o derivación aortocoronaria con injerto; IECA: inhibidor de la enzima conversora de la angiotensina.

Para analizar si había diferencias en las características clínicas de los pacientes con y sin variante de riesgo en rs13376333 de la **Tabla 1** se utilizó la prueba exacta de Fisher para los datos categóricos, y la prueba t de Student para los datos continuos. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en las características clínicas de los pacientes portadores de la variante de riesgo y los no portadores.

Efecto de la variante rs13376333 de 1q21 sobre la corriente SK sensible a apamina

Debido a que el número de pacientes con 2 alelos de riesgo en rs13376333 es muy pequeño, se ha considerado que la variante de riesgo tiene un efecto dominante. Al analizar el efecto de la variante de riesgo en rs13376333 sobre la corriente SK sensible a apamina (**Figura 3A**) se pudo apreciar una tendencia a la reducción de la corriente SK en aquellos pacientes que presentaban la variante de riesgo (**Figura 3B**). Sin embargo, el análisis estadístico mediante ANOVA de medidas repetidas no mostró una interacción significativa entre el voltaje y la variante de riesgo ($p=0.09$). Además, pudimos apreciar que la corriente empezaba a aumentar de forma más significativa entre -20 y -10 mV, coincidiendo con el momento en el que la I_{Ca} está alcanzando su pico máximo. Debido a que los canales SK3 son canales activados por calcio en principio es lo que cabría esperar.

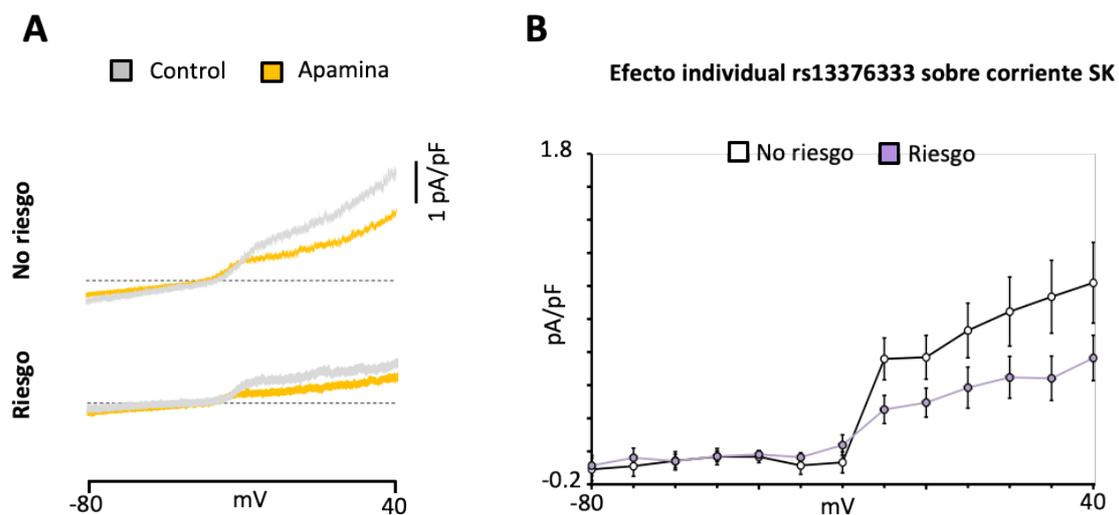


Figura 3. Efecto de la variante de riesgo rs13376333 de 1q21 sobre la corriente SK sensible a apamina. **A)** Registros representativos de las corrientes en control y después de la aplicación de apamina (100 nM), en pacientes sin (parte superior) y con (parte inferior) variante de riesgo en rs13376333. **B)** Media de la corriente SK sensible a apamina en pacientes sin ($n=12$) y con ($n=11$) variante de riesgo en rs13376333. Para analizar el efecto de la variante rs13376333 sobre la corriente SK sensible a apamina se ha utilizado la prueba ANOVA de medidas repetidas, que no ha demostrado una interacción significativa entre el voltaje y la variante de riesgo rs13376333 ($p=0.09$).

Distribución espacial de los canales SK3, los Cav1.2 y los RyR2

Con el objetivo de comprobar si la distribución espacial de los canales SK3 coincidía con los Cav1.2 o los RyR2 se realizó un marcaje inmunofluorescente de estos. Como se puede apreciar en las imágenes de la **Figura 4**, los canales SK3 no están colocados con los RyR2 (**Figura 4A**), pero sí con los Cav1.2 (**Figura 4B**). Así, las diferencias apreciadas en la corriente SK sensible a apamina entre pacientes con y sin variante de riesgo en rs13376333 podría ser debida a la activación de la corriente SK por el calcio que entra a través de los Cav1.2.

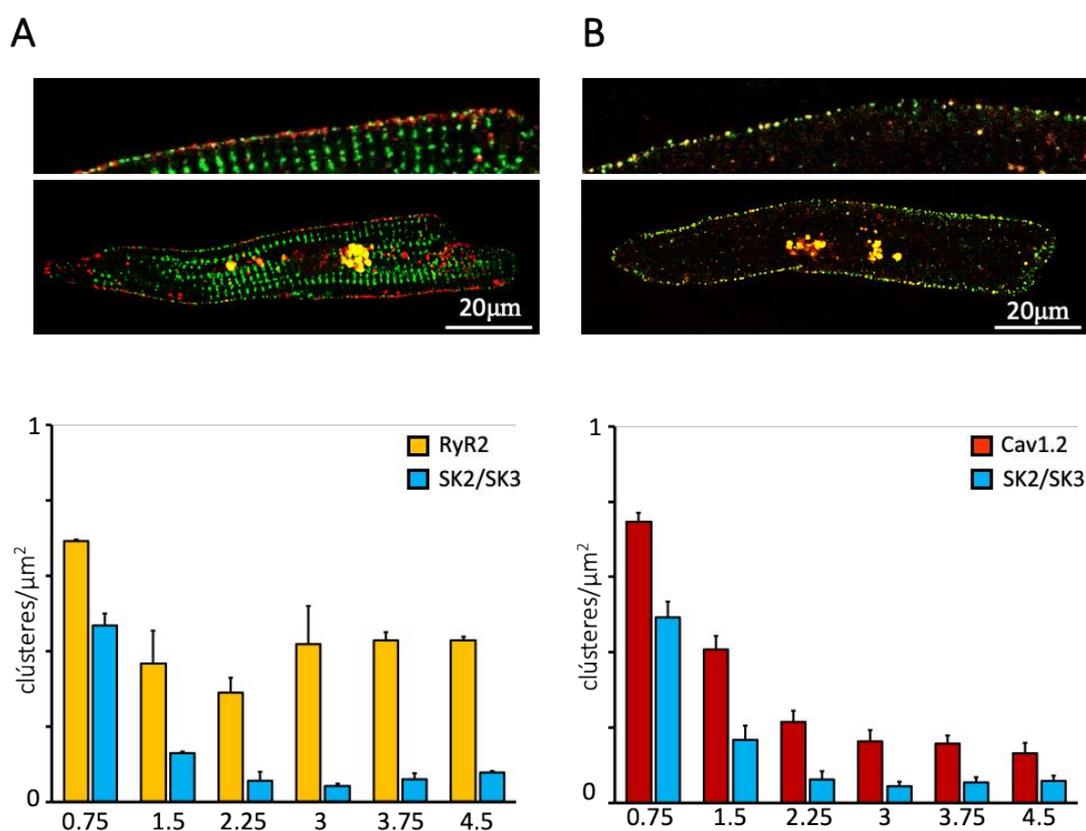


Figura 4. Distribución espacial de canales SK3, Cav1.2 y RyR2. **A)** En la parte superior se muestran imágenes en las que se puede ver la distribución espacial de los RyR2 (verde) y de los canales SK3 (rojo) en cardiomiocitos auriculares humanos. En la parte inferior se muestra la media de la densidad de los RyR2 y de los canales SK3 ($n=2$ células) a diferentes distancias de la membrana (indicado debajo de las barras en μm). **B)** En la parte superior se muestran imágenes con la distribución espacial de los Cav1.2 (verde) y de los canales SK3 (rojo) en cardiomiocitos auriculares humanos. El color amarillo indica que estos 2 canales coinciden espacialmente. En la parte inferior se muestra la media de la densidad de los Cav1.2 y de los canales SK3 ($n=8$ células) a diferentes distancias de la membrana (indicado debajo de las barras en μm).

Efecto de la FA sobre la corriente SK sensible a apamina

De acuerdo con la dependencia de la corriente SK sensible a apamina al calcio que entra a través de los $Ca_v1.2$, la reducción de la I_{Ca} observada en los pacientes con FA (**Figura 5A-B**) se asoció a una menor corriente SK sensible a apamina (**Figura 5C-D**). Así, la corriente SK sensible a apamina fue un 60% menor en pacientes que presentaban FA ($n=5$), que en aquellos sin FA ($n=24$), y la prueba ANOVA de medidas repetidas mostró que existía interacción entre el voltaje y el ritmo auricular ($p=0.02$). Además, también se observó que no había diferencias entre los pacientes sin FA y aquellos que presentaban FA paroxística, al igual que ocurre con la amplitud de I_{Ca} .

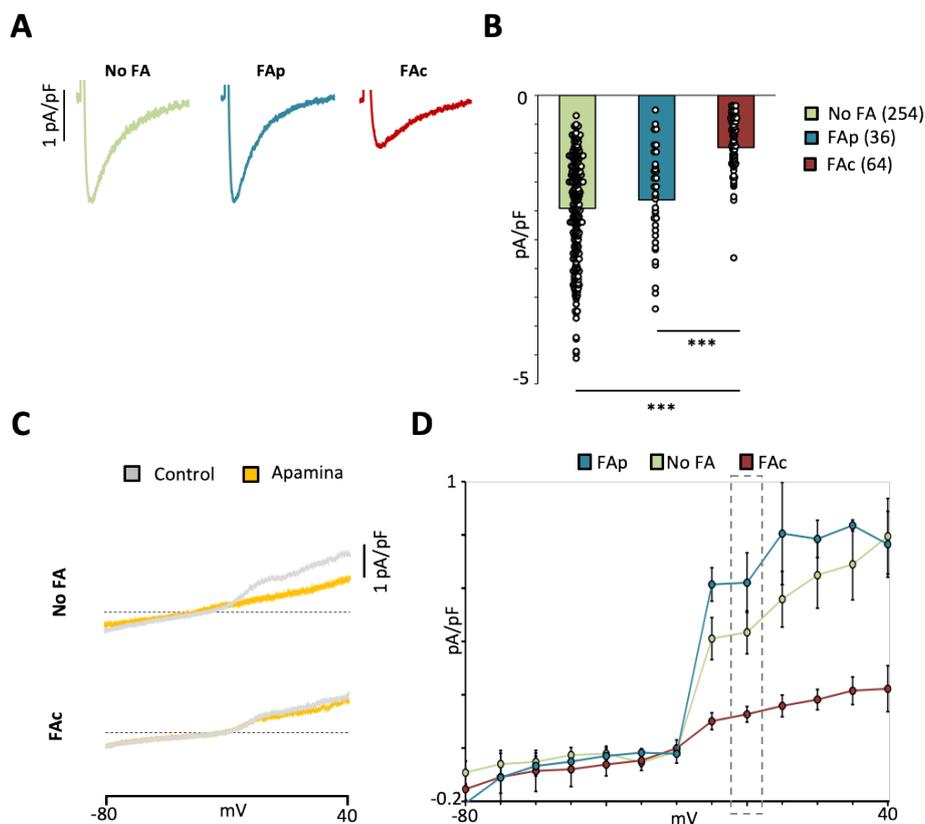


Figura 5. Efecto de la FA sobre I_{Ca} y sobre la corriente SK sensible a apamina. **A)** Registros representativos de I_{Ca} de un paciente sin FA (verde), un paciente con FA paroxística (azul) y un paciente con FA crónica (granate). **B)** Media de la amplitud de I_{Ca} para los pacientes sin FA, con FA paroxística (FAp) y con FA crónica (FAc). El número de pacientes está indicado entre paréntesis en la leyenda. Se ha utilizado la prueba ANOVA de 1 vía, y las diferencias significativas se muestran con *** ($p<0.001$). **C)** Registros representativos de las corrientes antes (control) y después de la aplicación de apamina (100 nM), en pacientes sin FA (parte superior) y con FAc (parte inferior). **D)** Media de la corriente SK sensible a apamina en pacientes sin FA ($n=24$), con FAp ($n=2$) y con FAc ($n=5$). Para analizar el efecto del ritmo sobre la corriente SK sensible a apamina se utilizó la prueba ANOVA de medidas repetidas, que mostró una interacción significativa entre el voltaje y el ritmo auricular ($p=0.02$).

Efecto de la variante rs1448818 de 4q25 sobre la corriente SK sensible a apamina

Como hemos visto en el [Capítulo I](#) de resultados, y tal como se puede apreciar en la **Figura 6A-B**, aquellos pacientes que tienen riesgo en la variante rs1448818 de 4q25 presentan una reducción significativa de I_{Ca} . Así, viendo la importancia que tiene la I_{Ca} sobre la corriente SK, se analizó el efecto de la variante rs1448818 sobre ella. El análisis reveló que los miocitos de los pacientes con la variante de riesgo en rs1448818 presentaban una corriente SK sensible a apamina menor que aquellos con la variante normal (**Figura 6C-D**), y la prueba ANOVA de medidas repetidas mostró una interacción significativa entre el voltaje y la variante de riesgo rs1448818 ($p < 0.001$).

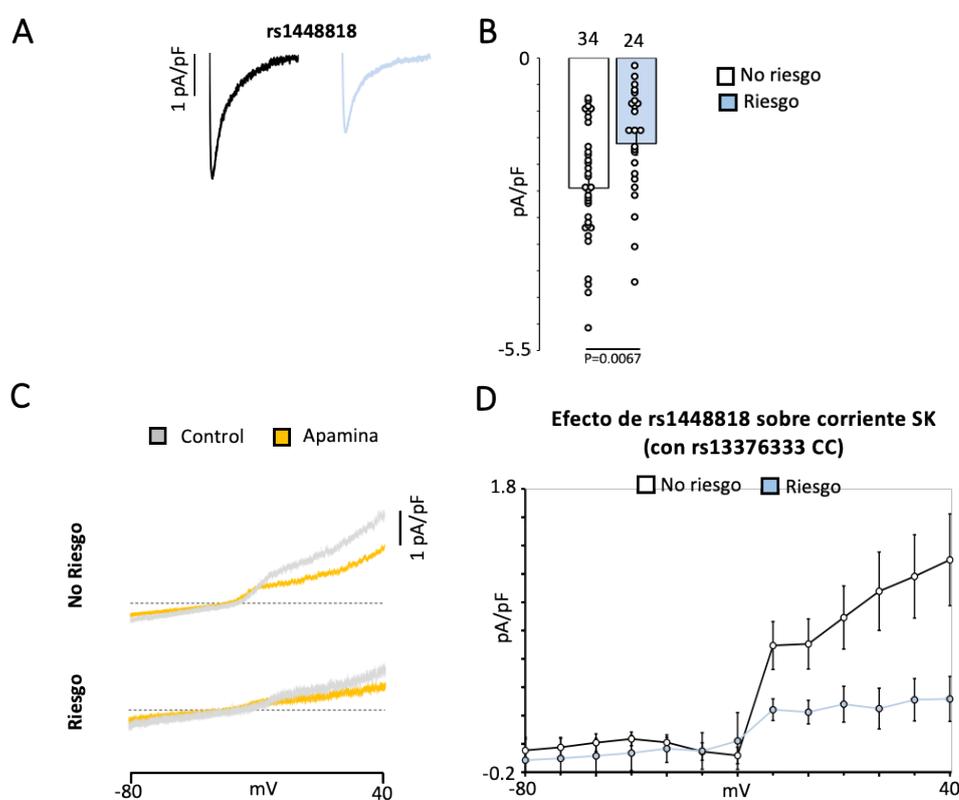


Figura 6. Efecto de la variante rs1448818 sobre la corriente SK sensible a apamina. **A)** Registros representativos de I_{Ca} en pacientes sin y con variante de riesgo en rs1448818. **B)** Media de I_{Ca} en pacientes sin y con variante de riesgo en rs1448818. Para la comparación entre medias se ha utilizado la prueba t de student. El p-valor se da para la comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra encima de cada barra. **C)** Registros representativos de las corrientes antes (control) y después de la aplicación de apamina (100 nM), en pacientes sin (parte superior) y con (parte inferior) variante de riesgo en rs1448818. **D)** Media de la corriente SK sensible a apamina en pacientes sin (n=8) y con (n=4) variante de riesgo en rs1448818. Para analizar el efecto de la variante de riesgo rs1448818 sobre la corriente SK sensible a apamina se utilizó la prueba ANOVA de medidas repetidas, que mostró una interacción significativa entre el voltaje y la variante rs1448818 ($p < 0.001$).

Efecto específico de la variante rs13376333 de 1q21 sobre la corriente SK

Después de ver el efecto de la variante rs1448818 sobre la corriente SK sensible a apamina, quisimos valorar el efecto específico de la variante de riesgo rs13376333 de 1q21 sobre la corriente SK sensible a apamina, incluyendo solamente aquellos pacientes que presentaban la variante normal en rs1448818, es decir aquellos con una I_{Ca} normal. Como se puede apreciar en la **Figura 7A-B**, la variante de riesgo rs13376333 produjo una reducción sobre la corriente SK sensible a apamina. Además, la prueba ANOVA de medidas repetidas mostró que, a diferencia de lo que ocurría en la **Figura 3**, en este caso sí que existía una interacción significativa entre el voltaje y la variante de riesgo rs13376333 ($p < 0.0001$).

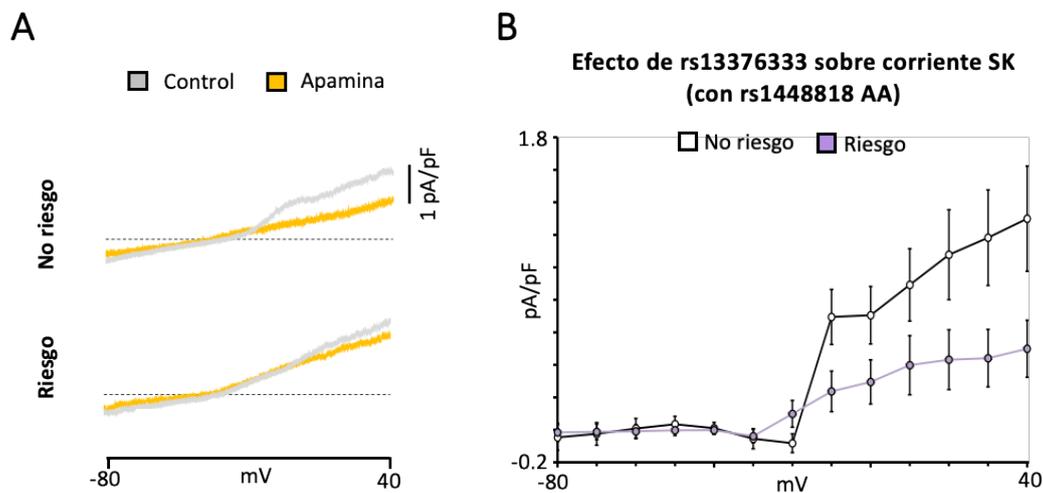


Figura 7. Efecto neto de la variante rs13376333 sobre la corriente SK sensible a apamina. A) Registros representativos de las corrientes antes (control) y después de la aplicación de apamina (100 nM), en pacientes sin (parte superior) y con (parte inferior) variante de riesgo en rs13376333. **B)** Media de la corriente SK sensible a apamina en pacientes sin ($n=8$) y con ($n=7$) variante de riesgo en rs13376333. Para analizar el efecto de la variante de riesgo rs13376333 sobre la corriente SK sensible a apamina se ha utilizado la prueba ANOVA de medidas repetidas, que mostró una interacción significativa entre el voltaje y la variante de riesgo ($p < 0.0001$).

Por otro lado, como la presencia en las variantes de riesgo en rs1448818 o en rs13376333 han mostrado una disminución en la corriente SK sensible a apamina, se podría pensar que la presencia conjunta de estas 2 variantes podría tener un efecto sumatorio y que esta reducción fuese aún mayor, y por tanto más crítica para el desarrollo de arritmias. Sin embargo, tal como se puede apreciar en la **Figura 8A-B** y como demostró la prueba ANOVA para medidas repetidas, no existe una interacción significativa ($p=1$).

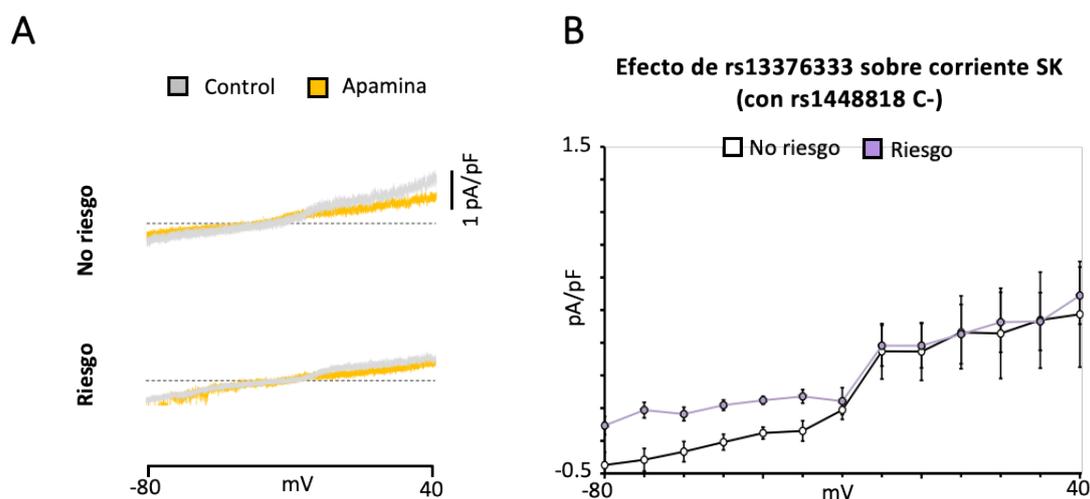


Figura 8. Efecto de la variante de riesgo rs13376333 sobre la corriente SK sensible a apamina en pacientes portadores de la variante de riesgo en rs1448818 de 4q25. **A)** Registros representativos de las corrientes antes (control) y después de la aplicación de apamina (100 nM), en pacientes sin (parte superior) y con (parte inferior) variante de riesgo en rs13376333. **B)** Media de la corriente SK sensible a apamina en pacientes sin (n=4) y con (n=4) variante de riesgo en rs13376333. Para analizar el efecto de la variante de riesgo rs13376333 sobre la corriente SK sensible a apamina en los pacientes con variante de riesgo en rs1448818 se ha utilizado la prueba ANOVA de medidas repetidas, que no ha mostrado una interacción significativa entre el voltaje y la variante de riesgo ($p=1$).

Efecto de la inhibición de los canales SK3 sobre las despolarizaciones espontáneas de la membrana

Los resultados obtenidos hasta ahora apuntan a que la variante de riesgo en rs13376333 hace que el canal SK3 pierda funcionalidad, y una disminución de la corriente SK3 podría potenciar las despolarizaciones espontáneas de la membrana. De acuerdo con ello, la **Figura 9A-B** muestra que la aplicación de apamina (100 nM) aumentó significativamente las despolarizaciones espontáneas de membrana en el rango de potencial de reposo normal (entre -85 y -75 mV) (prueba de Wilcoxon pareada, $p=0.03$). En cambio, aunque también se apreció una tendencia a incrementar la frecuencia de despolarizaciones en el rango de potencial de reposo despolarizado (entre -75 y -65mV), no fue significativo (prueba de Wilcoxon pareada, $p=0.056$). Además, no se apreció una diferencia significativa en la amplitud de las despolarizaciones espontáneas de membrana después de la aplicación de apamina (**Figura 9C**).

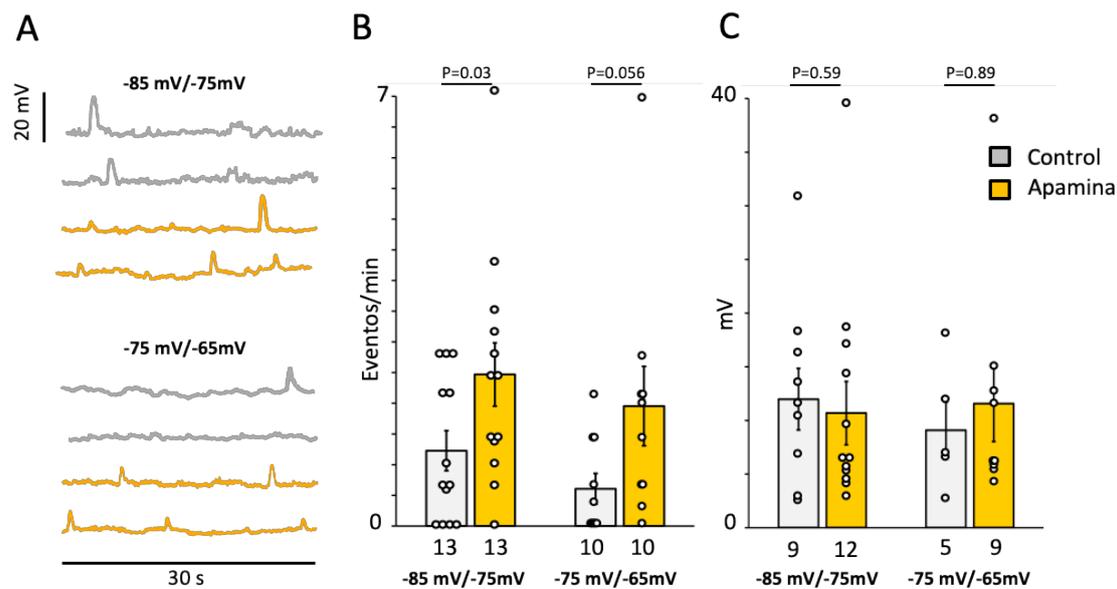


Figura 9. Efecto de la inhibición de los canales SK3 con apamina sobre las despolarizaciones espontáneas de la membrana. **A)** Registros representativos de las despolarizaciones espontáneas de la membrana antes (control) y después de la aplicación de apamina (100 nM). **B)** Media de la frecuencia de despolarizaciones espontáneas de la membrana en control y con apamina. El número de pacientes se muestra debajo de cada barra. **C)** Media de la amplitud de las despolarizaciones espontáneas de la membrana en control y con apamina. El número de pacientes se muestra debajo de cada barra. Para la comparación de medias en cada variante se ha utilizado la prueba de Wilcoxon. El p-valor se muestra para cada comparación entre barras.

Hallazgos principales

Este estudio ha demostrado que la disminución de la I_{Ca} observada en pacientes con FA crónica y en pacientes que presentan la variante de riesgo en rs1448818, además se traduce en una reducción de la corriente SK sensible a apamina. Por otro lado, al analizar el efecto de la variante de riesgo rs13376333 teniendo en cuenta sólo al grupo de pacientes que presenta una I_{Ca} normal, i.e. sin FA y sin variante de riesgo en rs1448818, se ha demostrado que la presencia de riesgo en rs13376333 también produce una reducción en la corriente SK sensible a apamina. Además, mediante la técnica de inmunofluorescencia se demostró que los canales $Ca_v1.2$ están colocalizados con los canales SK3 mientras la distancia entre los RyR2 y los canales SK3 era superior. Finalmente, la inhibición de los canales SK3 con apamina se traduce en un incremento en la incidencia de las despolarizaciones de membrana inducidas por la liberación espontánea de calcio, pero no en su amplitud.

IV- INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE LA HOMEOSTASIS INTRACELULAR DE CALCIO EN PACIENTES CON FIBRILACIÓN AURICULAR

INTRODUCCIÓN

Algunos estudios epidemiológicos de la FA han demostrado que, a diferencia de los hombres, las mujeres presentan una menor incidencia de esta arritmia y que su aparición se da 5 años más tarde que en los hombres (189–191). Sin embargo, debido al hecho de que la incidencia de AF aumenta exponencialmente a edades avanzadas y que la esperanza de vida de las mujeres es mayor, la edad de aparición en los 2 sexos converge a los 75 años (191,192). Aún así, el mecanismo por el cual la incidencia de FA aumenta de forma más significativa en las mujeres mayores de 70 años sigue sin estar claro. Dado que tanto la FA como el sexo se han asociado a ciertas alteraciones electrofisiológicas celulares bien definidas (3,193), es concebible que alguna de ellas contribuya a las diferencias relacionadas con el sexo en la incidencia de FA.

La FA se ha asociado a numerosas alteraciones estructurales (194) y electrofisiológicas (3,195). En estudios que incluían una población mixta de pacientes de sexo masculino y femenino, la FA se ha relacionado con alteraciones en la homeostasis intracelular de calcio (4,5,165,196), incluyendo el mal funcionamiento del RS (4–7,175,196). Estos estudios han demostrado que los miocitos auriculares de pacientes con FA presentan una reducción de la I_{CaL} (164–166), que acorta el PA, y por tanto reduce la duración del periodo refractario. Además, estos miocitos presentan una elevada incidencia de liberaciones espontáneas de calcio (4), que pueden inducir despolarizaciones espontáneas de la membrana arritmogénicas (175).

Por ello, este estudio tiene como objetivo determinar la influencia específica del sexo sobre la homeostasis intracelular del calcio en un número importante de pacientes con y sin FA.

RESULTADOS

Diferencias en las características clínicas entre pacientes de sexo femenino y masculino

La reducción de la densidad de la I_{Ca} (164–166) y el incremento en la frecuencia de corrientes I_{Tl} (4,5,175) son características electrofisiológicas celulares de los miocitos auriculares de pacientes con FA que pueden estar influenciadas por el sexo. Por ello, para llevar a cabo el estudio electrofisiológico los pacientes se dividieron en hombres (n=189) y mujeres (n=78).

	Mujeres	Mujeres, FA	Hombres	Hombres, FA	p-valor
N	65	13	172	17	
Índex DAI*	2.30 [2.01;2.58]	2.96 [2.40;3.47]	2.19 [1.90;2.48]	2.56 [2.30;2.93]	<0.001
Edad*	74.0 [66.0;78.0]	75.0 [72.0;76.0]	67.5 [57.0;74.0]	71.0 [63.0;78.0]	0.001
Tabaco*	7 (10.9%)	1(8.3%)	123(71.5%)	9(56.2%)	<0.001
Alcohol	0(0%)	0(0%)	19(11.2%)	1(6.25%)	0.035
Hipertensión*	44 (67.7%)	8 (61.5%)	97 (56.7%)	11 (64.7%)	0.469
Diabetes*	18 (27.7%)	4 (30.8%)	53 (31.0%)	4 (23.5%)	0.925
Dislipemia	41 (63.1%)	6 (46.2%)	86 (50.6%)	9 (52.9%)	0.353
FEVI*	60.0 [55.0;68.0]	63.0 [55.0;72.8]	60.0 [47.2;65.0]	56.0 [44.0;66.0]	0.136
SVA*	39 (60.0%)	9 (69.2%)	78 (45.3%)	12 (70.6%)	0.035
SVM/RVM	5 (7.69%)	1 (7.69%)	3 (1.74%)	1 (5.88%)	0.059
CABG*	30 (46.2%)	4 (30.8%)	119 (69.2%)	9 (56.2%)	0.001
IECA*	15 (23.1%)	6 (46.2%)	58 (33.7%)	9 (52.9%)	0.067
β-Bloqueantes*	19 (29.2%)	6 (46.2%)	70 (40.7%)	8 (47.1%)	0.314
ARA-II*	16 (24.6%)	3 (23.1%)	24 (14.0%)	2 (11.8%)	0.196
Ca-antagonistas*	9 (13.8%)	1 (7.69%)	31 (18.0%)	2 (11.8%)	0.776
Dicumarinas*	2 (3.08%)	7 (53.8%)	4 (2.34%)	13 (76.5%)	<0.001
Aspirina	29 (44.6%)	3 (23.1%)	93 (54.4%)	2 (11.8%)	0.002
Estatinas	41 (63.1%)	6 (46.2%)	96 (56.1%)	9 (52.9%)	0.622

Tabla 1. Características clínicas de la población de estudio para el análisis electrofisiológico. Los valores categóricos corresponden al número de pacientes y el % de pacientes se da entre paréntesis. Los valores continuos corresponden a la mediana, con los cuantiles del 25 y 75% entre paréntesis. Abreviaciones: Índice DAI: índice diámetro aurícula izquierda; FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; SVA: sustitución válvula aórtica; SVM/RVM: sustitución o reparación válvula mitral; CABG: *coronary artery bypass graft* o derivación aortocoronaria con injerto; IECA: inhibidor de la enzima convertora de la angiotensina; ARA-II: antagonistas de los receptores de angiotensina II. La significación estadística de las diferencias entre los 4 grupos de pacientes se da a la derecha de cada factor. * indica los factores de confusión incluidos en el análisis de regresión lineal en las figuras 2 y 4.

Los datos clínicos y ecocardiográficos clave, así como los tratamientos farmacológicos están incluidos en la **Tabla 1**. Así, primero se determinó si existían diferencias dependientes de sexo en los factores de riesgo cardiovascular, en las enfermedades cardiovasculares concurrentes, en los datos ecocardiográficos, en los tratamientos farmacológicos o en el ritmo auricular.

La **Tabla 1** muestra que las pacientes de sexo femenino eran mayores, fumaban menos y no abusaban del alcohol. No hubo diferencias significativas entre sexos en lo que respecta a los tratamientos farmacológicos comunes. Sin embargo, se vio que en las mujeres se realizaba significativamente un menor número de cirugías de revascularización miocárdica, también conocida como derivación aortocoronaria con injerto (CABG, *coronary artery bypass graft*).

Para excluir los potenciales factores de confusión de estas diferencias dependientes de sexo, o las diferencias en el efecto de los factores clínicos sobre la homeostasis del calcio, se realizó un análisis de regresión multivariante para determinar los efectos específicos del sexo y la FA sobre las mediciones electrofisiológicas.

Efecto del sexo sobre la I_{Ca} y los I_{Tl}

De acuerdo con resultados obtenidos anteriormente, si comparamos la amplitud de la I_{Ca} de pacientes con FA permanente con la de pacientes sin FA podemos ver que es significativamente inferior (-1.20 ± 0.21 vs. -2.03 ± 0.10 pA/pF, $p < 0.001$, prueba t de Student no pareada) en aquellos con FA. Sin embargo, el análisis de regresión multivariado teniendo en cuenta los factores de confusión mostró que no existen interacciones significativas entre

la FA, el sexo o la FA y el sexo con la densidad de la I_{Ca} . Aún así, se vio una reducción significativa en la densidad de I_{Ca} en hombres con FA permanente, a diferencia de lo que se observó en mujeres con FA (**Figura 1A-B**).

Cuando se analizaron las propiedades intrínsecas de la I_{Ca} , se demostró que ni el sexo ni la FA afectaban a la forma de la curva I-V en este grupo de pacientes (**Figura 1C**). Por el contrario, la constante de desaparición de la I_{Ca} se vio reducida significativamente en los hombres que presentaban FA (**Figura 1D**).

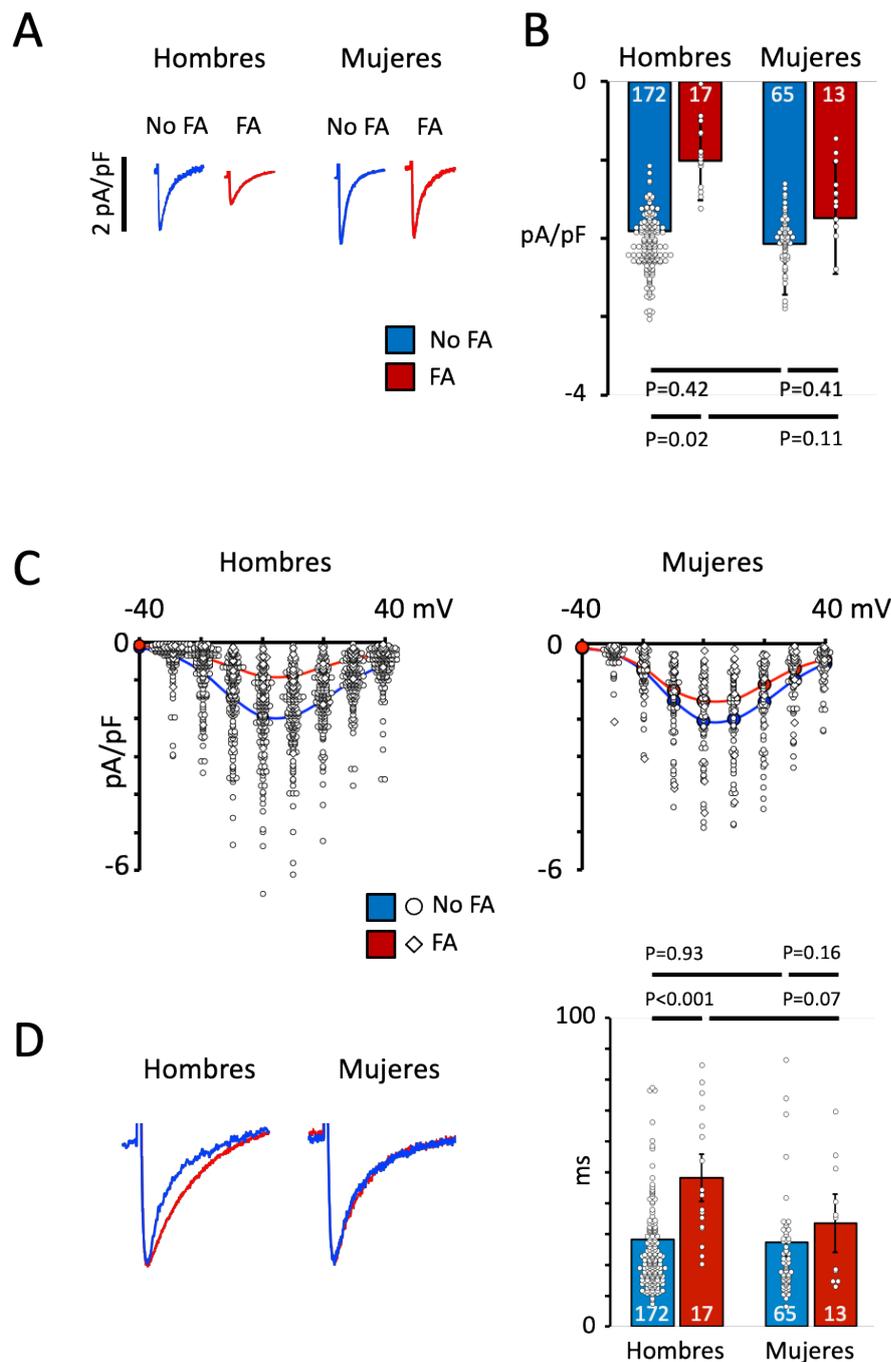


Figura 1. Efecto del sexo sobre la amplitud y propiedades de la I_{Ca} . **A)** Registros de I_{Ca} representativos de cada uno de los 4 grupos: hombres (registros de la izquierda) y mujeres (registros de la derecha), sin FA (registros azules) y con FA (registros rojos). **B)** Media de la densidad de I_{Ca} para cada uno de los 4 grupos. **C)** Curvas I-V para hombres y mujeres, con y sin FA. **D)** A la izquierda, se muestran registros superpuestos de la constante de desaparición de la I_{Ca} y a la derecha las medias de la constante de inactivación rápida (τ -1) de la I_{Ca} para cada grupo. Los valores están analizados y corregidos para los factores de confusión clínicos marcados en la **Tabla 1** utilizando un modelo de regresión lineal. El p-valor se da para cada comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra en cada barra.

Para descartar que la diferencia apreciada en la amplitud de la I_{Ca} fuese debida a una diferencia en la expresión de los $Ca_v1.2$, estos se marcaron mediante la técnica de inmunofluorescencia. El análisis del marcaje inmunofluorescente reveló que la densidad de $Ca_v1.2$ era superior en la membrana que en el centro de la célula, pero evidenció que la diferencia en la amplitud de la I_{Ca} no se debía a una diferencia en la densidad de los $Ca_v1.2$ entre los pacientes con y sin FA (**Figura 2**).

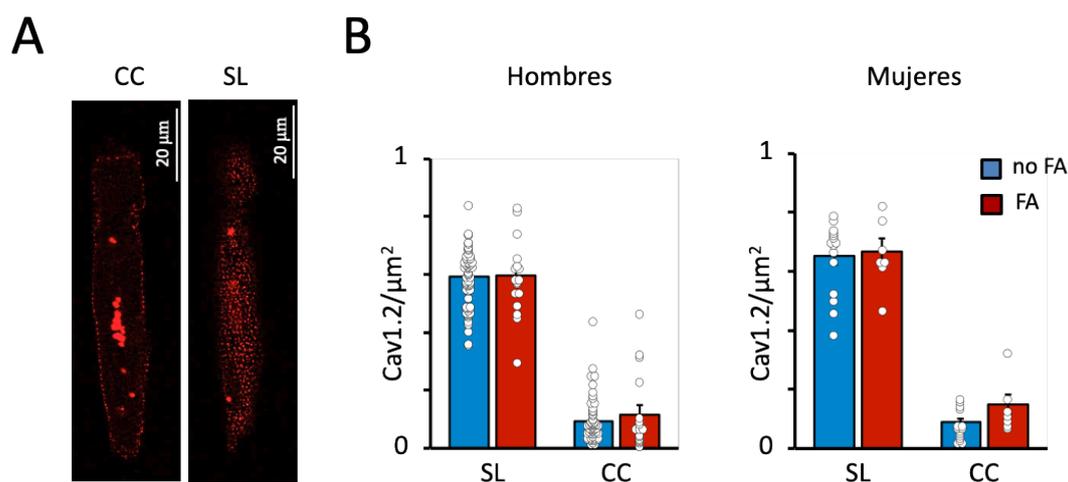


Figura 2. La densidad de $Ca_v1.2$ es 5 veces superior en el sarcolema que en el centro de la célula, pero no se ve modificada por el sexo y la FA. **A)** Imágenes del centro de la célula (CC) y del sarcolema (SL) de miocitos auriculares aislados que presentan los $Ca_v1.2$ marcados mediante la técnica de inmunofluorescencia. **B)** Densidad de $Ca_v1.2$ en 74 miocitos auriculares de 21 pacientes masculinos (izquierda) y 22 miocitos auriculares de 7 pacientes femeninas (derecha) sin FA (barras azules) y con FA (barras rojas). La densidad de $Ca_v1.2$ del sarcolema se midió a menos de $0.75 \mu\text{m}$ de la membrana, mientras que la densidad del centro de la célula se midió entre 1.5 y $4.5 \mu\text{m}$ de la membrana. La densidad en el CC fue significativamente inferior ($p < 0.001$) que en el SL, tanto en hombres como en mujeres con y sin FA (modelo de regresión lineal no ajustado).

El análisis multivariado de la frecuencia de I_{TI} reveló una interacción significativa entre el sexo y la frecuencia de I_{TI} ($p < 0.0001$) y entre el sexo, la FA y la frecuencia de I_{TI} ($p = 0.032$). La frecuencia de I_{TI} fue significativamente superior en mujeres que en hombres ($p < 0.001$). Además, la frecuencia de I_{TI} fue menor e idéntica en hombres con y sin FA, mientras que en mujeres la frecuencia fue superior en aquellas que presentan FA respecto a las que no presentaban la arritmia (**Figura 3A-B**). Cuando se analizaron las propiedades de los I_{TI} , se evidenció que la amplitud también se veía selectivamente incrementada en mujeres con FA permanente (**Figura 3C**). Además, la **Figura 3D** nos muestra que el incremento en la incidencia de I_{TI} es concurrente con una mayor incidencia de despolarizaciones espontáneas de la membrana en mujeres con FA.

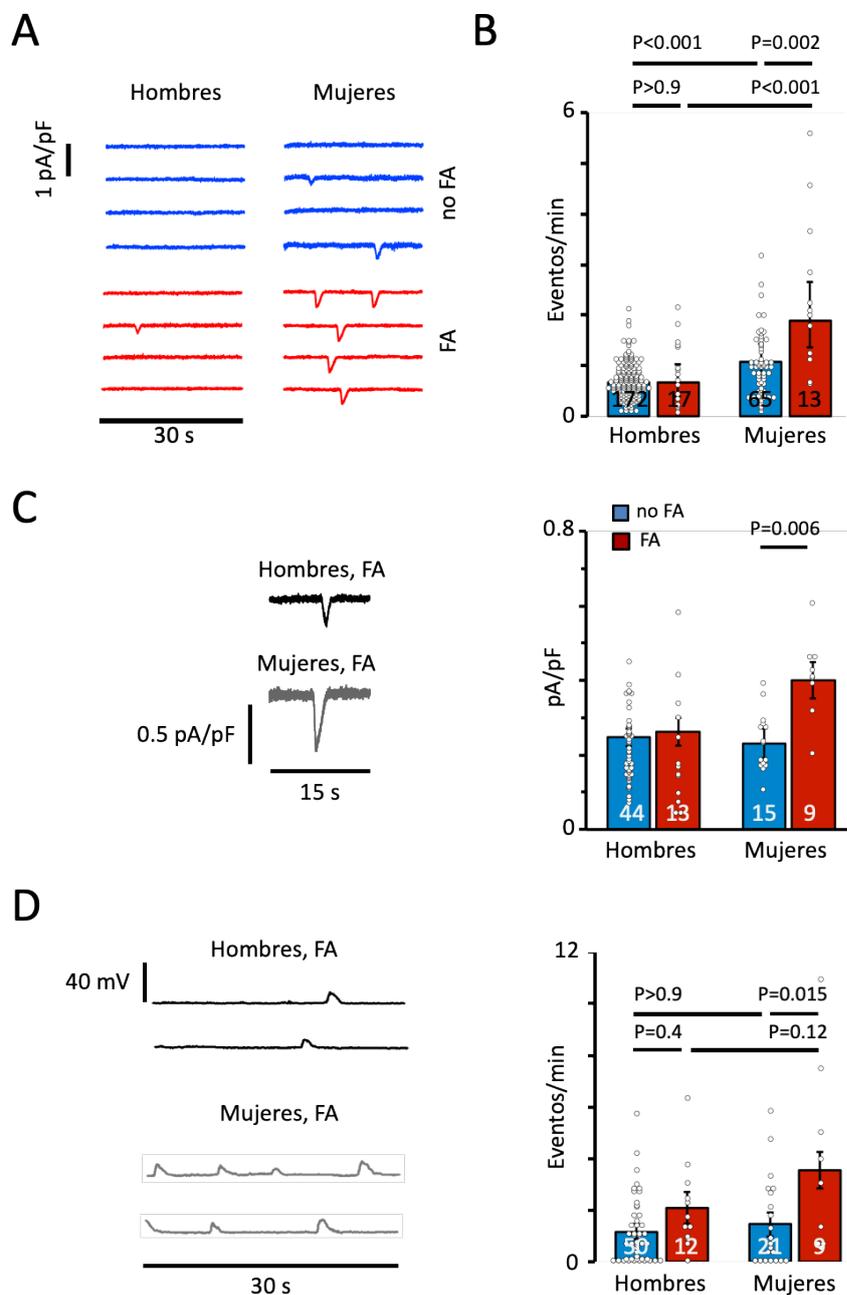


Figura 3. Efecto del sexo sobre la frecuencia y propiedades de I_{T1} y sobre las despolarizaciones espontáneas de la membrana. **A)** Registros representativos de corrientes I_{T1} de los mismos pacientes que en la Figura 1, divididos en hombres (registros de la izquierda) y mujeres (registros de la derecha), sin FA (registros azules) y con FA (registros rojos). **B)** Media de la frecuencia de I_{T1} para cada grupo. Los valores están corregidos teniendo en cuenta los factores de confusión clínicos indicados en la Tabla 1 utilizando un modelo de regresión lineal. **C)** Registros representativos de la amplitud de I_{T1} en hombres (registro negro) y mujeres (registro gris) con FA. La media de las amplitudes se muestra a la derecha. **D)** Registros de despolarizaciones espontáneas de la membrana de hombres (registros negros) y mujeres (registros grises) con FA. La media de la frecuencia de despolarizaciones espontáneas de membrana se muestra a la derecha. Los p-valor se dan para la comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra en cada barra.

Debido a que la FA paroxística y la FA permanente se han asociado a diferentes alteraciones en la homeostasis del calcio (196) se compararon sus efectos. Como se muestra en la **Figura 4**, las mujeres con FA paroxística y con FA permanente presentan un incremento similar en la frecuencia de I_{T1} . Sin embargo, la amplitud de I_{Ca} se vio reducida en hombres con FA permanente, pero no en hombres con FA paroxística.

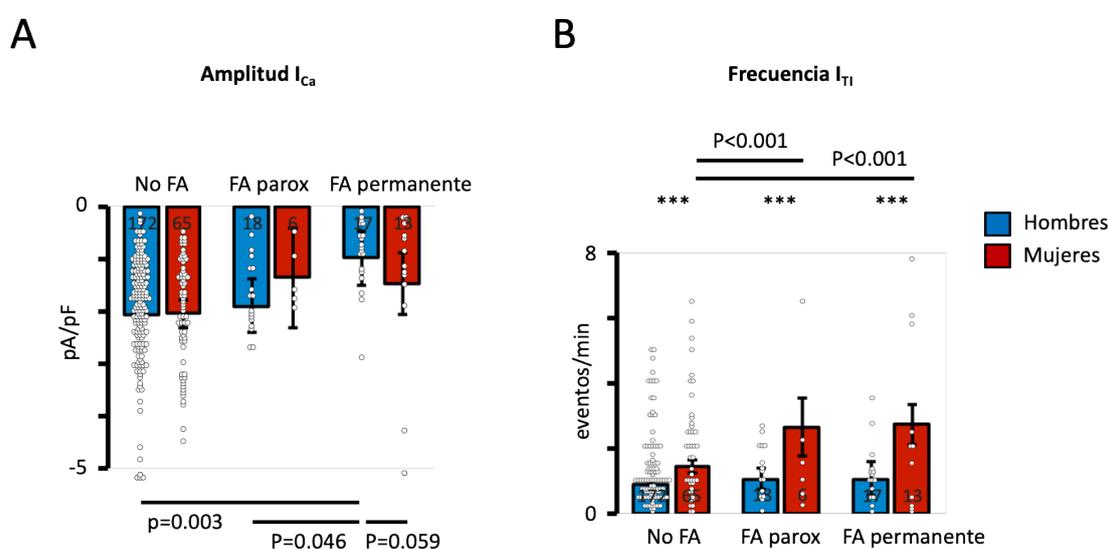


Figura 4. Comparación de la amplitud de I_{Ca} y frecuencia de I_{T1} entre pacientes con FA paroxística y pacientes con FA permanente. **A)** Estimación de la amplitud de I_{Ca} en miocitos de pacientes sin FA (No FA), con FA paroxística (FA parox) o FA permanente. **B)** Estimación de la frecuencia de I_{T1} en miocitos de los mismos pacientes. Los valores están corregidos teniendo en cuenta los factores de confusión clínicos indicados en la **Tabla 1** utilizando un modelo de regresión lineal. Los p-valor se dan para la comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra en cada barra.

Efecto del sexo sobre las liberaciones espontáneas de calcio del RS

Para determinar si el incremento de la frecuencia de I_{T1} y de despolarizaciones espontáneas de membrana se debía a diferencias específicas de sexo en la susceptibilidad del RS para liberar calcio de forma espontánea, se analizaron la frecuencia y propiedades de los *calcium sparks* en miocitos auriculares de un grupo de pacientes. El análisis reveló una interacción entre la FA y la densidad de sparks ($p < 0.001$) así como una interacción entre la FA, el sexo y la densidad de *sparks* ($p = 0.0037$). En línea con la interacción diferencial encontrada entre el sexo, la FA y la frecuencia y propiedades de los *sparks*; la densidad de focos de *sparks* (**Figura 5A-B**), los *sparks* por foco (**Figura 5C**), el FDHM (**Figura 5D**) y el FWHM (**Figura 5E**) se vieron significativamente aumentadas en mujeres con FA respecto a las que no tenían FA. En cambio, no se observaron diferencias en estas propiedades entre hombres sin y con FA. En cuanto a la amplitud de los *sparks* se observó una tendencia, aunque no significativa, a ser mayor en mujeres sin FA que en mujeres con FA (**Figura 5F**).

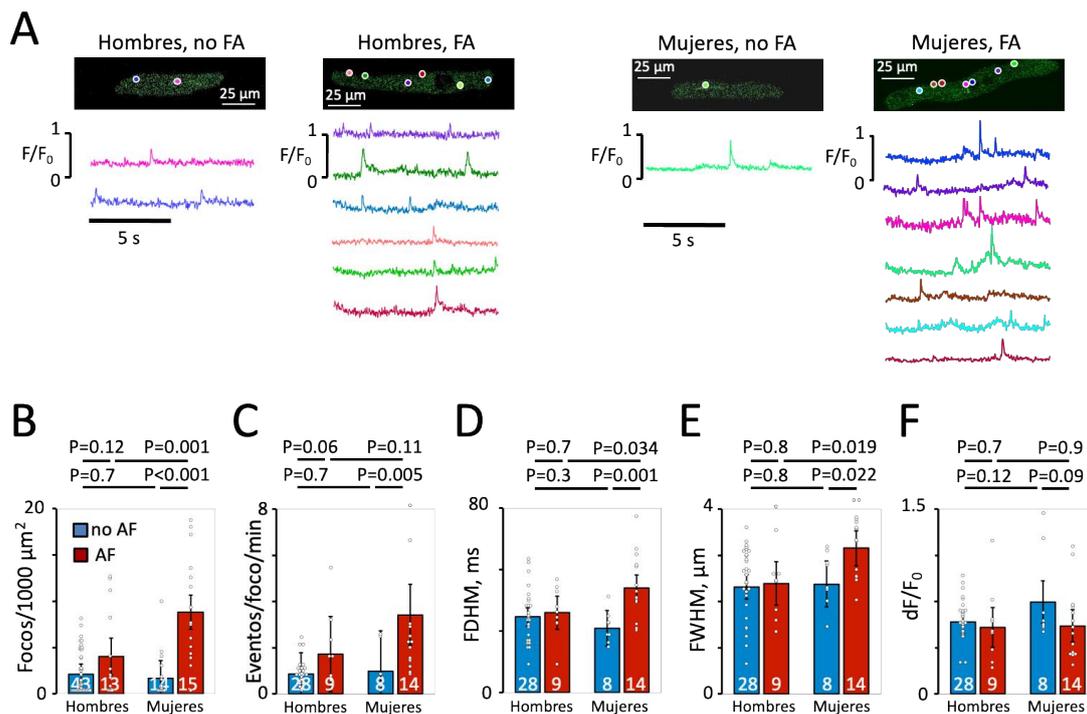


Figura 5. Efecto del sexo sobre la frecuencia y propiedades de los *calcium sparks*. **A)** Imágenes de miocitos auriculares humanos de pacientes sin (no FA) y con FA permanente. La localización de los focos donde se produjeron los *calcium sparks* está indicado con círculos y la señal de cada foco se muestra justo debajo, del mismo color que su círculo correspondiente. **B)** Densidad de focos de *spark*. **C)** *Sparks*/foco **D)** FDHM. **E)** FWHM. **F)** Amplitud de los *sparks*. Los valores están ajustados y el análisis estadístico se ha determinado utilizando un modelo de regresión lineal sin ajustar. El p-valor se muestra para cada comparación entre barras. El número de pacientes se muestra en cada barra.

Efecto del sexo sobre la regulación de la recaptación y contenido de calcio del RS

La **Figura 6A-B** muestra que el contenido de calcio del RS liberado por cafeína, que regula la liberación espontánea de calcio del RS, no se vio afectado por el sexo y el ritmo auricular y que el sexo no tuvo efecto sobre el contenido de calcio del RS en pacientes con o sin FA permanente.

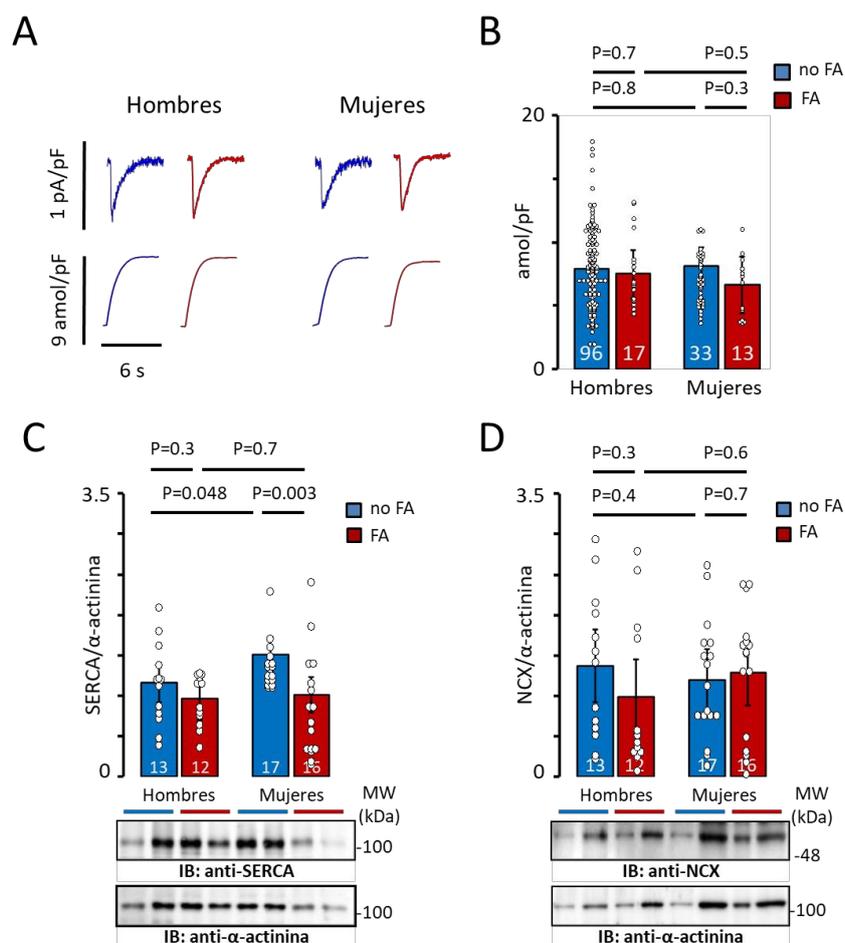


Figura 6. Efecto del sexo sobre la regulación de la recaptación y el contenido de calcio del RS. A) Registros representativos de la corriente NCX inducida por cafeína (10 mM) en la parte superior, y en la inferior su integral de tiempo para hombres y mujeres sin FA (en azul) y con FA permanente (en rojo). **B)** Contenido de calcio del RS estimado a partir de la integral de tiempo de la corriente inducida por cafeína. Los valores están corregidos para los factores de confusión clínicos marcados en la **Tabla 1**, y se ha utilizado un modelo de regresión lineal. **C)** Expresión de la proteína SERCA. **D)** Expresión de la proteína NCX. En los paneles **C-D**, se muestra la cuantificación mediante densitometría de los niveles de proteína (parte superior), y los *westerns blot* representativos (parte inferior). Los niveles de proteína están normalizados a α -actinina. Los valores están ajustados y la significancia estadística se ha determinado utilizando un modelo de regresión lineal sin ajustar. El p-valor se muestra para cada comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra en cada barra.

El análisis de la expresión de SERCA2a y NCX-1, que regulan el nivel de calcio citosólico, mostró que la expresión de SERCA2a fue significativamente superior en mujeres sin FA que en las que tenían FA permanente (**Figura 6C**). La expresión de NCX-1, en cambio, no fue significativamente diferente entre pacientes con y sin FA, y el sexo no afectó a la expresión de cada grupo (**Figura 6D**).

Por otro lado, el análisis de la expresión y fosforilación de PLB, que regula la actividad de SERCA2a, mostró que los niveles de PLB eran significativamente superiores en hombres sin FA que con FA permanente. Esta misma diferencia también se mostró en la fosforilación de PLB-T17, mientras las diferencias en la fosforilación de PLB-S16 no fueron significativas (**Figura 7**).

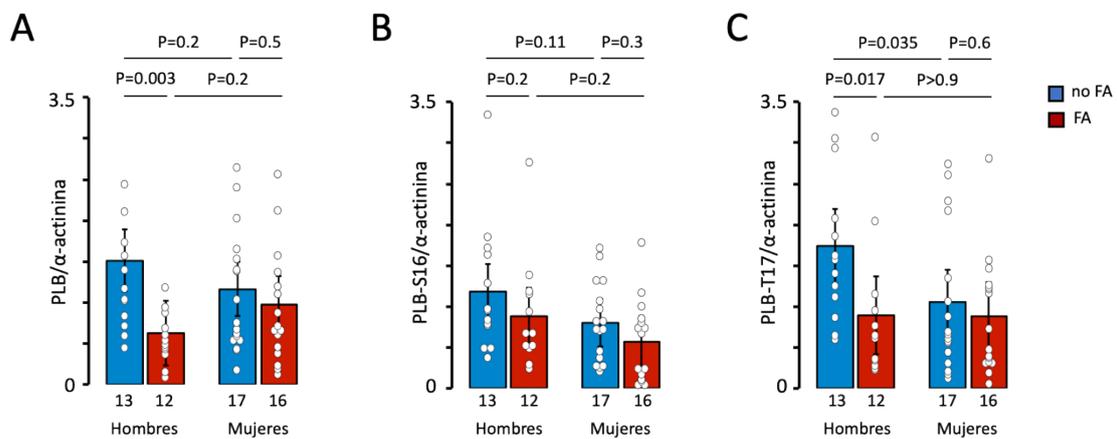


Figura 7. Efecto del sexo sobre la fosforilación y expresión de fosfolamban. **A)** Expresión de fosfolamban (PLB), normalizado a α -actinina. **B)** Niveles de PLB fosforilado en serina-16 (PLB-S16), normalizado a α -actinina. **C)** Niveles de PLB fosforilado en treonina-17 (PLB-T17), normalizado a α -actinina. El p-valor se muestra para cada comparación entre barras, y se ha obtenido utilizando un modelo de regresión lineal no ajustado. El número de pacientes se muestra debajo de cada barra.

Curiosamente, la expresión de CSQ-2, proteína que modula la actividad del RyR2, se vio reducida de forma significativa tanto en hombres como en mujeres con FA (**Figura 8A-B**). Además, el análisis de CSQ-2 mediante la técnica de inmunofluorescencia mostró que la densidad de CSQ-2 fue superior en la membrana, tanto en miocitos auriculares de hombres como de mujeres (**Figura 8C-D**) y que había una interacción significativa entre la FA y la ratio CSQ-2/RyR2 ($p < 0.001$).

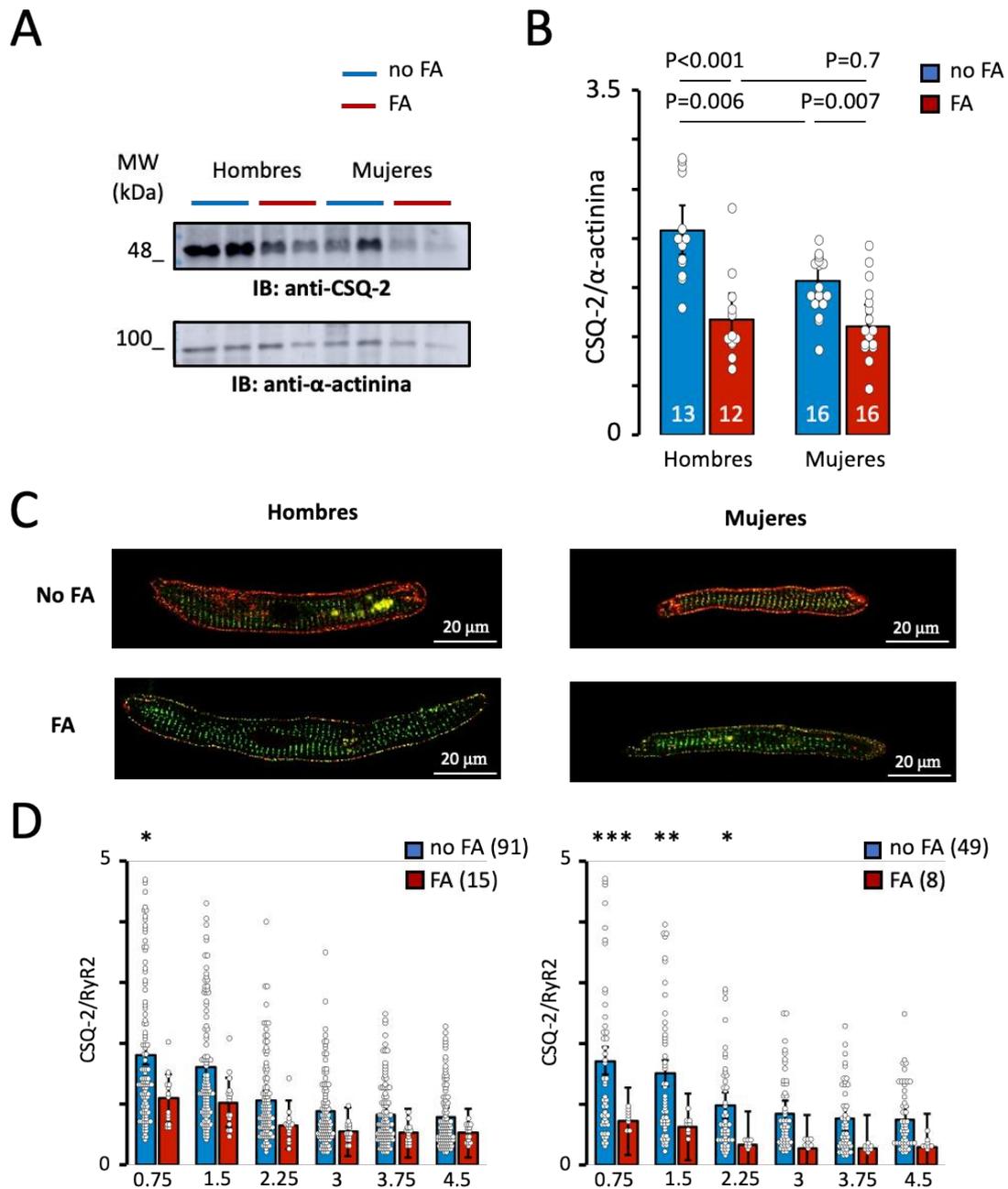


Figura 8. Efecto del sexo sobre la expresión y distribución de calscuestrina-2. **A)** *Western blot* representativos de calscuestrina-2 (CSQ-2) y α -actinina. **B)** Cuantificación mediante densitometría de la expresión de CSQ-2 normalizada a α -actinina. **C)** Imágenes superpuestas de los RyR2 (en verde) y CSQ-2 (en rojo). **D)** La media de intensidad de la ratio CSQ-2/RyR2 medido a diferentes distancias del sarcolema (aportado debajo de las barras en μ m). En mujeres, los miocitos auriculares de las pacientes sin FA presentan mayor ratio que los de las mujeres que presentan FA ($p=0.02$), hallazgo que no ocurre en los hombres ($p=0.06$). La significación estadística se ha determinado utilizando un modelo de regresión lineal no ajustado. Las diferencias estadísticas entre parejas de AF y No AF están indicadas con ***: $p<0.001$, **: $p<0.01$, *: $p=0.05$. La n se muestra en la leyenda entre paréntesis.

Efecto del sexo sobre la fosforilación de los RyR2

Para determinar si el incremento de *calcium sparks* en mujeres con FA podría ser causa de una diferencia en la fosforilación de RyR2, se midió la densidad y el estado de fosforilación de cada clúster de RyR2 en sus residuos ser2808 y ser2814. Este análisis mostró que al igual que CSQ-2, la densidad de RyR2 era superior en la membrana, pero que no había diferencias en su distribución entre hombres y mujeres con o sin FA (**Figura 9A-B**).

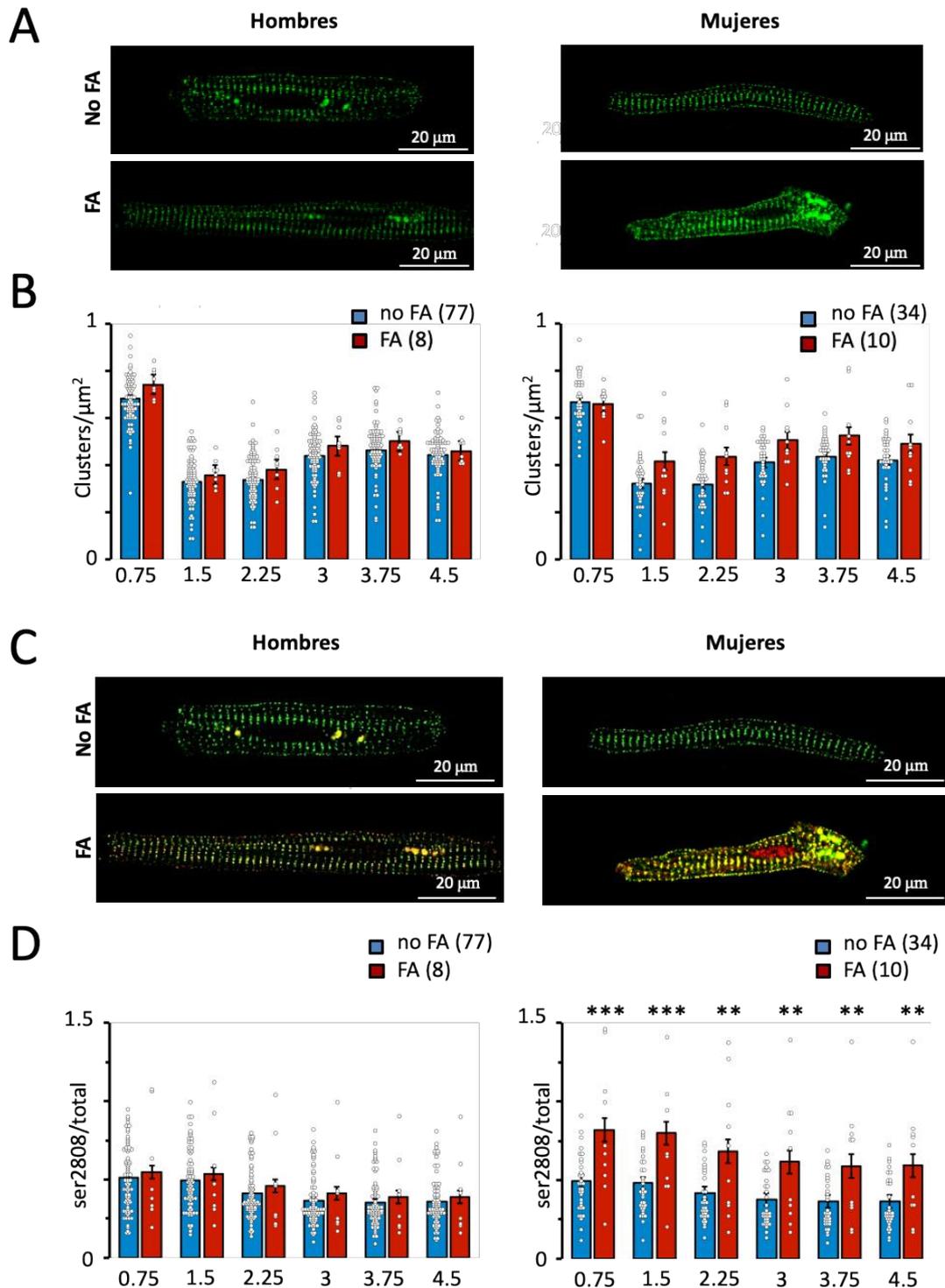


Figura 9. Efecto del sexo sobre la densidad y fosforilación del RyR2. **A)** Marcaje inmunofluorescente del RyR2. **B)** Media de la densidad de clústeres de RyR2. **C)** Superposición de imágenes de RyR2 totales (verde) y del RyR2 fosforilado en el residuo de ser2808 (en rojo). **D)** Media de la fosforilación del RyR2 en ser2808 medida como la ratio de la intensidad de fluorescencia (ser2808/RyR2) para todos los clústeres de RyR2 a diferentes distancias del sarcolema (aportado debajo de las barras en μm). La significación estadística entre pares de barras se indica con ***: $p < 0.001$, **: $p > 0.01$. El número de pacientes se encuentra entre paréntesis en la leyenda.

Sin embargo, el análisis de regresión lineal mostró una interacción significativa entre la FA, el sexo y la ratio ser2808P/RyR2 ($p = 0.018$) con un notable incremento en la fosforilación del RyR2 en el residuo ser2808 en las mujeres con FA, pero no en los hombres (**Figura 9C-D**). La fosforilación de RyR2 en el residuo s2814 es poco detectable en miocitos auriculares en reposo, y no se apreciaron diferencias en su fosforilación, medida como la ratio ser2814P/RyR2 en miocitos auriculares de 9 mujeres sin FA (0.21 ± 0.04) y 4 con FA permanente (0.16 ± 0.05).

Traducción de las diferencias sexo-específicas en la homeostasis del calcio

Con el objetivo de determinar si las diferencias específicas de sexo que se han observado podían mantenerse con tratamientos farmacológicos dirigidos a controlar las liberaciones espontáneas de calcio, nos centramos en la modulación de los receptores de membrana. Se esperaba que la estimulación de estos produjese una mayor fosforilación cerca de la membrana, como pudimos observar en la **Figura 9C-D**. Primero, se manipuló la actividad de los receptores A_{2A} , que como ya se ha visto anteriormente, son capaces de modular la liberación espontánea de calcio (5). La **Figura 10A** muestra que la activación de los receptores A_{2A} con CGS21680 (200nM) incrementa la frecuencia de I_{TI} en todos los grupos de pacientes, y que la prevención de la activación de los receptores A_{2A} con ADA (2u/ml) la redujo en todos los grupos (**Figura 10B**). El efecto de ADA fue más pronunciado en mujeres, especialmente en aquellas que presentaban FA, donde la frecuencia de I_{TI} se redujo hasta niveles observados en pacientes sin FA.

El análisis de los pacientes tratados con bloqueantes de los receptores β -adrenérgicos, que podrían reducir la fosforilación en ser2808 (197), reveló que este tratamiento reducía claramente la frecuencia de I_{TI} en mujeres con FA hasta niveles observados en pacientes sin FA (**Figura 10C**). El análisis de regresión lineal mostró una interacción significativa entre el

tratamiento con β -bloqueantes y la frecuencia de I_{TI} ($p < 0.001$), así como entre el tratamiento con β -bloqueantes, la FA y la frecuencia de I_{TI} ($p = 0.009$).

Contrastando con estos resultados, la densidad de la I_{Ca} no se vio afectada por el tratamiento de miocitos con ADA (-1.87 ± 0.24 vs. -1.87 ± 0.20 pA/pF) o por el tratamiento con β -bloqueantes (-2.03 ± 0.13 vs. -1.91 ± 0.08 pA/pF). Además, ninguno de estos tratamientos fue capaz de revertir la reducción de I_{Ca} observada en hombres con FA, en los cuales ADA redujo la I_{Ca} un $17 \pm 10\%$ y la frecuencia de I_{TI} fue $37 \pm 11\%$ menor en pacientes tratados con β -bloqueantes.

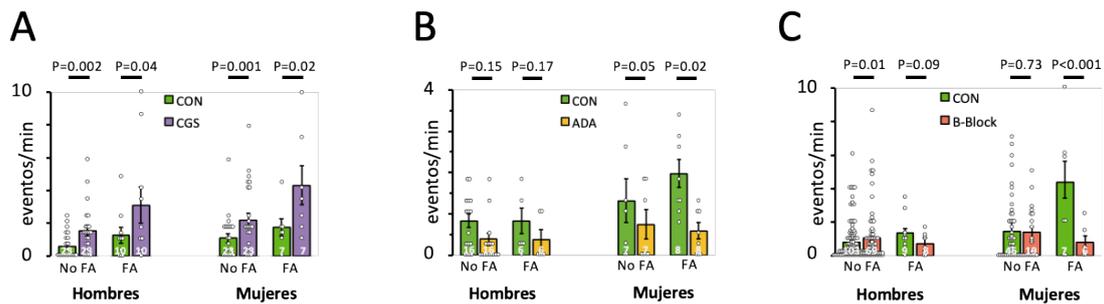


Figura 10. La inhibición de los receptores A_{2A} o el tratamiento con β -bloqueantes reduce la frecuencia de I_{TI} en mujeres con FA. **A)** Efecto de la activación de los receptores A_{2A} con CGS21680 (200 nM) sobre la frecuencia de I_{TI} . **B)** La prevención de la activación de los receptores A_{2A} tratando los miocitos con ADA (2u/ml) reduce la frecuencia de I_{TI} en mujeres con FA a niveles observados en pacientes sin FA. **C)** El tratamiento de los pacientes con β -bloqueantes (B-Block) reduce la frecuencia de I_{TI} en mujeres con FA hasta niveles observados en pacientes sin FA. Los datos se analizaron utilizando un modelo de regresión lineal no ajustado. Los p-valor se muestran para cada comparación entre barras, y el número de pacientes se muestra en cada barra.

Hallazgos principales

Este estudio es el primero en analizar un elevado número de pacientes (267) con el objetivo de investigar la influencia específica del sexo sobre la homeostasis del calcio en miocitos auriculares humanos, teniendo en cuenta los efectos confusores de otros factores clínicos que podrían afectar a la I_{Ca} o a la incidencia de las corrientes I_{TI} . Este análisis demostró que la I_{Ca} sólo se vio reducida en hombres con FA; mientras que permitió observar una mayor incidencia de I_{TI} y despolarizaciones espontáneas de la membrana únicamente en mujeres, exacerbándose en aquellas con FA. Cuando se analizaron los mecanismos subyacentes que estaban detrás de estos hallazgos diferenciales, se vio que las mujeres con FA presentaban un incremento en las liberaciones espontáneas de calcio del RS ligado a un

mayor nivel de fosforilación del RyR2 en su residuo de ser2808. Además, la prevención de la activación de los receptores A_{2A} con ADA (2u/ml) o el tratamiento de los pacientes con β -bloqueantes fueron capaces de reducir la frecuencia de I_{TI} en mujeres con FA hasta niveles observados en pacientes sin FA.

DISCUSIÓN

Hallazgos principales

Siguiendo los objetivos de la tesis, en el Capítulo I y II analizamos el efecto de todas las variantes de riesgo de 4q25 sobre la I_{Ca} y la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos. Mientras que los pacientes portadores de la variante de riesgo en rs1448818 (la más próxima a PITX2, considerada intrónica) (135,198,199) presentaban una reducción significativa en la I_{Ca} , los pacientes portadores de la variante de riesgo rs10033464 (situada unas 150 kb antes del extremo 5' del promotor de PITX2) (198) presentaban un incremento significativo de la I_{Ca} . Por otro lado, el análisis del efecto de las variantes de riesgo de 4q25 sobre los I_{TT} mostró que los pacientes portadores de variante de riesgo en rs1448818 presentaban una tendencia a reducir la frecuencia de I_{TT} , mientras que los pacientes portadores de las variantes de riesgo en rs2200733, rs13143308 y rs10033464 presentaban un incremento significativo en la frecuencia de I_{TT} . Teniendo en cuenta estos hallazgos en conjunto, el efecto parece estar asociado a la localización en la que se encuentran las variantes de riesgo, sugiriéndose un efecto inhibitor en la región del extremo en la que se encuentra la variante de riesgo rs1448818, y un efecto estimulador en la región central donde se encuentran las variantes de riesgo rs2200733, rs13143308 y rs10033464. Por otro lado, en el Capítulo III investigamos el efecto de la alteración en la homeostasis del calcio y de las variantes de riesgo 1q21 sobre la corriente SK3 y la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos. Se mostró que los pacientes con FA, los portadores de la variante de riesgo en rs1448818 de 4q25 y los portadores de la variante rs13376333 de 1q21 presentaban una reducción en la corriente SK sensible a apamina. Además, el bloqueo de los canales SK3 con apamina demostró que una disminución de la función de estos se traducía en un incremento de las despolarizaciones espontáneas de la membrana. Finalmente, en el Capítulo IV se analizó el efecto del sexo sobre la homeostasis intracelular del calcio en miocitos auriculares humanos. La FA se ha asociado a una disminución en la I_{Ca} (164–166) y a un incremento en las liberaciones espontáneas de calcio y las despolarizaciones espontáneas de la membrana (4,5,175). Sin embargo, el análisis demostró que la I_{Ca} sólo se vio reducida en hombres con FA; mientras que permitió observar una mayor incidencia de I_{TT} y despolarizaciones espontáneas de la membrana únicamente en mujeres, exacerbándose en aquellas con FA.

Contextualización de los OR de las variantes de riesgo asociadas a FA con OR de otras arritmias o cardiomiopatías conocidas

Algunos estudios han relacionado algunas variantes de riesgo genético o mutaciones a enfermedades críticas, en las que la mortalidad de los pacientes que la presentan puede ser elevada. Entre los que se asocian a arritmias cardíacas, encontramos la asociación de un SNP en rs6684209 localizado en CASQ2 con la muerte súbita (OR=19) (200), la asociación de variantes truncadas raras de la proteína titina con la FA familiar temprana (OR=36.8) (201) o la asociación de mutaciones en el extremo C-terminal del dominio que forma el canal RyR2 con la CPVT (OR=4.1)(202). Si lo comparamos con estas enfermedades, el efecto producido por los SNPs asociados a FA, que presentan OR que en general varían entre 1.2 y 1.7, será moderado (10). Así, no se esperaría que los pacientes que presentan estas variantes de riesgo presenten una mortalidad muy elevada, pero su presencia junto a otros factores de riesgo asociados previamente a la FA u otras variantes de riesgo genético podría facilitar la aparición de la enfermedad. Por otro lado, se ha asociado a fumadores pasivos (expuestos al humo de 20 cigarrillos diarios) al riesgo de padecer un infarto con un OR de 1.58 (203), poniendo de manifiesto la relevancia de los SNPs como factor de riesgo.

Papel de PITX2 sobre el efecto diferencial en la regulación del calcio intracelular apreciado en las variantes de la región 4q25 en función de su localización

Para valorar el efecto específico de las variantes de riesgo sobre la I_{Ca} y la frecuencia de I_{Tl} hemos hecho combinaciones de variantes, teniendo en cuenta aquellas que habían presentado un efecto en el modelo de regresión lineal a excepción de la variante rs6838973. Hemos tenido que ignorar el efecto de rs6838973 ya que sólo hay 10 pacientes que presentan la variante normal, por lo que no hubiera sido posible ver el efecto específico del resto de variantes. Así, en la **Figura 1** hemos contrapuesto los efectos netos de las variantes de 4q25 sobre la I_{Ca} y sobre la frecuencia de I_{Tl} , y podemos ver que la variante rs1448818 que es la más próxima al factor de transcripción PITX2 y que se superpone parcialmente a la región de codificación de PITX2 (135,198,199), presenta una reducción significativa de la I_{Ca} y una tendencia a reducir la frecuencia de I_{Tl} . En cambio, las variantes rs2200733, rs13143308 y rs10033464 situadas aproximadamente a 150 kb antes del extremo 5' del promotor de PITX2

(198), presentan un incremento en la frecuencia de I_{T1} , y rs10033464 también presenta un incremento significativo de la amplitud de I_{Ca} .

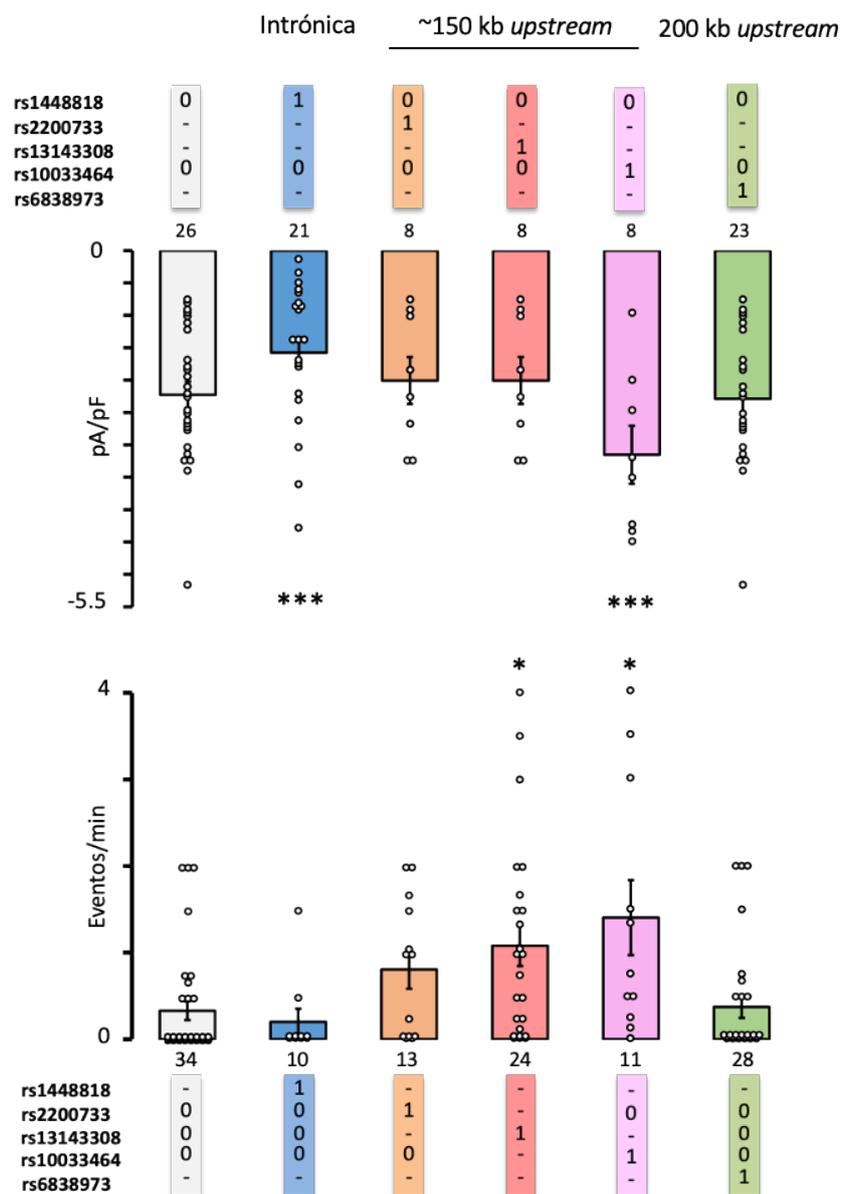


Figura 1. Efecto específico de las variantes de riesgo en 4q25 sobre la I_{Ca} y frecuencia de I_{T1} . En la parte superior e inferior de la figura se muestran unas leyendas, en las que se indica para cada barra la combinación de variantes que presenta ese grupo de pacientes, siendo: 0=no presenta variante de riesgo; 1=presenta variante de riesgo; -: incluye tanto los pacientes que presentan variante de riesgo como los que no. Encima de la leyenda superior se muestra la posición relativa de las variantes respecto a PITX2. El término *upstream* se refiere a que se encuentran antes del extremo 5' del promotor de PITX2. El número de pacientes se muestra encima o debajo de cada barra. Para la comparación entre grupos se ha utilizado la prueba de Kruskal Wallis para I_{T1} y ANOVA para I_{Ca} y los post-test correspondientes. Las diferencias significativas respecto al grupo control se muestran con *, siendo: *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$

PITX2, codifica para un factor de transcripción involucrado en el desarrollo cardíaco y en la regulación de canales iónicos (136,137,144) cuya actividad está alterada en pacientes con FA (144,204). En humanos existen 3 isoformas de PITX2: PITX2a, PITX2b y PITX2c. PITX2a y PITX2b se producen a partir de un promotor común, mientras que PITX2c es el producto de un promotor alternativo y es la principal isoforma expresada en el corazón (143). La FA se ha asociado tanto a la subexpresión como a la sobreexpresión de PITX2 en humanos (144,204). La variabilidad de la expresión de PITX2 en pacientes con FA sugiere que existe un nivel crítico de PITX2 para la función auricular normal. Los mecanismos por los que PITX2 podría promover la FA son diversos ya que es un factor de transcripción que actúa en diferentes dianas (205). Varios estudios han asociado la deficiencia de Pitx2 con una mayor susceptibilidad a presentar arritmias auriculares (140,143,144). Por ejemplo, Kirchof et al. (143) asociaron la deficiencia de Pitx2c a un acortamiento de la duración del PA, que facilitaría el fenómeno de reentrada. Por el contrario, otro estudio demostró que los pacientes con FA crónica presentaban un incremento en la expresión de Pitx2c asociado a un incremento de la corriente I_{Ks} y una reducción en la corriente I_{CaL} (204).

Además, un estudio que analizó la estructura de 4q25 mostró que existían secuencias genómicas muy próximas a las variantes ligadas a FA que establecían complejas interacciones a larga distancia con los promotores de Pitx2, y que podían actuar como elementos reguladores de la transcripción tanto en cultivos como en embriones de ratón (206). Por otro lado, también se identificó el SNP rs2595104 como la variante funcional para el riesgo de FA en el locus rs1448818, y que la eliminación o modificación de la región que rodeaba a rs2595104 se asociaba a una reducción en la expresión de PITX2c (199). Sin embargo, también se identificaron 3 variantes (rs17042171, rs2200733 y rs6843082) que se asociaban a niveles alterados de PITX2a en aurícula derecha (207). De acuerdo con estos estudios y con los resultados obtenidos, podría ser que hubiese diferentes secuencias genómicas en 4q25 que regulasen diferentes dianas o promotores, y por tanto tuviesen efectos funcionales diferentes, lo cual explicaría las diferencias apreciadas entre las variantes de la región de 4q25. También se podría explicar por la superposición parcial de la variante rs1448818 a PITX2, que se considera en parte intrónica, por lo que podría regular la actividad de PITX2 de forma distinta a las otras variantes situadas en la región intergénica.

Por otro lado, aunque el análisis de regresión lineal con distribución binomial negativa había mostrado un efecto significativo de la variante de riesgo rs6838973 sobre la frecuencia de I_{TL} , en la **Figura 1** no se aprecia ninguna diferencia respecto al control. Aunque esto no permite descartar un efecto sobre la homeostasis del calcio, estos hallazgos sugieren que la

asociación de rs6838973 a FA también podría estar mediada por otro mecanismo. Esto no sería sorprendente ya que como se ha comentado anteriormente la alteración de PITX2 se ha relacionado con la alteración de la corriente I_{KS} (204) así como la expresión de canales de Na^+ , K^+ y conexina (144).

La variante de riesgo en rs1448818 de 4q25 reduce la I_{Ca} en miocitos auriculares humanos

La reducción de la I_{Ca} es uno de los hallazgos asociados a FA (164–166), y se ha reportado que esta reducción puede producir aritmogénesis auricular debido a la reducción de la duración del PA y del periodo refractario (167–169). Por ello, la observación de una reducción similar en los pacientes sin FA portadores de la variante rs1448818 sugiere que este podría ser el mecanismo que contribuyese al posterior desarrollo de la FA en estos pacientes.

Por otro lado, no se observó un efecto diferencial en la forma de la curva I-V, ni en la inactivación de I_{Ca} o la recuperación de su inactivación entre los pacientes que presentaban las variantes de riesgo y los que no. Estos resultados sugirieron que las propiedades de apertura y cierre de los $Ca_v1.2$ no se ven afectadas por la presencia de las variantes de riesgo de 4q25. En cambio, la cinética de la inactivación de la I_{Ca} , fue significativamente más lenta en pacientes portadores de la variante de riesgo en rs1448818 respecto a los no portadores. Además, el análisis de la asociación entre la amplitud de I_{Ca} y la constante de inactivación rápida (τ) confirmó una correlación positiva moderada. La inactivación de I_{Ca} es dependiente de calcio, por lo que se ve afectada tanto por la entrada de calcio a través de los $Ca_v1.2$ como por la liberación de calcio del RS (208). Dado que esta inactivación dependiente de calcio ocurre incluso cuando el calcio citosólico está tamponado (por ejemplo, con EGTA), está claro que el calcio que entra a través de los $Ca_v1.2$ puede ejercer una inactivación local sobre los mismos (208). Además, la cantidad de calcio que se libera del RS también depende de la cantidad de calcio que entra a través de los $Ca_v1.2$ (16). Así, cabría esperar que la menor amplitud de la I_{Ca} en los pacientes que presentan las variantes de riesgo en rs1448818 enlenteciese la inactivación de la I_{Ca} .

Las diferencias observadas en la amplitud de la I_{Ca} y su inactivación podrían deberse a una diferencia en la expresión de los $Ca_v1.2$ o alteraciones en su modulación neurohormonal. En este sentido, existe cierta ambigüedad ya que hay estudios que han reportado

una reducción (209,210) mientras que otros no han apreciado diferencias (211). De acuerdo con este último estudio, nuestro análisis de la densidad de $Ca_v1.2$ no muestra diferencias significativas entre las diferentes variantes de riesgo de 4q25, sugiriendo que la causa de las diferencias apreciadas en la amplitud de la I_{Ca} radicaría en otros mecanismos reguladores de la actividad de los $Ca_v1.2$.

Los pacientes portadores de la variante de riesgo en rs1448818 también presentaban una tendencia a la reducción de la frecuencia de I_{TT} . Aunque no fue significativa, nos podría estar indicando que el mecanismo por el cual se produce una reducción de la actividad aparentemente generalizada podría ser por un mecanismo común como la activación de una PDE que degradara AMPc o una fosfatasa que redujese tanto la fosforilación de $Ca_v1.2$ como del RyR2. Además, podría ser que esa PDE o fosfatasa estuviese más cerca del complejo macromolecular de $Ca_v1.2$ y por tanto tuviese más efecto sobre la actividad de este que sobre la actividad del RyR2.

De acuerdo con ello, se ha descrito que la mayoría de las proteínas del corazón tienen múltiples lugares de fosforilación, y que el estado de fosforilación de cada una de ellas depende de un equilibrio dinámico local entre la actividad de múltiples quinasas y fosfatasas organizadas en complejos macromoleculares (212). En el corazón, mayormente encontramos PP1, PP2A y PP2B (conocida también como calcineurina) (213). Un estudio, ya asoció la disminución de la I_{Ca} apreciada en pacientes con FA a una desfosforilación de $Ca_v1.2$ mediada por el incremento de la actividad de fosfatasas (214). Otro estudio mostró que la inhibición de la unión de PP2A al $Ca_v1.2$ mediante péptidos inhibidores aumentaba la I_{Ca} , sugiriendo que la PP2A podría tener un papel importante en su regulación (215). Sin embargo, la inhibición de PP2A con ácido okadaico aumentó la probabilidad de apertura de los $Ca_v1.2$ en pacientes sin FA, pero no en aquellos que presentaban FA crónica (216). Además, gracias a la técnica de inmunofluorescencia, se ha descrito que las subunidades reguladoras de PP2A tienen diferentes localizaciones, mientras que algunas están cerca de las líneas Z otras están más próximas al núcleo (217). Estos hallazgos sugieren que la regulación funcional de PP2A es espacialmente heterogénea, y que los mecanismos por los que la PP2A podría regular la I_{Ca} son más complejos de lo que podrían parecer.

Un incremento en la actividad o expresión de las PDEs también podría contribuir en la disminución de la I_{Ca} . Sin embargo, la FA se ha asociado a una menor actividad de la PDE4 con capacidad de inducir respuestas arrítmicas en miocitos y tejido auricular humano (218).

Por otro lado, varios estudios han relacionado un incremento del estrés oxidativo en el tejido auricular con el desarrollo de la FA, sugiriendo que podría tener un papel importante en el fenómeno de remodelado (219,220). Además, en diferentes estudios con modelos animales de FA se han apreciado cambios en el estado de oxidación (221,222), y se ha demostrado que los cambios en el estado redox intracelular de los miocitos de pacientes con FA podían contribuir a la reducción de la I_{Ca} (223). El glutatión es el agente reductor endógeno más abundante y es un modulador crítico del estado redox, por lo que alteraciones en los niveles de glutatión celular pueden tener consecuencias importantes para el estado redox. En este sentido, otro estudio reciente ha asociado la FA al estrés oxidativo y a una disminución de los niveles de glutatión auricular (224), fenómenos que podrían estar detrás de la reducción de la I_{Ca} observada en los pacientes con variantes de riesgo en rs1448818. Por otro lado, un estudio sugirió que el incremento de ROS debido a una disfunción mitocondrial estaba implicado en la oxidación del RyR2, aumentando la liberación espontánea de calcio y el desarrollo de FA (225). Por tanto, este último hallazgo no iría de acuerdo con una tendencia a reducir la frecuencia de I_{TI} producidos por las liberaciones espontáneas de calcio.

Finalmente, el $Ca_v1.2$ está compuesto por la unidad $Ca_v\alpha1.2$ que forma el poro del canal, y por las subunidades accesorias $Ca_v\beta2$ y $Ca_v\alpha2\delta$, por lo que la alteración de cualquier subunidad accesoria del canal $Ca_v\alpha1.2$ podría alterar su función. Concretamente, la subunidad $Ca_v\beta2$ es conocida por regular el tráfico de los canales $Ca_v1.2$ a través de la membrana celular (226,227), su internalización (228) y sus propiedades de apertura (226,227). Bajo condiciones de estrés, las propiedades de $Ca_v\beta2$ pueden verse alteradas, afectando así al anclaje, movilidad intracelular y función del complejo multiproteico de $Ca_v1.2$.

Teniendo en cuenta los hallazgos del presente estudio, los mecanismos subyacentes más prometedores para explicar los efectos funcionales de la variante rs1338818 podrían ser la activación de alguna fosfatasa o la alteración de la subunidad $Ca_v\beta2$.

Las variantes de riesgo en rs2200733, rs13143308 y rs10033464 de 4q25 aumentan la frecuencia de I_{TI} en miocitos auriculares humanos

Las variantes rs2200733, rs13143308 y rs10033464 se encuentran a unas 150 kb de PITX2 (135,198), y realizamos su análisis en conjunto ya que segregan juntas genéticamente. Así, siempre que hay una variante de riesgo en rs13143308, hay una variante de riesgo en

rs2200733 o en rs10033464. Por esta razón, el efecto apreciado en la variante rs13143308 tendrá la influencia de las variantes rs2200733 y rs10033464.

El incremento en la frecuencia de I_{TI} también es una característica asociada a los miocitos auriculares de pacientes con FA, y se ha demostrado que puede ser potencialmente arritmogénica (4,5,175). Dado que los portadores de las variantes de riesgo en rs2200733, rs13143308 o rs10033464 han mostrado una frecuencia significativamente superior de I_{TI} en comparación con aquellos pacientes portadores de la variante normal este mecanismo podría contribuir al posterior desarrollo de FA. Además, estos hallazgos podrían proporcionar una explicación mecanística para los estudios que han demostrado que la terapia de ablación presenta una eficacia menor en los pacientes portadores de variantes de riesgo en rs2200733 y rs10033464 (146,147). Si el mecanismo por el cual se desarrolla la actividad ectópica es un incremento en las liberaciones espontáneas de calcio del RS que produce un incremento en la frecuencia de I_{TI} que a su vez puede inducir DADs en todo el miocardio auricular, es fácil pensar que la terapia de ablación no sea efectiva en estos pacientes. Por otro lado, un estudio también demostró que los pacientes portadores de la variante normal en rs10033464 respondían mejor al tratamiento con antiarrítmicos de clase III, mientras que los pacientes portadores de la variante de riesgo en rs10033464 respondían mejor a los antiarrítmicos de clase I (148). Dado que el mecanismo de acción de los antiarrítmicos de clase I consiste en bloquear los canales de Na^+ , se esperaría que este tratamiento fuese efectivo en los pacientes portadores de la variante rs10033464 ya que incrementaría el umbral de descarga de los canales de Na^+ , disminuyendo así la capacidad de las corrientes I_{TI} de desencadenar potenciales de acción espontáneos.

Los I_{TI} son el resultado de la expulsión a través de NCX-1 del calcio liberado de forma espontánea del RS. Por tanto, detrás de este incremento en la frecuencia de I_{TI} hay un incremento en las liberaciones espontáneas de calcio del RS a través del RyR2. Además, ya mostramos la asociación de la variante de riesgo en rs13143308 con un incremento de las liberaciones espontáneas de calcio y de la actividad eléctrica en miocitos auriculares humanos (13). Algunos de los mecanismos que pueden incrementar la probabilidad de apertura del RyR2 son: su activación por el calcio luminal del RS (61,229,230), un incremento en la fosforilación del RyR2 (5–7,175) y/o un incremento del contenido de calcio del RS (196,231). De acuerdo con esto, los hallazgos de este estudio han demostrado un incremento en la fosforilación del RyR2 en su residuo ser2808 en los pacientes portadores de la variante de riesgo en rs13143308 y en rs2200733. Por el contrario, no se apreciaron diferencias significativas en el análisis de la fosforilación del RyR en ser2814 entre pacientes portadores

de las variantes y no portadores. Por otro lado, las variantes de riesgo en rs13143308 y rs10033464 mostraron un incremento en el contenido de calcio del RS. Esto sugiere que la variante de riesgo en rs2200733 y en rs10033464 producen un incremento de las liberaciones espontáneas de calcio por diferentes mecanismos, mientras que en el caso de los portadores de la variante de riesgo en rs2200733 el mecanismo responsable apuntaría a ser un incremento en la fosforilación del RyR2 en ser2808, en el caso de los portadores de la variante de riesgo en rs10033464 el mecanismo responsable parece ser un incremento en el contenido de calcio del RS. Además, estos hallazgos cuadrarían con el hecho de que la variante rs13143308, que incluye tanto los pacientes con variante de riesgo en rs2200733 como los pacientes con variante de riesgo en rs10033464, presentan tanto un incremento en la fosforilación del RyR2 en ser2808 como un incremento en el contenido de calcio del RS.

Por otro lado, la variante de riesgo en rs10033464 es la única que ha presentado un incremento significativo de la amplitud de I_{Ca} . En este sentido, se ha visto que la fosforilación de $Ca_v1.2$ por la vía de PKA incrementa la amplitud de la I_{Ca} hasta 3-4 veces en cardiomiocitos de mamíferos (232,233). Además, un estudio demostró que la fosforilación de $Ca_v1.2$ en Ser1700 es crucial para la regulación β -adrenérgica y la homeostasis del calcio (234). Así, la fosforilación del $Ca_v1.2$ podría ser el mecanismo responsable del incremento de la amplitud de I_{Ca} apreciada en los pacientes con la variante de riesgo en rs10033464. Por tanto, el incremento de la amplitud de I_{Ca} apreciado en los portadores de la variante de riesgo en rs10033464 que se acompaña de un incremento de la frecuencia de I_{T1} , podría explicarse por un incremento generalizado de la fosforilación en estos pacientes. Sin embargo, aunque se ha visto un incremento significativo de la fosforilación en pacientes portadores de las variantes de riesgo rs2200733 o rs13143308, los datos para la variante de riesgo rs10033464 no apoyan a esta hipótesis.

Por ello, hay que considerar los mecanismos fisiopatológicos que pueden afectar a diversas proteínas entre las cuales se encontraría el RyR2, así como los mecanismos fisiopatológicos que podrían afectar al RyR2 de forma selectiva. La sensibilidad del RyR2 a la concentración de calcio intracelular está regulada por sus proteínas accesorias asociadas, entre las cuales encontramos la FKBP12.6, la CaM y la CSQ2, que pueden inducir cambios conformacionales que alteren la probabilidad de apertura o cierre del RyR2. A su vez, la unión de las proteínas accesorias al RyR2 está regulada por la fosforilación reversible del RyR2, controlada por quinasas como la PKA y la CaMKII y fosfatasas como la PP1 o PP2A (235,236). Por ejemplo, la unión de la FKBP12.6 al RyR2 estabiliza el complejo macromolecular tetramérico, ayudando a mantener cerrado el RyR2 durante la fase de reposo

del miocito (54,237). En relación con esto, un estudio describió que en los pacientes con FA crónica los niveles de FKBP12.6 fueron un 50% inferiores, lo que explicaría la mayor probabilidad de apertura de los RyR durante la diástole en estos pacientes (6).

Además de la regulación por parte de las proteínas accesorias, las modificaciones post-traduccionales como la oxidación o la fosforilación también pueden tener un impacto en la función del RyR2. Por un lado, cuando el RyR2 se expone a ROS y se oxida, la liberación espontánea de calcio aumenta, proceso que se revierte cuando se reduce la oxidación (238,239). Por otro lado, las liberaciones espontáneas de calcio asociadas a la FA se han relacionado con la fosforilación del RyR2 en el residuo ser2808 producida por PKA (5,6), así como a la fosforilación del residuo ser2814 por CaMKII (7). Además, también se ha descrito un incremento en la expresión y actividad de CaMKII en modelos animales de FA (240,241), así como en pacientes con FA crónica (7,175,242). Sin embargo, el análisis en la fosforilación de RyR2 en ser2814 no ha mostrado diferencias entre las variantes normales y de riesgo, por lo que podría sugerir que no es el mecanismo subyacente implicado.

En cuanto a los mecanismos que pueden incrementar la fosforilación generalizada, el incremento de AMPc debido a la activación de diferentes receptores acoplados a proteínas Gs (receptores adrenérgicos, colinérgicos o purinérgicos, entre otros) activaría la PKA, que a su vez fosforilaría varias proteínas involucradas en el proceso de excitación-contracción entre las cuales encontramos los Ca_v1.2, los RyR2, PLB, la TnI y la proteína C de unión a la miosina. La fosforilación de PLB supondría una recaptación más rápida de calcio hacia el RS, incrementando así el contenido de calcio del RS (2). Así, la fosforilación de PLB podría explicar el incremento del contenido de calcio del RS apreciado en los portadores de la variante de riesgo rs13143308 o de la variante de riesgo en rs10033464.

En este caso, la alteración de las PDEs también podría jugar un papel importante, ya que son las encargadas de hidrolizar el AMPc cuando se produce un incremento inducido por la activación de los receptores acoplados a proteínas G. Se ha demostrado que tanto PDE3 como PDE4 contribuyen a la hidrólisis del AMPc en la aurícula humana, por lo que ayudan al control de la contractibilidad cardíaca y de la actividad eléctrica (218,243). Además, uno de estos estudios demostró que la inhibición de PDE4 en miocitos auriculares humanos incrementaba la frecuencia de *calcium sparks* y *calcium waves* (218).

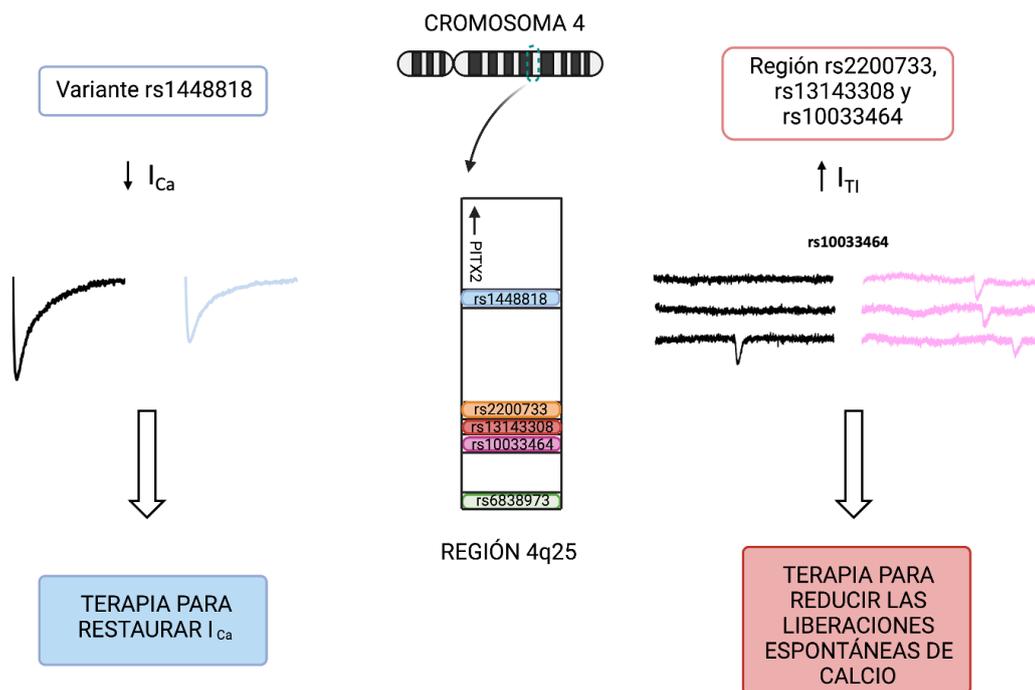


Figura 2. Resumen gráfico de los principales hallazgos de los Capítulos I y II. Creado con Biorender.com

Papel de los niveles de ADO y la actividad de ADA en plasma sobre el incremento de la frecuencia de I_{T1} apreciado en las variantes rs2200733, rs13143308 y rs10033464

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que los pacientes con FA presentaban un incremento de la expresión de receptores A_{2A} en tejido auricular (5), sugiriendo que estos podían tener un papel importante en el desarrollo de FA. Otro estudio publicado recientemente, demostró que los pacientes con FA presentaban hasta 2.5 veces más ADO en plasma que aquellos que no presentaban FA. Además, en el mismo estudio se demostró que la actividad de ADA en plasma se reducía un 38% en pacientes que presentaban FA respecto a los que no (178). Sin embargo, sigue sin estar claro si el incremento en la expresión de los receptores A_{2A} y los niveles de ADO son una causa o una consecuencia de la enfermedad.

De acuerdo con esto y con los mecanismos descritos anteriormente, el análisis de los niveles ADO y la actividad de ADA en plasma mostró que los pacientes portadores de

variante de riesgo en rs2200733 y rs13143308 presentaban una reducción significativa de la actividad de ADA. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la administración de ADA era capaz de reducir significativamente la frecuencia apreciada en situación control, sugiriendo que la ADO endógena era capaz de estimular los receptores A_{2A} (5). Así, una reducción de la actividad de ADA conlleva una menor degradación de ADO, por lo que esta última podría ser capaz de estimular los receptores A_{2A} produciendo un incremento en la fosforilación del RyR2 en ser2808 por la vía de PKA, y consecuentemente un incremento de las liberaciones espontáneas de calcio del RS y de la frecuencia de I_{TT} . Curiosamente, la actividad de ADA estaba reducida en los pacientes portadores de las variantes de riesgo en rs2200733 y rs13143308, que fueron las mismas que presentaron un incremento en la fosforilación del RyR2 en ser2808. Estos hallazgos sugieren que la reducción de la actividad de ADA podría estar detrás del aumento de la fosforilación del RyR2, del incremento del contenido de calcio del RS y, por tanto, de la actividad eléctrica apreciada en este estudio. Los pacientes portadores de la variante de riesgo en rs10033464 también mostraron una tendencia a la reducción de la actividad de ADA, aunque no fue significativo.

Por otro lado, si se pudiese detectar el incremento de los niveles de ADO en plasma en los pacientes que tienen riesgo de padecer FA pero que aún no han desarrollado la enfermedad, se podría utilizar como biomarcador para la detección precoz y la realización de un tratamiento preventivo. Sin embargo, este estudio no muestra diferencias en los niveles de ADO en plasma entre los pacientes que presentan variante de riesgo y los que no, por lo que este parámetro no sería útil como biomarcador.

Las alteraciones en la homeostasis del calcio tienen un efecto sobre la corriente SK sensible a apamina en miocitos auriculares humanos

Los canales SK se activan por los cambios en la concentración intracelular de calcio que se producen durante el latido cardíaco por vía de la CaM (179), por lo que cabe esperar que si se produce una reducción en el calcio intracelular su función también se vea disminuida. De acuerdo con esto, el estudio del Capítulo III demostró que la disminución de la I_{Ca} observada en pacientes con FA crónica y en pacientes portadores de la variante de riesgo en rs1448818 también se traducía en una disminución de la corriente SK sensible a apamina. Además, mediante la técnica de inmunofluorescencia se demostró la colocalización

de los $Ca_v1.2$ y los canales SK3 en miocitos auriculares humanos, confirmando la importancia de los $Ca_v1.2$ en la regulación de la corriente SK. Por otro lado, existen estudios en modelos murinos que demuestran que el calcio liberado a través de los RyR2 del RS es necesario para la activación de los canales SK (184,185). Por tanto, aunque la técnica de inmunofluorescencia no demostrase una colocalización de los canales SK3 y los RyR2, no se puede descartar que parte de la función de los canales SK esté regulada por CICR.

Por otro lado, existe controversia sobre el mecanismo por el cual los canales SK contribuyen al desarrollo de la FA. Algunos estudios demuestran un aumento en la expresión y función de los canales SK en modelos animales de FA (153,186). En cambio, otros estudios han asociado la FA crónica con una disminución en la expresión de los canales SK1, SK2 y SK3, y con una disminución de la corriente SK sensible a apamina (152,188). Juntos, estos estudios demuestran que tanto el aumento como la disminución de la expresión y función de los canales SK puede resultar en un incremento de la susceptibilidad a presentar FA. Así, un incremento en la expresión y función de estos podría resultar en una disminución del periodo refractario auricular, y por tanto favorecer la aparición de arritmias por un mecanismo de reentrada. En cambio, la disminución de la expresión y función de los canales SK podría resultar en un retraso en la repolarización, resultando en una mayor facilidad para llegar al umbral de descarga y producir despolarizaciones espontáneas de membrana que también podrían ser críticas para el desencadenamiento de arritmias. En este sentido, los hallazgos de nuestro estudio van de acuerdo con los estudios que habían asociado previamente la FA crónica a una disminución en la corriente SK sensible a apamina (152,188).

La variante de riesgo rs13376333 de 1q21 tiene un efecto *per se* sobre la corriente SK sensible a apamina en miocitos auriculares humanos

Después de ver que las alteraciones en la homeostasis del calcio influían en la corriente SK sensible a apamina, se analizó el efecto de la variante rs13376333 sobre la corriente SK sensible a apamina en pacientes sin alteraciones en la homeostasis del calcio por FA o por la presencia de la variante de riesgo en rs1448818, es decir en aquellos que presentaban una I_{Ca} normal. El análisis reveló que aquellos pacientes que portaban la variante de riesgo en rs13376333 presentaban una reducción de la corriente SK sensible a apamina, sugiriendo que la presencia de la variante de riesgo produce una reducción en la función del canal SK. No obstante, no pudimos demostrar si esta disminución en la corriente SK sensible

a apamina también se acompañaba de una reducción en la densidad de canales SK. Los canales SK, al igual que muchas otras proteínas de membrana, forman complejos macromoleculares en los que interaccionan varias proteínas entre las cuales encontramos la CaM, α -actinina (244), la filamina A (187) y la cadena ligera de la miosina (MLC2) (245). Los canales SK2 cardíacos se unen a los $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ a través de la α -actinina. Por esta razón, cualquier alteración en la expresión o actividad de alguna de las proteínas que interaccionan con el canal SK2 podría regular su expresión y función (187,244,245). Por ejemplo, se ha demostrado que una disminución en la α -actinina o en la filamina A han resultado en una disminución en la expresión de los canales SK2 (187,244). Por otro lado, la caseína quinasa II (CK2) y la PP2 se han identificado como proteínas de unión del canal SK2 (246). Estas últimas regulan la sensibilidad del canal SK2 fosforilando o desfosforilando la CaM (181). Un estudio reciente también ha asociado la junctofilina tipo 2 (JP2) a los canales SK2 de los cardiomiocitos (247). En conclusión, a parte de una reducción de la expresión de los canales SK3, hay varios factores que podrían estar detrás la reducción en la corriente SK sensible a apamina observada en los pacientes con la variante de riesgo en rs13367333, por lo que habría que seguir estudiando y profundizando en los mecanismos responsables de esta reducción.

Por otro lado, se podría esperar que la reducción en la corriente SK sensible a apamina debida a la reducción de la I_{Ca} apreciada en los pacientes portadores de variante de riesgo rs1448818 junto a la reducción de la corriente SK sensible a apamina que presentan los pacientes portadores de variante de riesgo en rs13376333 podría tener un efecto sumatorio. Sin embargo, el grupo de pacientes que presentaba ambas variantes de riesgo mostró la misma reducción de la corriente SK sensible a apamina que los pacientes que sólo tenían variante de riesgo en rs1448818.

Teniendo en cuenta que una reducción de la corriente de calcio en pacientes con FA o en portadores de la variante rs1448818 acortaría la duración del PA, mientras que una reducción de la corriente SK3 en pacientes con FA o en portadores de la variante de riesgo rs13376333 aumentaría la duración del PA, es probable que la variante de riesgo rs13376333 se haya asociado a la FA debido a que la disminución de su función supondría un retraso en la repolarización de potenciales de membrana espontáneos inducidos por la liberación de calcio, que facilitaría la inducción de potenciales de acción espontáneos y arritmias. De acuerdo con ello, la inhibición de los canales SK con 100 nM apamina aumentó la frecuencia de despolarizaciones espontáneas de la membrana respecto a la frecuencia registrada en situación control.

Así, una terapia farmacológica dirigida a restaurar la función de los canales SK3 en los pacientes portadores de la variante de riesgo en rs13376333 podría ser una terapia preventiva efectiva para evitar el desarrollo de FA, o para tratar aquellos pacientes que presentan FA de forma clínica y que presentan esta variante de riesgo.

El sexo tiene un efecto diferencial sobre la I_{Ca} y la frecuencia de I_{TI} en miocitos auriculares de pacientes con FA

Efecto del sexo sobre la I_{Ca}

Mientras se ha estudiado el efecto que puede tener la enfermedad de la válvula mitral (162), la edad (248) o la función del ventrículo izquierdo (249) sobre la I_{Ca} o la frecuencia de I_{TI} en miocitos auriculares humanos, los estudios que se refieren a los efectos del sexo sobre la homeostasis del calcio únicamente se han realizado en modelos animales (250–252).

Así, se ha visto que un incremento de los niveles de testosterona puede reducir la I_{Ca} en miocitos ventriculares de cobaya (252), apuntando a que existen diferencias específicas de sexo que afectan a la I_{Ca} en animales sanos. En contraste con este hallazgo, nosotros hemos visto que el sexo no afecta a la I_{Ca} en miocitos auriculares humanos cuando se tienen en cuenta los efectos confusores de los factores clínicos de la **Tabla 1** del Capítulo IV. Sin embargo, al realizar la comparación por pares de cada grupo de pacientes, se vio una reducción significativa de la I_{Ca} en hombres con FA, pero no en mujeres. Por tanto, el efecto de la FA sobre la I_{Ca} demostrada en algunos estudios que incluían ambos sexos (164,165), podría ser debido a la contribución de los hombres en la población de estudio. El sexo no presentó un efecto diferencial en la forma de la curva I-V, ni en pacientes con FA ni en aquellos sin FA, sugiriendo que el sexo no afecta ni a la densidad ni a las propiedades de apertura de los $Ca_v1.2$. No obstante, al analizar la cinética de la inactivación de la I_{Ca} , esta fue significativamente más lenta en hombres con FA que en mujeres con FA. Teniendo en cuenta que la liberación de calcio del RS modula la constante de desaparición rápida de la I_{Ca} , el hecho de que la inactivación sea más rápida en mujeres que en hombres con FA podría ser debido a que estas presentan un incremento de liberaciones espontáneas de calcio del RS (ver en el siguiente apartado). Por otro lado, también podría ser debido a que las mujeres con FA presentan una insignificante reducción de la I_{Ca} , mientras que sería de esperar que la significativa reducción en la amplitud de la I_{Ca} que presentan los hombres con FA hiciese

más lenta la inactivación en este grupo. Esta reducción observada en los hombres con FA podría ser debida a una disminución en la expresión de los $Ca_v1.2$, aunque existe ambigüedad sobre este concepto ya que algunos estudios han reportado una reducción (209,210) mientras que otros no han encontrado diferencias (211). En este estudio, hemos visto que la reducción de la I_{Ca} en hombres con FA no coincide con una menor densidad de $Ca_v1.2$, apuntando a otros factores como podrían ser el estrés oxidativo (224) o $Ca_v\beta 2$ (253) como potenciales moduladores de la amplitud de I_{Ca} en hombres con FA.

Efecto del sexo sobre las liberaciones espontáneas de calcio del RS

Cuando tenemos en cuenta los efectos confusores de otros factores clínicos, tanto el sexo de forma individual, como el sexo junto a la FA, presenta una interacción significativa con la frecuencia de I_{TI} . El sexo masculino apenas afecta a la frecuencia de I_{TI} cuando comparamos pacientes con y sin FA. En cambio, la frecuencia de I_{TI} fue significativamente superior en mujeres que en hombres sin FA, e incrementó notablemente en mujeres con FA. Además, la amplitud de los I_{TI} aumentó de forma significativa en mujeres con FA, incrementando así la capacidad de los I_{TI} para inducir despolarizaciones espontáneas de la membrana. En relación con este hallazgo, la incidencia de despolarizaciones espontáneas de membrana en pacientes con FA fue 2 veces superior en mujeres que en hombres. De acuerdo con el rol que tienen las hormonas sexuales femeninas sobre la regulación de las despolarizaciones espontáneas de membrana, se ha demostrado en miocitos de cobaya que la ovariectomía puede inducir alteraciones en la homeostasis del calcio y un aumento en la incidencia de despolarizaciones espontáneas de membrana (250). Esto podría ir de acuerdo con la elevada incidencia de despolarizaciones de membrana en mujeres mayores con FA, pero no explicaría el por qué la incidencia de liberaciones espontáneas de calcio en hombres es menor. Por tanto, se necesitarían más estudios para poder explicar de qué forma afectan las hormonas sexuales a la homeostasis de calcio en miocitos auriculares.

El análisis de los mecanismos subyacentes a la elevada frecuencia de I_{TI} en los miocitos auriculares de nuestro estudio demostró que el número de spark sites fue significativamente superior en mujeres, pero no en hombres con FA. Este hallazgo coincidió con que los sparks eran más anchos y duraban más, fenómenos que podrían facilitar su fusión en ondas de calcio, desencadenando un intercambio electrogénico Na-Ca y despolarizaciones de membrana. La elevada densidad de spark sites en mujeres con FA no fue desencadenada por una sobrecarga de calcio en el RS, ya que ni el sexo ni la presencia de FA causó un efecto

significativo en la liberación de calcio del RS sensible a cafeína, tal como se había visto en estudios previos (4,5,175). Por otro lado, el análisis mediante *western blot* reveló que la expresión de SERCA2a fue significativamente superior en mujeres sin FA, pudiendo explicar que la amplitud de los calcium sparks fuese superior en las mujeres sin FA. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de NCX-1 o PLB cuando se compararon en mujeres con y sin FA, al igual que tampoco en la fosforilación de PLB en ser16 o thr17, descartando que los hallazgos fuesen consecuencia de una alteración en la recaptación de calcio del RS. Tal como se ha demostrado en algunos estudios, la recaptación de calcio del RS también se podría ver incrementada por la disminución de la expresión de sarcolipina en presencia de FA (249,254), pero la inexistencia de diferencias en las mediciones que realizamos de la carga de calcio del RS, tanto en hombres como en mujeres con FA, no apoyó esta teoría.

Sin embargo, al medir los niveles de CSQ-2, se percibió que en las mujeres con FA estos niveles eran inferiores que en las mujeres sin FA, hallazgo que podría contribuir a incrementar la frecuencia de sparks (255,256) en aquellas con FA. Lo mismo ocurrió con el análisis de la fosforilación del RyR2 en s2808, en el que los miocitos de las mujeres con FA presentaron mayor fosforilación que en aquellas sin FA, fenómeno previamente asociado con la FA en estudios que incluían poblaciones mixtas (ambos sexos)(5,6,175,196). El hecho de que este incremento de la fosforilación del RyR2 en s2808 sólo se observase en mujeres con FA, sugiere que hay que tener precaución al interpretar el análisis de la fosforilación de s2808 en estudios que incluyan una población mixta de hombres y mujeres, ya que su incremento y la significación estadística podría variar en función de la fracción de mujeres del estudio, especialmente si la población de estudio es pequeña. De hecho, algunos estudios de poblaciones pequeñas han encontrado una diferencia significativa en la fosforilación de s2808 (5,6,175,196), mientras que otros no lo han hecho (7).

En estudios anteriores de poblaciones mixtas, la FA paroxística también se había asociado a un incremento en las despolarizaciones de la membrana inducidas por liberaciones espontáneas de calcio (196). Inicialmente, en este estudio se incluyeron los pacientes con FA paroxística, pero el análisis estadístico de la I_{Ca} y la frecuencia de I_{TI} reveló que no había diferencias significativas en los pacientes con FA paroxística y que no había interacción entre el sexo y la FA paroxística, por ello se decidió no incluir este grupo de pacientes en el análisis final. Sin embargo, hay que destacar que el post-test de comparación múltiple mostró que la frecuencia de I_{TI} en mujeres con FA paroxística era comparable a la de mujeres con FA permanente y significativamente superior a la frecuencia de hombres y mujeres sin FA.

Efecto diferencial del sexo y terapias farmacológicas dirigidas

El estudio incluido en el Capítulo IV demostró que la I_{Ca} sólo se vio reducida en hombres con FA; mientras que permitió observar una mayor incidencia de I_{TI} y despolarizaciones espontáneas de la membrana únicamente en mujeres, exacerbándose en aquellas con FA. Al analizar los mecanismos subyacentes que estaban detrás de estos hallazgos diferenciales, la reducción de la I_{Ca} apreciada en hombres no se pudo asociar a una disminución en la expresión de Cav1.2, sugiriendo que podría deberse a otros factores como el estrés oxidativo o la alteración de la subunidad accesoria $Ca_v\beta_2$. En cambio, en las mujeres con FA el incremento en las liberaciones espontáneas de Ca^{2+} del RS estaba ligado a un incremento en la fosforilación del RyR2 en su residuo ser2808. Además, se demostró que la prevención de la activación de los receptores A_{2A} con ADA (2u/mL) o el tratamiento de los pacientes con β -bloqueantes fueron capaces de reducir la frecuencia de I_{TI} en mujeres con FA hasta niveles observados en pacientes sin FA.

Así, este estudio apunta que las terapias dirigidas a Ca_vB2 que han mostrado ser efectivas en el restablecimiento de la I_{Ca} en corazones enfermos (253), podrían ser eficaces en los hombres con FA. Sin embargo, las terapias que tengan como objetivo modular las liberaciones espontáneas de calcio o las despolarizaciones de membrana (5,7,175,197), serían más efectivas en mujeres con FA.

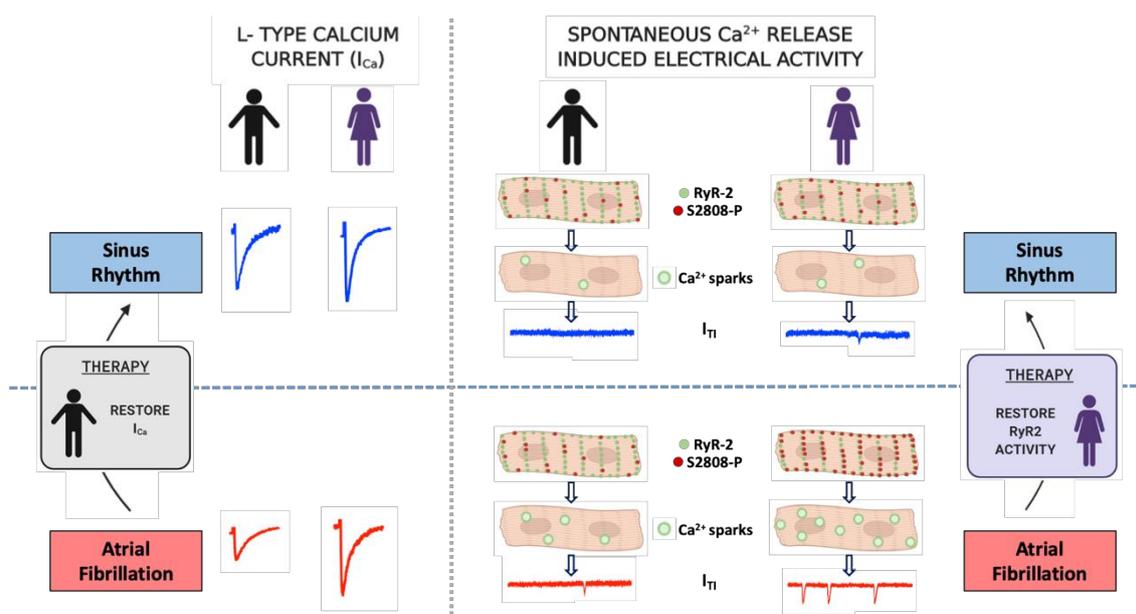


Figura 3. Resumen gráfico de los principales hallazgos del estudio del Capítulo IV.

No obstante, hay que tener en cuenta que los pacientes tratados con β -bloqueantes siguen presentando FA a pesar de la baja frecuencia de I_{TI} , lo que podría sugerir que la elevada frecuencia de I_{TI} no es la causa, sino la consecuencia de la FA. Sin embargo, como ya hemos visto en el [Capítulo II](#) los pacientes portadores de las variantes de riesgo en rs2200733, rs13143308 y rs10033464 de 4q25 presentan un incremento de la frecuencia de I_{TI} que precede al desarrollo de FA. Esto a su vez sugiere que la supresión de I_{TI} con β -bloqueantes podría prevenir o retrasar el inicio de FA en los pacientes propensos a presentar actividad ectópica inducida por liberación de calcio. Por el contrario, los β -bloqueantes podrían ser menos efectivos en pacientes en los que el mecanismo subyacente fuese la fibrosis auricular (257) o la disfunción de algún canal iónico no relacionado con la liberación espontánea de calcio (258).

Efecto diferencial del sexo y de las variantes de riesgo asociadas a FA y su posible interacción

Los estudios incluidos en esta tesis demuestran que, a parte de los factores clínicos relacionados previamente con la FA, el sexo y la presencia de variantes de riesgo serían otros factores que habría que tener en cuenta a la hora de valorar el efecto y a la hora de establecer una terapia farmacológica efectiva. Además, aunque habría que seguir analizando en profundidad los mecanismos subyacentes, aparentemente parece que la presencia de las diferentes variantes de riesgo, así como el efecto del sexo estarían asociados a mecanismos moleculares distintos. Por lo que esto iría de acuerdo con la hipótesis del estudio, que postulaba que la asociación específica de los diferentes SNPs con mecanismos moleculares y consecuencias electrofisiológicas concretas podría ser utilizada como biomarcador para la prevención del desarrollo de FA, así como para el tratamiento personalizado de pacientes teniendo en cuenta el efecto del sexo.

Limitaciones del estudio

Una limitación de este estudio es el bajo rendimiento de miocitos auriculares sanos que se obtiene de las pequeñas muestras de aurícula humana, cosa que limita el número de experimentos electrofisiológicos que se pueden llevar a cabo por cada paciente. Por tanto,

las mediciones individuales de cada paciente podrían no ser siempre representativas, aunque anteriormente encontramos que la variación entre muestras de un mismo paciente era significativamente menor que entre muestras de diferentes pacientes en una población de estudio (4).

Por otro lado, las muestras de este estudio son únicamente de aurícula derecha y, por tanto, no podemos concluir que todos los hallazgos encontrados en este estudio también sean aplicables a la aurícula izquierda. No obstante, la extracción de muestras de la aurícula izquierda para el aislamiento de miocitos solamente está éticamente justificada en un número limitado de casos como en las cirugías de válvula mitral. Normalmente, en este tipo de patología, la aurícula izquierda suele estar dilatada, y ya se ha demostrado que esto puede producir alteraciones en la homeostasis del calcio (162). En consecuencia, los análisis electrofisiológicos de los miocitos de pacientes que presentan la enfermedad o no, sólo son realistas en la aurícula derecha.

Debido a que el efecto de los SNPs asociados a FA es moderado, la cantidad de pacientes que se requieren para establecer asociaciones fiables es muy elevada y el p-valor para considerar que un SNP está ligado a una enfermedad en los estudios de GWAS se ha fijado en 5×10^{-8} (10). Por ello, con los pacientes incluidos en nuestro estudio no podemos asociar ninguna de las variantes a la FA. Sin embargo, las frecuencias del alelo de riesgo en nuestra población de estudio se asemejan a datos de estudios anteriores con un tamaño de la muestra más grande (135,170). Además, el Laboratory for Molecular Cardiology de la Universidad de Copenhagen con el que colaboramos, y el que se ha encargado de genotipar las muestras, también nos ha confirmado que esta asociación es significativa con los 150.000 pacientes que tiene en su base de datos. Por tanto, la explicación de que en nuestra población de estudio no hayamos podido asociar ninguna variante a la FA radica en que el número de pacientes de nuestro estudio es muy pequeño en comparación al elevado número de pacientes que incluyen los estudios a los que se hace referencia. Además, nuestro objetivo principal es estudiar los efectos funcionales de las variantes que ya se han asociado a un mayor riesgo de padecer FA.

Aún así, debido a las limitaciones por la pandemia durante el último año, se requerirían más estudios con un mayor número de pacientes para llegar a conclusiones firmes sobre algunos de los efectos de las variantes de riesgo de 4q25 y 1q21 sobre la homeostasis del calcio. Como se ha podido demostrar en este estudio, hay que tener en cuenta múltiples factores que pueden influir en el efecto observado para ver el efecto neto de una variante.

Esto a la vez requiere estudios con más pacientes, para que el número de pacientes de cada grupo sea suficiente para poder extraer conclusiones estadísticamente sólidas.

Finalmente, también se requerirían más estudios con un mayor número de pacientes para el estudio del Capítulo IV para poder llegar a extraer conclusiones sólidas sobre algunos de los efectos del sexo en los pacientes con o sin FA donde el efecto es menor. Por ejemplo, se esperaría que el tratamiento con β -bloqueantes redujese el impacto del sexo sobre la fosforilación del RyR2 en ser2808 en pacientes sin FA pero se necesitaría un mayor número de pacientes para poder tener un mayor poder estadístico. Lo mismo se podría aplicar a la influencia del sexo sobre los pacientes con FA paroxística, que ya se ha asociado previamente a alteraciones en la homeostasis del calcio diferentes a las de los pacientes con FA permanente (196). De la misma forma, las comparaciones entre barras mostraron una reducción de la amplitud de la I_{Ca} en hombres con FA, aunque no hubo interacción entre el sexo, la FA y la amplitud de la I_{Ca} , lo que podría ser debido al pequeño número de pacientes con FA comparado con los pacientes sin FA.

Perspectivas futuras

Se van a seguir realizando experimentos para poder asociar los mecanismos subyacentes detrás de las alteraciones apreciadas en estos estudios. Para ello hace falta realizar experimentos adicionales para comprobar la expresión o fosforilación de diferentes proteínas, como por ejemplo la expresión de los canales SK3, la fosforilación de $Ca_v1.2$ o de PLB.

Otro objetivo para el futuro es seguir realizando experimentos para valorar el efecto sumatorio producido por la presencia de la variante de riesgo en rs13143308 de 4q25 junto a la variante de riesgo en rs13376333 de 1q21, que podría ser crítico. Por un lado, tendríamos la variante de riesgo rs13143308 que incrementa la frecuencia de I_{TI} que a su vez puede facilitar las despolarizaciones espontáneas de la membrana, y por otro lado la variante de riesgo en rs13376333 que al reducir la función del canal SK3 podría retrasar la repolarización y facilitar la producción de eventos arritmogénicos.

Además, este estudio ha demostrado que el sexo es otro factor más que hay que tener muy presente a la hora de tratar los resultados, al igual que se tiene en cuenta la presencia de enfermedad de válvula mitral, la edad o la función del ventrículo izquierdo. Por ello, en el futuro queremos valorar el efecto de las variantes de riesgo de 4q25 y 1q21 teniendo en

cuenta el sexo, así como la interacción con otras variantes que cada vez van cobrando más importancia.

La asociación de diferentes variantes 4q25 a diferentes alteraciones funcionales de la homeostasis del calcio descritas en esta tesis sugiere que sería importante investigar el impacto funcional de múltiples variantes de riesgo que afecten de forma directa o indirecta la homeostasis del calcio y la actividad eléctrica. Será de especial interés identificar efectos sinérgicos y antagonistas entre las variantes descritas aquí y las variantes asociadas a la FA, descritas más recientemente, que afectan a PDE4, CAMK2D, CASQ2 y KCNN2.

CONCLUSIONES

1. Las variantes de riesgo de la región 4q25 asociadas a FA tienen un efecto diferencial sobre la regulación del calcio intracelular en función de su localización.

- Los pacientes portadores de la variante de riesgo en rs1448818, que se encuentra en el extremo más próximo a PITX2, presentan una reducción de la I_{Ca} que favorecería un acortamiento del periodo refractario y la reentrada eléctrica.
- Por otro lado, los pacientes portadores de las variantes de riesgo en rs2200733, rs13143308 o rs10033464, situadas a unas 150 kb de PITX2, presentan un incremento en la frecuencia de I_{TI} que favorecería las despolarizaciones espontáneas de la membrana y actividad ectópica.

Esto sugiere que la elección del tratamiento para prevenir o tratar la FA debería tener en cuenta las variantes de riesgo que presenta el paciente, ya que sería beneficioso restaurar la I_{Ca} en portadores de rs1448818 y reducir la liberación espontánea de calcio en portadores de rs13143308.

2. Las alteraciones en la homeostasis del calcio modifican la corriente SK sensible a apamina.

- Así, la reducción de la I_{Ca} observada en pacientes con FA o en portadores de la variante de riesgo en rs1448818 reduce la corriente SK sensible a apamina.
- Por otro lado, la variante de riesgo rs13376333 de la región 1q21, ubicada en el intrón 1 del gen KCNN3, también reduce la corriente SK sensible a apamina.
- Los efectos de las variantes de riesgo rs1448818 y rs13376333 no son complementarios.

Estas reducciones de la corriente SK3 retrasarían la repolarización de despolarizaciones espontáneas de membrana, facilitando la inducción de potenciales de acción espontáneos y arritmias inducidas por actividad ectópica. Por tanto, la restauración de la función de los canales SK3 podría ser una terapia farmacológica específica para la prevención o el tratamiento de los portadores de la variante de riesgo en rs13376333.

3. El sexo es un factor a tener en cuenta ya que tiene un efecto diferencial sobre la I_{Ca} y la frecuencia de I_{TI} en miocitos auriculares de pacientes con FA.

- La I_{Ca} sólo se ve reducida en hombres con FA
- La incidencia de I_{T1} y despolarizaciones espontáneas de la membrana es mayor únicamente en mujeres.

Estos resultados sugieren que las terapias dirigidas a reestablecer la I_{Ca} serían más efectivas en hombres con FA, mientras que las terapias dirigidas a reestablecer la actividad del RyR2 serían más efectivas en mujeres con FA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Camm AJ, Lip GYH, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2012;33(21):2719-47.
2. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205.
3. Wijffels MCEF, Kirchhof CJHJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. *Circulation*. 1995;92(7):1954-68.
4. Hove-Madsen L, Llach A, Bayes-Genís A, Roura S, Font ER, Arís A, et al. Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation*. 2004;110(11):1358-63.
5. Llach A, Molina CE, Prat-Vidal C, Fernandes J, Casad V, Ciruela F, et al. Abnormal calcium handling in atrial fibrillation is linked to up-regulation of adenosine A_{2A} receptors. *Eur Heart J*. 2011;32(6):721-9.
6. Vest JA, Wehrens XHT, Reiken SR, Lehnart SE, Dobrev D, Chandra P, et al. Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation. *Circulation*. 2005;111(16):2025-32.
7. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, et al. CaMKII-Dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res*. 2010;106(6):1134-44.
8. Li N, Chiang DY, Wang S, Wang Q, Sun L, Voigt N, et al. Ryanodine receptor-mediated calcium leak drives progressive development of an atrial fibrillation substrate in a transgenic mouse model. *Circulation*. 2014;129(12):1276-85.
9. Mahida S, Lubitz SA, Rienstra M, Milan DJ, Ellinor PT. Monogenic atrial fibrillation as pathophysiological paradigms. *Cardiovasc Res*. 2011;89(4):692-700.
10. Sinner MF, Ellinor PT, Meitinger T, Benjamin EJ, Kääb S. Genome-wide association studies of atrial fibrillation: Past, present, and future. *Cardiovasc Res*. 2011;89(4):701-9.
11. Liu X, Wang F, Knight AC, Zhao J, Xiao J. Common variants for atrial fibrillation: Results from genome-wide association studies. *Hum Genet*. 2012;131(1):33-9.
12. Ellinor PT, Lunetta KL, Albert CM, Glazer NL, Ritchie MD, Smith A V., et al. Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation. *Nat Genet*. 2012;44(6):670-5.

13. Herraiz-Martínez A, Llach A, Tarifa C, Gandía J, Jiménez-Sabado V, Lozano-Velasco E, et al. The 4q25 variant rs13143308T links risk of atrial fibrillation to defective calcium homeostasis. *Cardiovasc Res.* 2019;115(3):578-89.
14. Silverthorn DU. *Fisiología Humana. Un enfoque integrado.* 4ª edición. Editorial Médica Panamericana; 2007.
15. Hall JE. *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica.* 13.ª ed. ELSEVIER; 2016.
16. Donald M. Bers. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force.* 2nd editio. Kluwer Academic Press; 2001. 1-446 p.
17. Hoekstra M, Mummery CL, Wilde AAM, Bezzina CR, Verkerk AO. Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes as models for cardiac arrhythmias. *Front Physiol.* 2012;3:1-14.
18. Kohajda Z, Loewe A, Tóth N, Varró A, Nagy N. The Cardiac Pacemaker Story—Fundamental Role of the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger in Spontaneous Automaticity. *Front Pharmacol.* 2020;11:1-25.
19. Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker («funny») current. *Pharmacol Ther.* 2005;107(1):59-79.
20. Joung B, Ogawa M, Lin SF, Chen PS. The calcium and voltage clocks in sinoatrial node automaticity. *Korean Circ J.* 2009;39(6):217-22.
21. Milanesi R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscione T, DiFrancesco D. Familial Sinus Bradycardia Associated with a Mutation in the Cardiac Pacemaker Channel. *N Engl J Med.* 2006;354(2):151-7.
22. DiFrancesco D. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res.* 2006;53(5):399-406.
23. Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H, et al. Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation.* 2007;116(5):463-70.
24. Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial Nodal Cell Ryanodine Receptor and Na⁺-Ca²⁺ exchanger molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res.* 2001;88:1254-8.

25. Monfredi O, Maltseva LA, Spurgeon HA, Boyett MR, Lakatta EG, Maltsev VA. Beat-to-Beat Variation in Periodicity of Local Calcium Releases Contributes to Intrinsic Variations of Spontaneous Cycle Length in Isolated Single Sinoatrial Node Cells. *PLoS One*. 2013;8(6):1-13.
26. Vinogradova TM, Lyashkov AE, Zhu W, Ruknudin AM, Sirenko S, Yang D, et al. High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca²⁺ store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. *Circ Res*. 2006;98(4):505-14.
27. Bhuiyan ZA, Van Den Berg MP, Van Tintelen JP, Bink-Boelkens MTE, Wiesfeld ACP, Alders M, et al. Expanding spectrum of human RYR2-related disease: New electrocardiographic, structural, and genetic features. *Circulation*. 2007;116(14):1569-76.
28. Maltsev VA, Vinogradova TM, Lakatta EG. The emergence of a general theory of the initiation and strength of the heartbeat. *J Pharmacol Sci*. 2006;100(5):338-69.
29. Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. A coupled system of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ Res*. 2010;106(4):659-73.
30. Maltsev VA, Lakatta EG. Synergism of coupled subsarcolemmal Ca²⁺ clocks and sarcolemmal voltage clocks confers robust and flexible pacemaker function in a novel pacemaker cell model. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2009;296(3):594-615.
31. Brandenburg S, Kohl T, Williams GSB, Gusev K, Wagner E, Rog-zielinska EA, et al. Axial tubule junctions control rapid calcium signaling in atria. *J Clin Invest*. 2016;126(10):3999-4015.
32. Brette F, Orchard C. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res*. 2003;92(11):1182-92.
33. Levin KR, Page E. Quantitative studies on plasmalemmal folds and caveolae of rabbit ventricular myocardial cells. *Circ Res*. 1980;46(2):244-55.
34. Anderson RGW. Caveolae: Where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(23):10909-13.
35. Bhogal N, Hasan A, Gorelik J. The Development of Compartmentation of cAMP Signaling in Cardiomyocytes: The Role of T-Tubules and Caveolae Microdomains. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2018;5(2):25.

36. Ringer S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol.* 1883;4(1):29-42.
37. Fabiato A, Fabiato F. Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemmas. *Circ Res.* 1972;31(3):293-307.
38. Fearnley CJ, Llewelyn Roderick H, Bootman MD. Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(11).
39. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol (Cell Physiol 14).* 1983;245:C1-14.
40. Beeler G., Reuter H. The relation between membrane potential, membrane currents and activation of contraction in ventricular myocardial fibers. *J Physiol.* 1970;211-29.
41. Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells: Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol.* 1985;86(1):1-30.
42. Hirano Y, Fozzard HA, January C. Characteristics of L- and T-type Ca²⁺ currents in canine cardiac Purkinje cells. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;34(8):919-39.
43. Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol.* 1988;395(1):233-53.
44. Wu J., Lipsius S. Effects of extracellular Mg²⁺ on T- and L-type Ca²⁺ currents in single atrial myocytes. *Am J physiology.* 1990;259(6):H1842-50.
45. McDonald T., Pelzer S, Trautwein W, Pelzer D. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1994;74(2):365-507.
46. 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;2(11):1-21.
47. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: A multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 2002;32(5-6):235-49.
48. Qin J, Valle G, Nani A, Nori A, Rizzi N, Priori SG, et al. Luminal Ca²⁺ regulation of single cardiac ryanodine receptors: Insights provided by calsequestrin and its mutants. *J Gen Physiol.* 2008;131(4):325-34.
49. Györke S, Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res.* 2008;77(2):245-55.

-
50. Wei J, Yao J, Belke D, Guo W, Zhong X, Sun B, et al. Ca²⁺-CaM Dependent Inactivation of RyR2 Underlies Ca²⁺ Alternans in Intact Heart. *Circ Res.* 2021;128:E63-83.
 51. Maier LS, Bers DM. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007;73(4):631-40.
 52. Jeyakumar LH, Ballester L, Cheng DS, McIntyre JO, Chang P, Olivey HE, et al. FBP binding characteristics of cardiac microsomes from diverse vertebrates. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281(4):979-86.
 53. Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(2):417-29.
 54. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts. *Cell.* 2000;101(4):365-76.
 55. Wehrens XHT, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, et al. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell.* 2003;113(7):829-40.
 56. Lokuta AJ, Meyers MB, Sander PR, Fishman GI, Valdivia HH. Modulation of cardiac ryanodine receptors by Sorcin. *J Biol Chem [Internet].* 1997;272(40):25333-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.40.25333>
 57. Xiao B, Zhong G, Obayashi M, Yang D, Chen K, Walsh MP, et al. Ser-2030, but not Ser-2808, is the major phosphorylation site in cardiac ryanodine receptors responding to protein kinase A activation upon β -adrenergic stimulation in normal and failing hearts. *Biochem J.* 2006;396(1):7-16.
 58. Lehnart SE, Wehrens XHT, Reiken S, Warrier S, Belevych AE, Harvey RD, et al. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell.* 2005;123(1):25-35.
 59. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, et al. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: A novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol.* 2001;153(4):699-708.
 60. Díaz ME, Graham HK, O'Neill SC, Trafford AW, Eisner DA. The control of sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac muscle. *Cell Calcium.* 2005;38(3-4 SPEC. ISS.):391-6.
-

61. Jiang D, Wang R, Xiao B, Kong H, Hunt DJ, Choi P, et al. Enhanced store overload-induced Ca²⁺ release and channel sensitivity to luminal Ca²⁺ activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res*. 2005;97:1173-81.
62. Priori S, Chen SW. Inherited dysfunction of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Handling and Arrhythmogenesis. *Circ Res*. 2011;108(7):871-83.
63. Shannon TR, Bers DM. Integrated Ca²⁺ management in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1015:28-38.
64. Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem*. 1992;267(20):14483-9.
65. Brini M, Carafoli E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev*. 2009;89(4):1341-78.
66. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: A crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(7):566-77.
67. Kimura Y, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH. Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. *J Biol Chem* [Internet]. 1997;272(24):15061-4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.24.15061>
68. Simmerman HKB, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR. Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem*. 1986;261(28):13333-41.
69. Narayanan N, Xu A. Phosphorylation and regulation of the Ca²⁺-pumping ATPase in cardiac sarcoplasmic reticulum by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Basic Res Cardiol*. 1997;92:25-35.
70. Xu A, Narayanan N. Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of the Ca²⁺ ATPase, uncoupled from phospholamban, stimulates Ca²⁺-pumping in native cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;258(1):66-72.
71. Toyofuku T, Kurzydowski K, Narayanan N, MacLennan DH. Identification of Ser38 as the site in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase that is phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1994;269(42):26492-6.

-
72. Bridge JHB, Smolley JR, Spitzer KW. Associated with ICa and INa-Ca in Cardiac Myocytes. *Science* (80-). 1990;248:376-8.
 73. Hilgemann DW, Matsuoka S, Nagel GA, Collins A. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange: Sodium-dependent inactivation. *J Gen Physiol*. 1992;100(6):905-32.
 74. Hilgemann D. Regulation and deregulation of cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches. *Nature*. 1990;344:242-5.
 75. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:23-49.
 76. Iwamoto T, Pan Y, Wakabayashi S, Imagawa T, Yamanaka HI, Shigekawa M. Phosphorylation-dependent regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger via protein kinase C. *J Biol Chem* [Internet]. 1996;271(23):13609-15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.23.13609>
 77. Ruknudin A, He S, Lederer WJ, Schulze DH. Functional differences between cardiac and renal isoforms of the rat Na⁺-Ca²⁺ exchanger NCX1 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. 2000;529(3):599-610.
 78. Ahlers BA, Zhang XQ, Moorman JR, Rothblum LI, Carl LL, Song J, et al. Identification of an endogenous inhibitor of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger, phospholemman. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(20):19875-82. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M414703200>
 79. Cheung JY, Rothblum LI, Moorman JR, Tucker AL, Song J, Ahlers BA, et al. Regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger by phospholemman. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1099:119-34.
 80. Schulze DH, Muqhal M, Lederer WJ, Ruknudin AM. Sodium/calcium exchanger (NCX1) macromolecular complex. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(31):28849-55. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M300754200>
 81. Carafoli E, Stauffer T. The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity and tissue specificity of isoform expression. *Dev Neurobiol*. 1994;25(3):312-24.
 82. Caroni P, Carafoli E. An ATP-dependent Ca²⁺ pumping system in dog heart sarcolemma. *Nature*. 1980;283:765-7.
-

83. Gatto C, Hale CC, Xu W, Milanick MA. Eosin, a Potent Inhibitor of the Plasma Membrane Ca Pump, Does Not Inhibit the Cardiac Na-Ca Exchanger. *Biochemistry*. 1995;34(3):965-72.
84. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*. 1994;476(2):279-93.
85. Bassani RA, Bassani JWM, Bers DM. Relaxation in ferret ventricular myocytes: role of sarcolemmal Ca-ATPase. *Pflügers Arch*. 1995;430:573-8.
86. Dibb KM, Rueckschloss U, Eisner DA, Isenberg G, Trafford AW. Mechanisms underlying enhanced cardiac excitation contraction coupling observed in the senescent sheep myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(6):1171-81.
87. Choi HS, Eisner DA. The role of sarcolemmal Ca²⁺-ATPase in the regulation of resting calcium concentration in rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 1999;515(1):109-18.
88. Mackiewicz U, Lewartowski B. Temperature dependent contribution of Ca²⁺ transporters to relaxation in cardiac myocytes: Important role of sarcolemmal Ca²⁺-ATPase. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57(1):3-15.
89. Gao P, Yan Z, Zhu Z. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Cardiovascular Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:1-17.
90. Laude AJ, Simpson AWM. Compartmentalized signalling: Ca²⁺ compartments, microdomains and the many facets of Ca²⁺ signalling. *FEBS J*. 2009;276(7):1800-16.
91. Eisner V, Csordás G, Hajnóczky G. Interactions between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle-pivotal roles in Ca²⁺ and reactive oxygen species signaling. *J Cell Sci*. 2013;126(14):2965-78.
92. Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol*. 2006;175(6):901-11.
93. De Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 2008;456:605-10.
94. Lympelopoulou A, Rengo G, Koch WJ. The Adrenergic Nervous System in Heart Failure: Pathophysiology and Therapy. 2013;113(6):1-24.
95. R Hatton, A Cvjeticanin AL. The adrenergic system of the adrenal glands as a remote control of cardiac function. *J Cardiovasc Dis*. 2015;3(5):394-7.

-
96. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 1994;46(2):121-36.
 97. 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* [Internet]. 2009;54(19):1747-62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.05.015>
 98. Zhao XL, Gutierrez LM, Chang CF, Hosey MM. The alpha-1 subunit of skeletal muscle L-type Ca²⁺ channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;198(1):166-73.
 99. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature.* 1998;393:587-91.
 100. Sulankhe P V., Vo XT. Regulation of phospholamban and troponin I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and colinergic stimuli. *Mol Cell Biochem.* 1995;149:103-26.
 101. Marx, Steven O. and Marks AR. Dysfunctional ryanodine receptors in the heart: New insights into complex cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;58:225-31.
 102. Shannon R, Chaudhry M. Effect of α 1-adrenergic receptors in cardiac pathophysiology. *Am Heart J.* 2006;152(5):842-50.
 103. Philipp M, Brede M, Hein L. Physiological significance of alpha2-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;283:R287-95.
 104. Caulfield MP. Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther.* 1993;58(3):319-79.
 105. Norel X, Costantino M, Labat C, Gorenne I, Rossi F, Brink C. M1 and M3 muscarinic receptors in human pulmonary arteries. *Br J Pharmacol.* 1996;119:149-57.
 106. Tsai BM, Wang M, Turrentine MW, Mahomed Y, Brown JW, Meldrum DR. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in cardiothoracic surgery: Basic mechanisms to potential therapies. *Ann Thorac Surg.* 2004;78(1):360-8.
 107. Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev.* 1999;51(4):651-89.
-

108. Deighton N., Motomura S, Borquez D, Zerkowski HR, Doetsch N, Brodde O. Muscarinic cholinergic receptors in the human heart: demonstration, subclassification, and distribution. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol.* 1990;341:14-21.
109. Vanhoutte PM, Cohen RA. Effects of acetylcholine on the coronary artery. *Fed Proc.* 1984;43(14):2878-80.
110. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - An update. *Pharmacol Rev.* 2011;63(1):1-34.
111. Headrick JP, Peart JN, Reichelt ME, Haseler LJ. Adenosine and its receptors in the heart: Regulation, retaliation and adaptation. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2011;1808(5):1413-28. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.11.016>
112. Koeppen M, Eckle T, Eltzhig HK. Selective deletion of the A1 adenosine receptor abolishes heart-rate slowing effects of intravascular adenosine in vivo. *PLoS One.* 2009;4(8):1-9.
113. Hove-Madsen L, Prat-Vidal C, Llach A, Ciruela F, Casadó V, Lluís C, et al. Adenosine A2A receptors are expressed in human atrial myocytes and modulate spontaneous sarcoplasmic reticulum calcium release. *Cardiovasc Res.* 2006;72(2):292-302.
114. Bertolet BD, Hill JA, Kerensky RA, Belardinelli L. Myocardial infarction related atrial fibrillation: Role of endogenous adenosine. *Heart.* 1997;78(1):88-90.
115. Gaztañaga L, Marchlinski FE, Betensky BP. Mecanismos de las arritmias cardíacas. *Rev Esp Cardiol.* 2012;65(2):174-85.
116. Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest.* 2011;121(8):2955-68.
117. Dobrev D, Voigt N, Wehrens XHT. The ryanodine receptor channel as a molecular motif in atrial fibrillation: Pathophysiological and therapeutic implications. *Cardiovasc Res.* 2011;89(4):734-43.
118. MacLennan DH, Chen SRW. Store overload-induced Ca²⁺ release as a triggering mechanism for CPVT and MH episodes caused by mutations in RYR and CASQ genes. *J Physiol.* 2009;587(13):3113-5.
119. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 2002;415:219-26.

120. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2008;1(1):62-73.
121. Kozłowski D, Budrejko S, Lip GYH, Rysz J, Mikhailidis DP, Raczak G, et al. Lone atrial fibrillation: What do we know? *Heart*. 2010;96(7):498-503.
122. Nattel S. From guidelines to bench: Implications of unresolved clinical issues for basic investigations of atrial fibrillation mechanisms. *Can J Cardiol [Internet]*. 2011;27(1):19-26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2010.11.004>
123. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kléber AG, Lab MJ, Legato MJ, et al. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation*. 2001;103:769-77.
124. Mukamal KJ, Tolstrup JS, Friberg J, Jensen G, Grønþæk M. Alcohol consumption and risk of atrial fibrillation in men and women: The Copenhagen City Heart Study. *Circulation*. 2005;112(12):1736-42.
125. Auer J, Scheibner P, Mische T, Langsteger W, Eber O, Eber B. Subclinical hyperthyroidism as a risk factor for atrial fibrillation. *Am Heart J*. 2001;142(5):838-42.
126. Schoonderwoerd BA, Smit MD, Pen L, Van Gelder IC. New risk factors for atrial fibrillation: Causes of «not-so-lone atrial fibrillation». *Europace*. 2008;10(6):668-73.
127. Chou C-C, Chen P-S. New concepts in atrial fibrillation: neural mechanisms and calcium dynamics. *Cardiol Clin*. 2009;27(1):35-43.
128. Sabeh MK, MacRae CA. The genetics of atrial fibrillation. *Curr Opin Cardiol*. 2010;25(3):186-91.
129. Lubitz SA, Yin X, Fontes JD, Magnani JW, Reinstra M, Pai M, et al. Association between familial atrial fibrillation and risk of new-onset atrial fibrillation. *J Am Med Assoc*. 2010;304(20):2263-9.
130. Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, Holm H, Sigurdsson A, et al. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature*. 2007;448(7151):353-7.
131. Sinner MF, Tucker NR, Lunetta KL, Ozaki K, Smith JG, Trompet S, et al. Integrating genetic, transcriptional, and functional analyses to identify 5 novel genes for atrial fibrillation. *Circulation*. 2014;130(15):1225-35.
132. Nielsen JB, Fritsche LG, Zhou W, Teslovich TM, Holmen OL, Gustafsson S, et al. Genome-wide Study of Atrial Fibrillation Identifies Seven Risk Loci and Highlights

- Biological Pathways and Regulatory Elements Involved in Cardiac Development. *Am J Hum Genet.* 2018;102(1):103-15.
133. Christophersen IE, Rienstra M, Roselli C, Yin X, Geelhoed B, Barnard J, et al. Large-scale analyses of common and rare variants identify 12 new loci associated with atrial fibrillation. *Nat Genet.* 2017;49(6):946-52.
134. Roselli C, Chaffin MD, Weng LC, Aeschbacher S, Ahlberg G, Albert CM, et al. Multi-ethnic genome-wide association study for atrial fibrillation. *Nat Genet.* 2018;50(9):1225-33.
135. Lubitz SA, Lunetta KL, Lin H, Arking DE, Trompet S, Li G, et al. Novel genetic markers associate with atrial fibrillation risk in Europeans and Japanese. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(12):1200-10.
136. Campione M, Ros MA, Icardo JM, Piedra E, Christoffels VM, Schweickert A, et al. Pitx2 expression defines a left cardiac lineage of cells: Evidence for atrial and ventricular molecular isomerism in the iv/iv mice. *Dev Biol.* 2001;231(1):252-64.
137. Franco D, Campione M. The role of Pitx2 during cardiac development: Linking left-right signaling and congenital heart diseases. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13(4):157-63.
138. Mommersteeg MTM, Hoogaars WMH, Prall OWJ, De Gier-De Vries C, Wiese C, Clout DEW, et al. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res.* 2007;100(3):354-62.
139. Mommersteeg MTM, Brown NA, Prall OWJ, De Gier-De Vries C, Harvey RP, Moorman AFM, et al. Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circ Res.* 2007;101(9):902-9.
140. Wang J, Klysik E, Sood S, Johnson RL, Wehrens XHT, Martin JF. Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9753-8.
141. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, et al. Spontaneous Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Impulses Originating in the Pulmonary Veins. *N Engl J Med.* 1998;339(10):659-66.
142. Calkins H, Brugada J, Packer DL, Cappato R, Chen SA, Crijns HJG, et al. HRS/EHRA/ECAS expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation: Recommendations for personnel, policy, procedures and follow-up. A report of the Heart Rhythm Society (HRS) Task Force on catheter and surgical ablation

- of . *Europace*. 2007;9(6):335-79.
143. Kirchhof P, Kahr PC, Kaese S, Piccini I, Vokshi I, Scheld HH, et al. PITX2c is expressed in the adult left atrium, and reducing Pitx2c expression promotes atrial fibrillation inducibility and complex changes in gene expression. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:123-33.
 144. Chinchilla A, Daimi H, Lozano-Velasco E, Dominguez JN, Caballero R, Delpo E, et al. PITX2 insufficiency leads to atrial electrical and structural remodeling linked to arrhythmogenesis. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4(3):269-79.
 145. Lozano-Velasco E, Hernández-Torres F, Daimi H, Serra SA, Herraiz A, Hove-Madsen L, et al. Pitx2 impairs calcium handling in a dose-dependent manner by modulating Wnt signalling. *Cardiovasc Res*. 2016;109(1):55-66.
 146. Shoemaker MB, Bollmann A, Lubitz SA, Ueberham L, Saini H, Montgomery J, et al. Common genetic variants and response to atrial fibrillation ablation. *Circ Arrhythmia Electrophysiol*. 2015;8(2):296-302.
 147. He J, Zhu W, Yu Y, Hu J, Hong K. Variant rs2200733 and rs10033464 on chromosome 4q25 are associated with increased risk of atrial fibrillation after catheter ablation: Evidence from a meta-analysis. *Cardiol J*. 2018;25(5):628-38.
 148. Parvez B, Vanglio J, Rowan S, Muhammad R, Kucera G, Stubblefield T, et al. Symptomatic response to antiarrhythmic drug therapy is modulated by a common single nucleotide polymorphism in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(6):539-45.
 149. Ellinor PT, Lunetta KL, Glazer NL, Pfeufer A, Alonso A, Chung MK, et al. Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation. *Nat Genet*. 2010;42(3):240-4.
 150. Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, Xu D, Zhang Y, Rodriguez J, et al. Molecular identification and functional roles of a Ca(2+)-activated K⁺ channel in human and mouse hearts. *J Biol Chem*. 2003;278(49):49085-94.
 151. Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Lu L, Sharma D, Zhang Z, et al. Differential expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2005;289:2714-23.
 152. Skibsbye L, Poulet C, Diness JG, Bentzen BH, Yuan L, Kappert U, et al. Small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atria. *Cardiovasc Res*. 2014;103(1):156-67.

153. Ozgen N, Dun W, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Hirose M, Duffy HS, et al. Early electrical remodeling in rabbit pulmonary vein results from trafficking of intracellular SK2 channels to membrane sites. *Cardiovasc Res.* 2007;75(4):758-69.
154. Monaghan AS, Benton DCH, Bahia PK, Hosseini R, Shah YA, Haylett DG, et al. The SK3 Subunit of Small Conductance Ca²⁺-activated K⁺ Channels Interacts with Both SK1 and SK2 Subunits in a Heterologous Expression System. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;279(2):1003-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M308070200>
155. Zhang Q, Timofeyev V, Lu L, Li N, Singapuri A, Long MK, et al. Functional roles of Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK2) in atrioventricular nodes. *Circ Res.* 2008;102(4):465-71.
156. Taylor MS, Bonev AD, Gross TP, Eckman DM, Brayden JE, Bond CT, et al. Altered expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circ Res.* 2003;93(2):124-31.
157. Diness JG, Sørensen US, Nissen JD, Al-Shahib B, Jespersen T, Grønnet M, et al. Inhibition of small-conductance ca²⁺-activated k⁺ channels terminates and protects against atrial fibrillation. *Circ Arrhythmia Electrophysiol.* 2010;3(4):380-90.
158. Peng J, Raddatz K, Molkentin JD, Wu Y, Labeit S, Granzier H, et al. Cardiac hypertrophy and reduced contractility in hearts deficient in the titin kinase region. *Circulation.* 2007;115(6):743-51.
159. Bentzen BH, Bomholtz SH, Simó-Vicens R, Folkersen L, Abildgaard L, Speerschnieder T, et al. Mechanisms of Action of the KCa₂-Negative Modulator AP30663, a Novel Compound in Development for Treatment of Atrial Fibrillation in Man. *Front Pharmacol.* 2020;11(May):1-11.
160. Diness JG, Kirchhoff JE, Speerschnieder T, Abildgaard L, Edvardsson N, Sørensen US, et al. The KCa₂ Channel Inhibitor AP30663 Selectively Increases Atrial Refractoriness, Converts Vernakalant-Resistant Atrial Fibrillation and Prevents Its Reinduction in Conscious Pigs. *Front Pharmacol.* 2020;11(February):1-9.
161. Haugaard MM, Hesselkilde EZ, Pehrson S, Carstensen H, Flethøj M, Præstegaard KF, et al. Pharmacologic inhibition of small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels by NS8593 reveals atrial antiarrhythmic potential in horses. *Heart Rhythm* [Internet]. 2015;12(4):825-35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hrthm.2014.12.028>

-
162. Dinanian S, Boixel C, Juin C, Hulot JS, Coulombe A, Rücker-Martin C, et al. Downregulation of the calcium current in human right atrial myocytes from patients in sinus rhythm but with a high risk of atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2008;29:1190-7.
 163. Herraiz-Martínez A, Tarifa C, Jiménez-Sábado V, Llach A, Godoy-Marín H, Colino H, et al. Influence of sex on intracellular calcium homeostasis in patients with atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2021;cvab127.
 164. Llach A, Molina CE, Fernandes J, Padró J, Cinca J, Hove-Madsen L. Sarcoplasmic reticulum and L-type Ca²⁺ channel activity regulate the beat-to-beat stability of calcium handling in human atrial myocytes. *J Physiol*. 2011;589(13):3247-62.
 165. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res*. 1999;85(5):428-36.
 166. Greiser M, Schotten U. Dynamic remodeling of intracellular Ca²⁺ signaling during atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2013;58(1):134-42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.12.020>
 167. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 1999;44(1):121-31.
 168. Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2001;52(2):226-35.
 169. Greiser M, Lederer WJ, Schotten U. Alterations of atrial Ca²⁺ handling as cause and consequence of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2011;89(4):722-33.
 170. Lubitz SA, Sinner MF, Lunetta KL, Makino S, Pfeufer A, Rahman R, et al. Independent susceptibility markers for atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Circulation*. 2010;122(10):976-84.
 171. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J*. 2016;37(38):2893-962.
 172. Wit AL, Boyden PA. Triggered activity and atrial fibrillation. *Hear Rhythm*. 2007;4(3 SUPPL.):S17-23.
 173. Corradi D. Atrial fibrillation from the pathologist's perspective. *Cardiovasc Pathol*. 2014;23(2):71-84.
-

174. Velagapudi P, Turagam MK, Leal MA, Kocheril AG. Atrial fibrosis: A risk stratifier for atrial fibrillation. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2013;11(2):155-60.
175. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, et al. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation.* 2012;125(17):2059-70.
176. Pang H, Ronderos R, Pérez-Riera AR, Femenía F, Baranchuk A. Reverse atrial electrical remodeling: A systematic review. *Cardiol J.* 2011;18(6):625-31.
177. Collins MM, Ahlberg G, Hansen CV, Guenther S, Marín-Juez R, Sokol AM, et al. Early sarcomere and metabolic defects in a zebrafish *pitx2c* cardiac arrhythmia model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(48):24115-21.
178. Godoy-Marín H, Duroux R, Jacobson KA, Soler C, Colino-Lage H, Jiménez-Sábado V, et al. Adenosine A_{2A} receptors are upregulated in peripheral blood mononuclear cells from atrial fibrillation patients. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):1-12.
179. Zhang X, Thai PN, Lieu DK, Chiamvimonvat N. Cardiac small-conductance calcium-activated potassium channels in health and disease. *Pflügers Arch.* 2021;473:477-89.
180. Tuteja D, Rafizadeh S, Timofeyev V, Wang S, Zhang Z, Li N, et al. Cardiac small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel subunits form heteromultimers via the coiled-coil domains in the C termini of the channels. *Circ Res.* 2010;107:851-9.
181. Adelman JP, Maylie J, Sah P. Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: Form and function. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:245-69.
182. Zhang XD, Coulibaly ZA, Chen WC, Ledford HA, Lee JH, Sirish P, et al. Coupling of SK channels, L-Type Ca²⁺ channels, and ryanodine receptors in cardiomyocytes. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8:1-13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22843-3>
183. Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, et al. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature.* 1998;395:503-7.
184. Mu YH, Zhao WC, Duan P, Chen Y, Zhao W Da, Wang Q, et al. RyR2 modulates a Ca²⁺-activated K⁺ current in mouse cardiac myocytes. *PLoS One.* 2014;9(4):1-8.

-
185. Terentyev D, Rochira JA, Terentyeva R, Roder K, Koren G, Li W. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release is both necessary and sufficient for SK channel activation in ventricular myocytes. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2014;306:738-46.
 186. Qi XY, Diness JG, Brundel BJM, Zhou XB, Naud P, Wu CT, et al. Role of small-conductance calcium-activated potassium channels in atrial electrophysiology and fibrillation in the dog. *Circulation*. 2014;129:430-40.
 187. Rafizadeh S, Zhang Z, Woltz RL, Kim HJ, Myers RE, Lu L, et al. Functional interaction with filamin A and intracellular Ca²⁺ enhance the surface membrane expression of a small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK2) channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(27):9989-94.
 188. Yu T, Deng C, Wu R, Guo H, Zheng S, Yu X, et al. Decreased expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels SK1 and SK2 in human chronic atrial fibrillation. *Life Sci* [Internet]. 2012;90:219-27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.11.008>
 189. Ko D, Rahman F, Schnabel RB, Yin X, Benjamin EJ, Christophersen IE. Atrial fibrillation in women: Epidemiology, pathophysiology, presentation, and prognosis. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13:321-32.
 190. Gowd B, Thompson PD. Effect of female sex on cardiac arrhythmias. *Cardiol Rev*. 2012;20(6):297-303.
 191. Humphries KH, Kerr CR, Connolly SJ, Klein G, Boone JA, Green M, et al. New-Onset Atrial Fibrillation. Sex differences in presentation, treatment, and outcome. *Circulation*. 2001;103:2365-70.
 192. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 1998;98:946-52.
 193. Ravens U. Sex differences in cardiac electrophysiology. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018;96:985-90.
 194. Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002;54(2):230-46.
 195. Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ. Electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation*. 1996;94(11):2968-74.

196. Voigt N, Heijman J, Wang Q, Chiang DY, Li N, Karck M, et al. Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 2014;129(2):145-56.
197. Reiken S, Wehrens XHT, Vest JA, Barbone A, Klotz S, Mancini D, et al. B-Blockers Restore Calcium Release Channel Function and Improve Cardiac Muscle Performance in Human Heart Failure. *Circulation*. 2003;107(19):2459-66.
198. Tucker NR, Clauss S, Ellinor PT. Common variation in atrial fibrillation: navigating the path from genetic association to mechanism. *Cardiovasc Res*. 2016;109:493-501.
199. Ye J, Tucker NR, Weng LC, Clauss S, Lubitz SA, Ellinor PT. A Functional Variant Associated with Atrial Fibrillation Regulates PITX2c Expression through TFAP2a. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2016;99:1281-91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.10.001>
200. Tamariz L, Balda J, Pareja D, Palacio A, Myerburg RJ, Conway D, et al. A systematic review of single nucleotide polymorphisms in sudden cardiac death. *Am J Cardiol*. 2019;123(12):1900-5.
201. Ahlberg G, Refsgaard L, Lundegaard PR, Andreassen L, Ranthe MF, Linscheid N, et al. Rare truncating variants in the sarcomeric protein titin associate with familial and early-onset atrial fibrillation. *Nat Commun*. 2018;9(1):1-11.
202. Van Der Werf C, Nederend I, Hofman N, Van Geloven N, Ebink C, Frohn-Mulder IME, et al. Familial evaluation in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia disease penetrance and expression in cardiac ryanodine receptor mutation-carrying relatives. *Circ Arrhythmia Electrophysiol*. 2012;5:748-56.
203. Rosenlund M, Berglind N, Gustavsson A, Reuterwall C, Hallqvist J, Nyberg F, et al. Environmental tobacco smoke and myocardial infarction among never-smokers in the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). *Epidemiology*. 2001;12:558-64.
204. Pérez-Hernández M, Matamoros M, Barana A, Amorós I, Gómez R, Núñez M, et al. Pitx2c increases in atrial myocytes from chronic atrial fibrillation patients enhancing IKs and decreasing ICa,L. *Cardiovasc Res*. 2016;109:431-41.
205. Hjalt TA, Semina E V. Current molecular understanding of Axenfeld-Rieger syndrome. *Expert Rev Mol Med*. 2005;7(25):1-17.
206. Aguirre LA, Alonso ME, Badía-Careaga C, Rollán I, Arias C, Fernández-Miñán A, et al. Long-range regulatory interactions at the 4q25 atrial fibrillation risk locus involve PITX2c

- and ENPEP. *BMC Biol.* 2015;13:1-13.
207. Martin RIR, Babaei MS, Choy MK, Owens WA, Chico TJA, Keenan D, et al. Genetic variants associated with risk of atrial fibrillation regulate expression of PITX2, CAV1, MYOZ1, C9orf3 and FANCC. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2015;85:207-14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.06.005>
208. Maier LS, Bers DM. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(8):919-39.
209. Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS, et al. Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca²⁺-ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban: An insight into the mechanism of atrial elect. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33(5):1231-7.
210. Brundel BJJM, Van Gelder IC, Henning RH, Tuinenburg AE, Deelman LE, Tieleman RG, et al. Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 1999;42(2):443-54.
211. Schotten U, Haase H, Frechen D, Greiser M, Stellbrink C, Vazquez-Jimenez JF, et al. The L-type Ca²⁺-channel subunits α 1C and β 2 are not downregulated in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35(5):437-43.
212. Balycheva M, Faggian G, Glukhov A V., Gorelik J. Microdomain-specific localization of functional ion channels in cardiomyocytes: an emerging concept of local regulation and remodelling. *Biophys Rev.* 2015;7:43-62.
213. El-Armouche A, Eschenhagen T. β -Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2009;14:225-41.
214. Christ T, Boknik P, Wöhrle S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF, et al. L-type Ca²⁺ current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation.* 2004;110:2651-7.
215. Xu H, Ginsburg KS, Hall DD, Zimmermann M, Stein IS, Zhang M, et al. Targeting of protein phosphatases PP2A and PP2B to the C-terminus of L-type calcium channel Cav1.2. *Biochemistry.* 2010;49(48):10298-307.
216. Klein G, Schröder F, Vogler D, Schaefer A, Haverich A, Schieffer B, et al. Increased open probability of single cardiac L-type calcium channels in patients with chronic atrial fibrillation: Role of phosphatase 2A. *Cardiovasc Res.* 2003;59:37-45.

217. DeGrande ST, Little SC, Nixon DJ, Wright P, Snyder J, Dun W, et al. Molecular mechanisms underlying cardiac protein phosphatase 2A regulation in heart. *J Biol Chem* [Internet]. 2013;288(2):1032-46. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.426957>
218. Molina CE, Leroy J, Richter W, Xie M, Scheitrum C, Lee IO, et al. Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(24):2182-90.
219. Van Wagoner DR. Electrophysiological remodeling in human atrial fibrillation. *PACE - Pacing Clin Electrophysiol*. 2003;26:1572-5.
220. Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Wagoner DR Van, et al. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation*. 2001;104:174-80.
221. Dudley SC, Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukai T, et al. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: Role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation*. 2005;112(9):1266-73.
222. Carnes CA, Chung MK, Nakayama T, Nakayama H, Baliga RS, Piao S, et al. Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res*. 2001;89(6).
223. Van Wagoner DR. Redox modulation of cardiac electrical activity. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001;12(2):183-4.
224. Carnes CA, Janssen PML, Ruehr ML, Nakayama H, Nakayama T, Haase H, et al. Atrial glutathione content, calcium current, and contractility. *J Biol Chem* [Internet]. 2007;282(38):28063-73. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M704893200>
225. Xie W, Santulli G, Reiken SR, Yuan Q, Osborne BW, Chen BX, et al. Mitochondrial oxidative stress promotes atrial fibrillation. *Sci Rep*. 2015;5:11427.
226. Chien AJ, Zhao X, Shirokov RE, Puri TS, Chang CF, Sun D, et al. Roles of a membrane-localized β subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* [Internet]. 1995;270(50):30036-44. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.50.30036>
227. Josephson IR, Varadi G. The β subunit increases Ca^{2+} currents and gating charge movements of human cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Biophys J*. 1996;70(3):1285-93.

-
228. Gonzalez-Gutierrez G, Miranda-Laferte E, Neely A, Hidalgo P. The Src homology 3 domain of the β -subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. *J Biol Chem* [Internet]. 2007;282(4):2156-62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M609071200>
229. Lukyanenko V, Viatchenko-Karpinski S, Smirnov A, Wiesner TF, Györke S. Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content and release by luminal Ca^{2+} -sensitive leak in rat ventricular myocytes. *Biophys J*. 2001;81:785-98.
230. Jiang D, Chen W, Wang R, Zhang L, Chen SRW. Loss of luminal Ca^{2+} activation in the cardiac ryanodine receptor is associated with ventricular fibrillation and sudden death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(46):18309-14.
231. Díaz ME, O'Neill SC, Eisner DA. Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content Fluctuation Is the Key to Cardiac Alternans. *Circ Res*. 2004;94:650-6.
232. Osterrieder W, Brum G, Hescheler J, Trautwein W, Flockerzi V, Hofmann F. Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca^{2+} current. Vol. 298, *Nature*. 1982. p. 576-8.
233. Catterall WA. Regulation of Cardiac Calcium Channels in the Fight-or-Flight Response. *Curr Mol Pharmacol*. 2015;8(1):12-21.
234. Yang L, Dai DF, Yuan C, Westenbroek RE, Yu H, West N, et al. Loss of β -adrenergic-stimulated phosphorylation of $\text{CaV}1.2$ channels on Ser1700 leads to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(49):E7976-85.
235. Heijman J, Voigt N, Wehrens XHT, Dobrev D. Calcium dysregulation in atrial fibrillation: The role of CaMKII. *Front Pharmacol*. 2014;5:1-10.
236. Heijman J, Ghezelbash S, Wehrens XH, Dobrev D. Serine/Threonine phosphatases in atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;103:110-20.
237. Wehrens XHT, Marks AR. Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(12):671-8.
238. Zima A V., Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res*. 2006;71:310-21.
239. Terentyev D, Györke I, Belevych AE, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y, et al. Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in chronic heart failure. *Circ Res*. 2008;103:1466-72.
-

240. Wakili R, Yeh YH, Qi XY, Greiser M, Chartier D, Nishida K, et al. Multiple potential molecular contributors to atrial hypocontractility caused by atrial tachycardia remodeling in dogs. *Circ Arrhythmia Electrophysiol.* 2010;3:530-41.
241. Greiser M, Neuberger H-R, Harks E, El-Armouche A, Boknik P, de Haan S, et al. 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;46(3):385-94.
242. Tessier S, Karczewski P, Krause EG, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M, et al. Regulation of the transient outward K⁺ current by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes. *Circ Res.* 1999;85:810-9.
243. Christ T, Engel A, Ravens U, Kaumann AJ. Cilostamide potentiates more the positive inotropic effects of (-)-adrenaline through β ₂-adrenoceptors than the effects of (-)-noradrenaline through β ₁-adrenoceptors in human atrial myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006;374:249-53.
244. Lu L, Timofeyev V, Li N, Rafizadeh S, Singapuri A, Harris TR, et al. α -Actinin2 cytoskeletal protein is required for the functional membrane localization of a Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK2 channel). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(43):18402-7.
245. Lu L, Sirish P, Zhang Z, Woltz RL, Li N, Timofeyev V, et al. Regulation of gene transcription by voltage-gated L-type calcium channel, Cav1.3. *J Biol Chem.* 2015;290(8):4663-76.
246. Allen D, Fakler B, Maylie J, Adelman JP. Organization and regulation of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel multiprotein complexes. *J Neurosci.* 2007;27(9):2369-76.
247. Fan HK, Luo TX, Zhao WD, Mu YH, Yang Y, Guo WJ, et al. Functional interaction of Junctophilin 2 with small-conductance Ca²⁺-activated potassium channel subtype 2(SK2) in mouse cardiac myocytes. *Acta Physiol.* 2018;222:e12986.
248. Herraiz-Martínez A, Álvarez-García J, Llach A, Molina CE, Fernandes J, Ferrero-Gregori A, et al. Ageing is associated with deterioration of calcium homeostasis in isolated human right atrial myocytes. *Cardiovasc Res.* 2015;106:76-86.
249. Molina CE, Abu-Taha IH, Wang Q, Roselló-Díez E, Kamler M, Nattel S, et al. Profibrotic, electrical, and calcium-handling remodeling of the atria in heart failure patients with and without atrial fibrillation. *Front Physiol.* 2018;9:1383.

-
250. Yang HY, Firth JM, Francis AJ, Alvarez-Laviada A, MacLeod KT. Effect of ovariectomy on intracellular Ca^{2+} regulation in Guinea pig cardiomyocytes. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2017;313:H1031-43.
251. Yaras N, Tuncay E, Purali N, Sahinoglu B, Vassort G, Turan B. Sex-related effects on diabetes-induced alterations in calcium release in the rat heart. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2007;293:H3584-92.
252. Bai CX, Kurokawa J, Tamagawa M, Nakaya H, Furukawa T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation*. 2005;112:1701-10.
253. Rusconi F, Ceriotti P, Miragoli M, Carullo P, Salvarani N, Rocchetti M, et al. Peptidomimetic Targeting of Cav β 2 Overcomes Dysregulation of the L-Type Calcium Channel Density and Recovers Cardiac Function. *Circulation*. 2016;134(7):534-46.
254. Shanmugam M, Molina CE, Gao S, Severac-Bastide R, Fischmeister R, Babu GJ. Decreased sarcolipin protein expression and enhanced sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} uptake in human atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2011;410:97-101. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.113>
255. Glukhov A V., Kalyanasundaram A, Lou Q, Hage LT, Hansen BJ, Belevych AE, et al. Calsequestrin 2 deletion causes sinoatrial node dysfunction and atrial arrhythmias associated with altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling and degenerative fibrosis within the mouse atrial pacemaker complex. *Eur Heart J*. 2015;36:686-97.
256. Lou Q, Belevych AE, Radwański PB, Liu B, Kalyanasundaram A, Knollmann BC, et al. Alternating membrane potential/calcium interplay underlies repetitive focal activity in a genetic model of calcium-dependent atrial arrhythmias. *J Physiol*. 2015;593(6):1443-58.
257. Reil JC, Hohl M, Selejan S, Lipp P, Drautz F, Kazakow A, et al. Aldosterone promotes atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2012;33:2098-108.
258. Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, et al. 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;55(21):2346-54.
-

ANEXO I

Influence of sex on intracellular calcium homoeostasis in patients with atrial fibrillation

Adela Herraiz-Martínez^{1,2†}, Carmen Tarifa^{1,2†}, Verónica Jiménez-Sábado ^{2,3†}, Anna Llach ², Hector Godoy-Marín^{4,5}, Hildegard Colino-Lage ^{1,2}, Carme Nolla-Colomer ⁶, Sergi Casabella-Ramon ^{1,2}, Paloma Izquierdo-Castro ^{1,2}, Iván Benítez ⁷, Raul Benítez ⁶, Elena Roselló-Díez ^{8,9}, Enrique Rodríguez-Font¹⁰, Xavier Viñolas ¹⁰, Francisco Ciruela ^{4,5}, Juan Cinca^{3,9,10}, and Leif Hove-Madsen ^{1,2,3*}

¹Department of Experimental Pathology, Biomedical Research Institute Barcelona IIBB-CSIC, Rosselló 161, 08036 Barcelona, Spain; ²Department of Cardiovascular Disease, IIB Sant Pau, St. Antoni Ma. Claret 167, 08025 Barcelona, Spain; ³CIBERCV, Instituto de Salud Carlos III, Pabellón 11, Monforte de Lemos 3-5, 28029 Madrid, Spain; ⁴Neuropharmacology and Pain Group, Neuroscience Program, IDIBELL, Univ. Barcelona, Avinguda de la Granvia de l'Hospitalet, 199, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ⁵Department of Pathology and Experimental Therapeutics, Neuroscience Institute, Univ. Barcelona, Campus de Mundet Pg. de la Vall d'Hebron, 171 08035 Barcelona, Spain; ⁶Department of Automatic Control, Univ. Politècnica de Catalunya, Campus Diagonal Sud, Building H. Av. Diagonal, 647 08028 Barcelona, Spain; ⁷BioStatistic Unit, Translational Research in Respiratory Medicine, Biomedical Research Institute, IRBLleida, Av. Alcalde Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain; ⁸Department of Cardiac Surgery, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, St. Antoni Ma. Claret 167, 08025 Barcelona, Spain; ⁹Facultad de Medicina, Univ. Autònoma de Barcelona, St. Antoni Ma. Claret 167, 08025 Barcelona, Spain; and ¹⁰Department of Cardiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, St. Antoni Ma. Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

Received 21 October 2020; editorial decision 24 March 2021; accepted 30 March 2021; online publish-ahead-of-print 31 March 2021

Time for primary review: 16 days

Aims

Atrial fibrillation (AF) has been associated with intracellular calcium disturbances in human atrial myocytes, but little is known about the potential influence of sex and we here aimed to address this issue.

Methods and results

Alterations in calcium regulatory mechanisms were assessed in human atrial myocytes from patients without AF or with long-standing persistent or permanent AF. Patch-clamp measurements revealed that L-type calcium current (I_{Ca}) density was significantly smaller in males with than without AF (-1.15 ± 0.37 vs. -2.06 ± 0.29 pA/pF) but not in females with AF (-1.88 ± 0.40 vs. $-2.21 \pm 0.0.30$ pA/pF). In contrast, transient inward currents (I_{Ti}) were more frequent in females with than without AF (1.92 ± 0.36 vs. 1.10 ± 0.19 events/min) but not in males with AF. Moreover, confocal calcium imaging showed that females with AF had more calcium spark sites than those without AF (9.8 ± 1.8 vs. 2.2 ± 1.9 sites/ μm^2) and sparks were wider (3.0 ± 0.3 vs. 2.2 ± 0.3 μm) and lasted longer (79 ± 6 vs. 55 ± 8 ms), favouring their fusion into calcium waves that triggers I_{Ti} s and afterdepolarizations. This was linked to higher ryanodine receptor phosphorylation at s2808 in women with AF, and inhibition of adenosine A_{2A} or beta-adrenergic receptors that modulate s2808 phosphorylation was able to reduce the higher incidence of I_{Ti} in women with AF.

Conclusion

Perturbations of the calcium homoeostasis in AF is sex-dependent, concurring with increased spontaneous SR calcium release-induced electrical activity in women but not in men, and with diminished I_{Ca} density in men only.

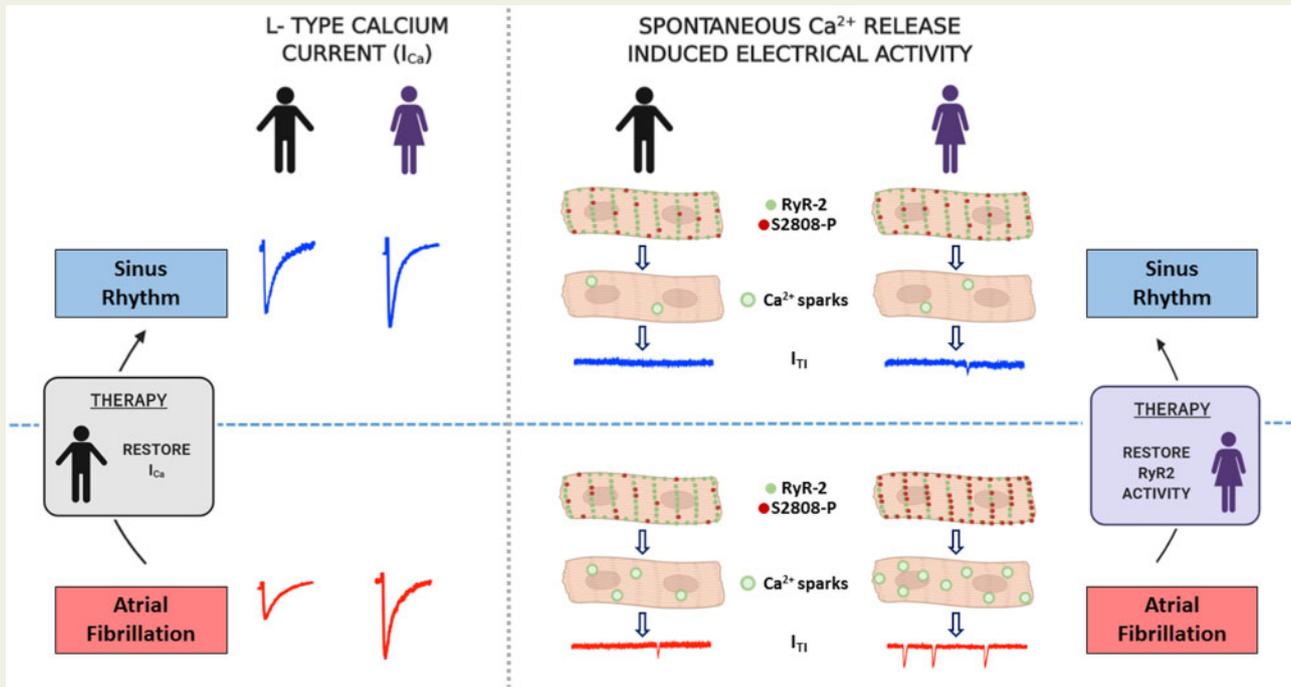
* Corresponding author. Tel: +34 935565620; fax: +34 935565603, E-mail: leif.hove@iibb.csic.es

† These authors contributed equally to this article.

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society of Cardiology.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Graphical Abstract



Keywords

Sarcoplasmic reticulum calcium release • Calcium sparks • Transient inward current • Afterdepolarizations • Ryanodine receptor phosphorylation

1. Introduction

Epidemiological studies on atrial fibrillation (AF) show that compared with men, women have a lower incidence and a 5-year delay in the onset of this arrhythmia.^{1–3} However, because the incidence of AF increases exponentially at advanced age and because women live longer, the number converges for the two sexes at 75 years or older.^{3,4} The mechanism by which the incidence of AF increases more strongly in women older than 70 years is not well known. Since both AF and sex have been associated with well-defined cellular electrophysiological alterations,^{5,6} it is conceivable that some of them contribute to the sex-related differences in the incidence of AF.

Mechanistically, AF has been associated with both structural⁷ and electrophysiological alterations.^{5,8} Among the electrophysiological alterations, AF has been linked to disturbances in the intracellular calcium homeostasis^{9–12} including malfunctioning of the sarcoplasmic reticulum (SR)^{9,10,12–15} in experimental series with a mixed population of male and female patients. These studies have shown that atrial myocytes from patients with AF have a reduced L-type calcium current (I_{Ca}) density,^{10,11} which shortens the action potential, and hence reduces the duration of the refractory period. In addition, these myocytes display a high incidence of spontaneous SR calcium release,⁹ which can induce arrhythmogenic spontaneous membrane depolarizations.¹⁵

Therefore, this study aimed to determine the specific influence of sex on the intracellular calcium homeostasis in a large series of patients with and without AF.

2. Methods

2.1 Human biological samples and atrial myocyte isolation

Human right atrial myocytes were isolated from patients undergoing cardiac surgery as previously described⁹ and used for different experimental protocols. Because the yield of myocyte isolation from human atrial samples is variable, not all protocols were carried out in all patients as outlined in the flow scheme for collection and processing of human atrial samples (Supplementary material online, Figure S1). For electrophysiological experimentation, patients were divided into males ($n=189$) and females ($n=78$) without AF (237) and with permanent or long-standing persistent AF (30) and key clinical and echocardiographic data as well as pharmacological treatments included in the statistical analysis of this data are summarized in Table 1. Patients undergoing mitral valve replacement or repair were not included in this analysis to avoid potentially confounding effects of mitral valve disease, a disease that already alters the calcium homeostasis in patients without AF.¹⁶ Each patient gave written consent to obtain a sample from the right atrial appendage that would otherwise have been discarded during the surgical intervention. The study was approved by the Ethics Committee at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain and the investigation conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

2.2 Immunoblot and immunofluorescent labelling

Expression of SERCA2a, Na–Ca exchanger (NCX-1), phospholamban (PLB), PLB phosphorylated at ser-16 (PLB-s16) and PLB phosphorylated

Table 1 Clinical characteristics of the study population for electrophysiological analysis

	Female	Female, AF	Male	Male, AF	P-value
N	65	13	172	17	
LAD index ^a	2.30 [2.01; 2.58]	2.96 [2.40; 3.47]	2.19 [1.90; 2.48]	2.56 [2.30; 2.93]	<0.001
Age ^a	74.0 [66.0; 78.0]	75.0 [72.0; 76.0]	67.5 [57.0; 74.0]	71.0 [63.0; 78.0]	0.001
Smoking ^a	7 (10.9%)	1 (8.3%)	123 (71.5%)	9 (56.2%)	<0.001
Alcohol	0 (0%)	0 (0%)	19 (11.2%)	1 (6.25%)	0.035
Hypertension ^a	44 (67.7%)	8 (61.5%)	97 (56.7%)	11 (64.7%)	0.469
Diabetes ^a	18 (27.7%)	4 (30.8%)	53 (31.0%)	4 (23.5%)	0.925
Dyslipaemia	41 (63.1%)	6 (46.2%)	86 (50.6%)	9 (52.9%)	0.353
LVEF ^a	60.0 [55.0; 68.0]	63.0 [55.0; 72.8]	60.0 [47.2; 65.0]	56.0 [44.0; 66.0]	0.136
AVR ^a	39 (60.0%)	9 (69.2%)	78 (45.3%)	12 (70.6%)	0.035
TVR	5 (7.69%)	1 (7.69%)	3 (1.74%)	1 (5.88%)	0.059
CABG ^a	30 (46.2%)	4 (30.8%)	119 (69.2%)	9 (56.2%)	0.001
ACE inhibitor ^a	15 (23.1%)	6 (46.2%)	58 (33.7%)	9 (52.9%)	0.067
B-Block ^a	19 (29.2%)	6 (46.2%)	70 (40.7%)	8 (47.1%)	0.314
ARB ^a	16 (24.6%)	3 (23.1%)	24 (14.0%)	2 (11.8%)	0.196
Ca-antagonist ^a	9 (13.8%)	1 (7.69%)	31 (18.0%)	2 (11.8%)	0.776
Dicoumarin ^a	2 (3.08%)	7 (53.8%)	4 (2.34%)	13 (76.5%)	<0.001
Digoxin	0 (0%)	7 (53.8%)	2 (1.21%)	8 (47.1%)	<0.001
Aspirin	29 (44.6%)	3 (23.1%)	93 (54.4%)	2 (11.8%)	0.002
Statins	41 (63.1%)	6 (46.2%)	96 (56.1%)	9 (52.9%)	0.622

Categorical values are given as number of patients and % of patients in parenthesis. Continuous values are given as median with 25% and 75% quantiles given in the brackets. The statistical significance of differences among the four patient groups is given on the right for each factor.

ACE inhibitor, angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; AVR, aortic valve replacement; beta-blockers, beta-adrenergic receptor blockers; CABG, coronary artery bypass graft; LAD index, left atrial diameter index; LVEF, left ventricular ejection fraction; TVR, tricuspid valve replacement/repair.

^aFactors included as confounders in the linear regression analysis in Figures 1 and 2.

at thr-17 (PLB-t17) was determined by western blot. Atrial samples were pulverized in liquid nitrogen and homogenized in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 containing protease inhibitors. Proteins (10 µg) were separated by 5% or 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (transferred to polyvinylidene difluoride membranes using a semi-dry transfer system, and immunoblotted using rabbit anti-SERCA2a, rabbit anti-Csq-2, rabbit anti-NCX-1, rabbit anti-PLB, rabbit anti-PLB-s16, rabbit anti-PLB-t17, and rabbit anti- α -actinin antibodies. Details are provided in the [Supplementary material online, Methods](#).

Isolated myocytes were fixed with 5% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Subsequently, the ryanodine receptor (RyR2), the L-type calcium channel (Cav1.2), or calsequestrin-2 (Csq-2) were labelled using the primary antibodies mouse anti-RyR2, guinea-pig anti-Cav1.2, rabbit anti-Csq-2, rabbit anti-s2808-P, or rabbit anti-ser2814P as previously described.¹⁷ After labelling, cells were stored at 4°C until the labelled proteins were visualized using confocal microscopy ([Supplementary material online, Methods](#) for further details).

2.3 Patch-clamp technique

Electrophysiological recordings were performed using perforated patch-clamp technique in isolated human atrial myocytes as described in the [Supplementary material online, Methods](#). Briefly, I_{Ca} , spontaneous transient inward calcium release-induced NCX currents (I_{Ti}), and the caffeine releasable SR calcium content were measured using whole cell voltage-clamp configuration. Membrane potentials were recorded in the current-clamp configuration. Adenosine A_{2A} receptors ($A_{2A}Rs$) were stimulated with the selective agonist CGS21680 (200 nM). Adenosine

deaminase (ADA) with and activity of 2 µmol/min/mL was used to prevent $A_{2A}R$ activation.

2.4 Confocal calcium imaging

To visualize changes in the intracellular calcium concentration, myocytes were loaded with 2.5 µM fluo-4 AM for 15 min, followed by wash and de-esterification for 30 min or more. Confocal calcium images (512 × 140 pixels) were recorded at a frame rate of 90 Hz, using a resonance-scanning confocal microscope with a 63× glycerol-immersion objective (Leica SP5 AOBS, Wetzlar, Germany). The excitation wavelength was 488 nm and fluorescence emission was collected between 500 and 650 nm with a Leica Hybrid Detector. Experiments were performed at room temperature and calcium sparks were detected using custom-made algorithms implemented using MATLAB (The Mathworks Inc., Boston, MA) as previously described.¹⁷

2.5 Data analysis and representation

Experiments were performed without knowledge about clinical data and clinicians gathering the clinical data did not know the experimental results. Data was represented in figures using Excel, Power Point, IGOR Pro or Biorender.com Software. Unless otherwise stated, values were determined for each patient (multiple determinations in the same patient were averaged) and expressed as mean ± 95% confidence level. Where indicated, statistical significance was evaluated using a multivariate linear regression model for data with a normal distribution (I_{Ca}) or generalized linear model with a Poisson distribution (I_{Ti}). To validate the robustness of this analysis, results were analysed using (i) an unadjusted linear regression model with interaction between sex and atrial rhythm, (ii) a fully

adjusted model taking into account the confounding effects of common clinical factors showing a bias between sex as well as factors suspected to affect calcium homeostasis, and (iii) a model adjusted for the most relevant factors (see [Supplementary material online, Methods](#) for details). As shown in [Supplementary material online, Figure S2](#), raw data and estimates using the fully adjusted model were similar and the three linear regression models yielded similar results. In the subsequent mechanistic analysis data were analysed using a linear regression model as indicated. Otherwise, Fisher's exact test was used for categorical data. Student's *t*-test or Wilcoxon's rank test was used for paired or unpaired comparisons. The *P*-value threshold defining statistical significance was set at <0.05. Statistical analysis was performed using version 3.5.2 of R software.

3. Results

3.1 Differences in clinical characteristics among male and female patients

Reduced L-type calcium current (I_{Ca}) density¹¹ and a higher incidence of I_{T1} currents^{9,10,15} are cellular electrophysiological hallmarks of atrial myocytes from patients with AF that might be influenced by sex. Therefore, we first determined if there were sex-dependent differences in cardiovascular risk factors; concurrent cardiovascular disease; echocardiographic data; pharmacological treatments or atrial rhythm. [Table 1](#) shows that female patients were older, smoked less, and did not abuse alcohol. There were no significant differences in common pharmacological treatments, but coronary artery bypass grafts were performed in a significantly smaller fraction of women. To exclude potentially confounding effects of these sex-dependent differences in the study population, or differences in the effect of the clinical factors on calcium homeostasis, we performed a multivariate regression analysis (see [Supplementary material online, Methods](#)) in order to determine the specific effects of sex and AF on the electrophysiological measurements.

3.2 Effect of sex on L-type calcium current and transient inward currents

In line with previous findings, comparison of the I_{Ca} amplitude measured in patients with and without AF showed that those with AF have significantly smaller amplitude (-1.20 ± 0.21 vs. -2.03 ± 0.10 pA/pF, $P < 0.001$, unpaired *t*-test). However, multivariate regression analysis taking confounding factors into account ([Supplementary material online, Methods](#)) revealed no significant interactions between AF, sex or AF plus sex and I_{Ca} density, but pairwise comparisons showed a significant reduction in I_{Ca} density in male but not in female patients with AF ([Figure 1A and B](#)). Neither sex nor AF affected the shape of the current–voltage relationship in our patients ([Figure 1C](#)), but the time-dependent decay of the I_{Ca} was slowed significantly in male patients with AF ([Figure 1D](#)). Immunofluorescent labelling revealed that the density of L-type calcium channels was higher at the sarcolemma than in the cell centre. However, the difference in I_{Ca} amplitude among patients with and without AF was not due to differences in the density of the L-type calcium channels among patients with and without AF ([Supplementary material online, Figure S3](#)).

Multivariate analysis of the I_{T1} frequency revealed a significant interaction between sex and I_{T1} frequency ($P < 0.001$) and between sex plus AF and I_{T1} frequency ($P = 0.032$). Hence, I_{T1} frequency was significantly higher in female than in male patients ($P < 0.001$). Moreover, the I_{T1} frequency was low and virtually identical in male patients with and without AF while

female patients displayed a significantly higher frequency in those with AF than without AF ([Figure 2A and B](#)). [Figure 2C](#) shows that I_{T1} amplitude was also significantly larger in females with than without AF. Moreover, [Figure 2D](#) shows that the higher incidence of I_{T1} concurred with a higher incidence of spontaneous membrane depolarizations in female patients with AF. Because paroxysmal and long-standing persistent or permanent AF have been associated with different alterations in calcium homeostasis,¹² we compared their effects. As shown in [Supplementary material online, Figure S4](#), women with paroxysmal and long-standing persistent or permanent AF displayed a similar increase in the I_{T1} frequency. However, the I_{Ca} density was reduced in males with long-standing persistent or permanent but not paroxysmal AF.

3.3 Effect of sex on spontaneous SR calcium release

To determine if the higher incidence of I_{T1} and spontaneous membrane depolarizations were due to sex-specific differences in the susceptibility of the SR to release calcium spontaneously, we analysed the frequency and properties of calcium sparks in atrial myocytes from a subset of patients. This analysis showed interaction between AF and spark density ($P < 0.001$) as well as an interaction between AF plus sex and spark density ($P = 0.037$). In line with a differential interaction of female sex plus AF and calcium spark frequency and properties, the spark site density ([Figure 3A and B](#)), the sparks/site ([Figure 3C](#)), the duration at half maximum ([Figure 3D](#)), and the full width at half maximum ([Figure 3E](#)) were all significantly higher in females with than without AF while no differences were observed in these features among males with and without AF. The calcium spark amplitude was not different among the different patient groups ([Figure 3F](#)).

3.4 Effect of sex on the regulation of SR calcium uptake and content

[Figure 4A and B](#) shows that the caffeine releasable SR calcium load, which regulates spontaneous SR calcium release, was unaffected by sex and atrial rhythm and that sex had no effect on the calcium load in patients without or with AF. Analyses of the expression of the SR calcium pump SERCA2a and the Na–Ca exchanger protein NCX-1 that regulate the cytosolic calcium level showed that SERCA2a expression was significantly higher in women without than with AF ([Figure 4C](#)). NCX-1 expression was not significantly different among patients with and without AF, and sex did not affect the expression in either group ([Figure 4D](#)). Analysis of the expression and phosphorylation of PLB, which regulates SERCA2a activity, showed a significantly higher level of PLB in men without than with AF. This was also true for PLB phosphorylation at t17, while differences in phosphorylation at s16 were not significant ([Supplementary material online, Figure S5](#)). Interestingly expression of the SR calcium buffering protein Csq-2, which dampens RyR2 activity, was significantly reduced in both males and females with AF ([Figure 5A and B](#)). Moreover, ratiometric immunofluorescent analysis of the Csq-2 distribution at the RyR2 clusters ([Supplementary material online, Figure S6](#)) showed that Csq-2 was highest at the sarcolemma in both male and female atrial myocytes ([Figure 5C and D](#)) and there was a significant interaction between AF and the Csq-2/RyR2 ratio ($P < 0.001$).

3.5 Effect of sex on RyR2 phosphorylation

To determine if the increase in calcium sparks in women with AF could be caused by differential phosphorylation of the RyR2, we measured the density and phosphorylation state of individual RyR2

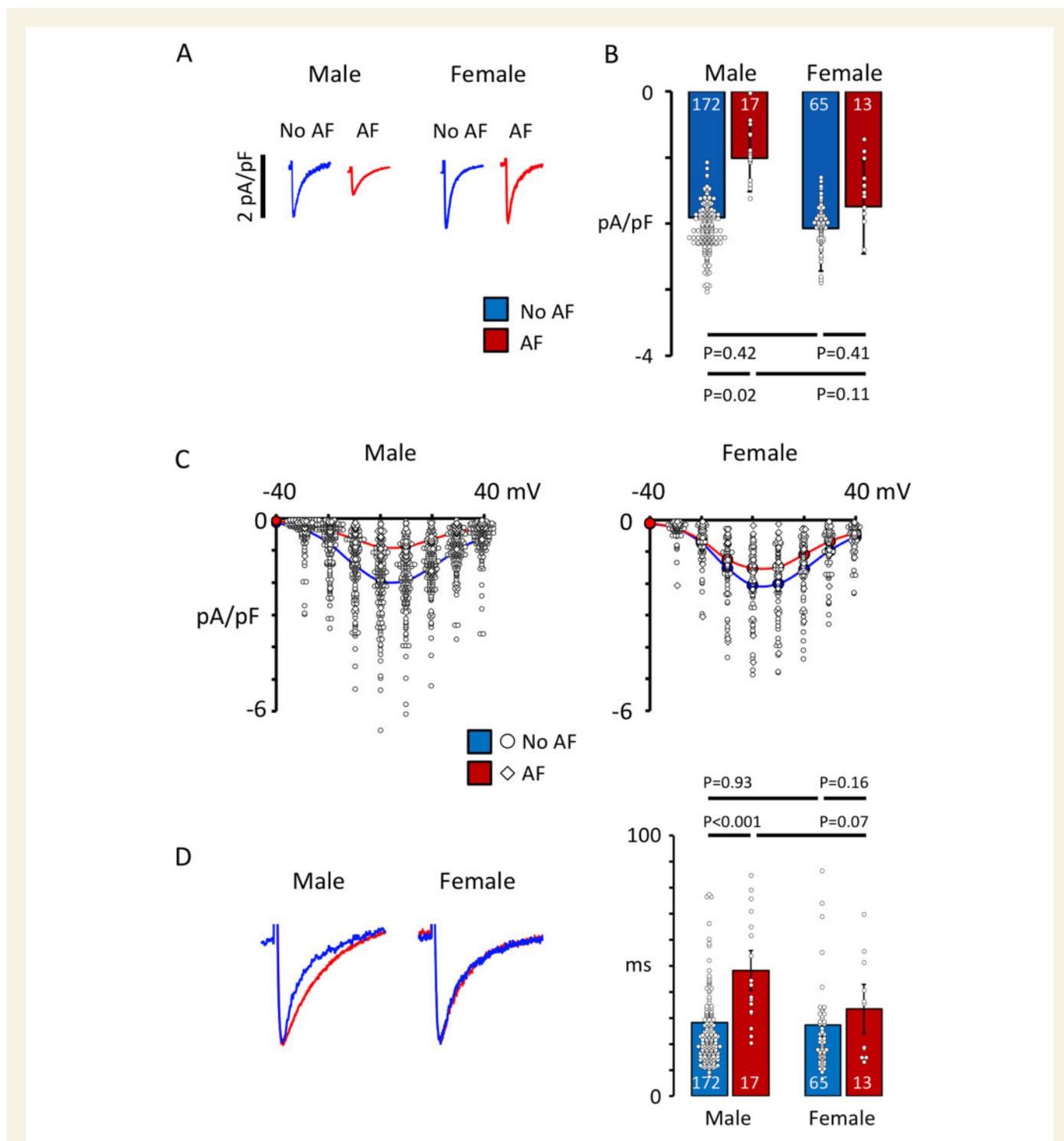


Figure 1 Effect of sex on the L-type calcium current amplitude and properties. (A) Representative I_{Ca} recordings from four patient groups of male (left traces) and female patients (right traces), without AF (blue traces) and with AF (red traces). (B) Mean I_{Ca} densities in the four groups. (C) Current–voltage curves for male and female patients with no AF or with AF. (D) Superimposed I_{Ca} tracings are shown on the left and time constants for fast I_{Ca} inactivation are shown on the right. Values were analysed and corrected for the clinical factors marked as confounders in Table 1 using a linear regression model. *P*-values are given for significant differences between bars. Number of patients is given for each bar.

clusters at s2808 and s2814 (Supplementary material online, Figure S3 for details). This analysis showed that similar to *Csq-2*, RyR2 density was higher at the sarcolemma, but there were no differences in the RyR2 density among men and women with or without AF (Figure 6A

and B). However, linear regression analysis showed a significant interaction between AF plus sex and the s2808/RyR2 ($P=0.018$) ratio with a strong increase in RyR2 phosphorylation at s2808 in women but not in men with AF (Figure 6C and D). Separate images of total and

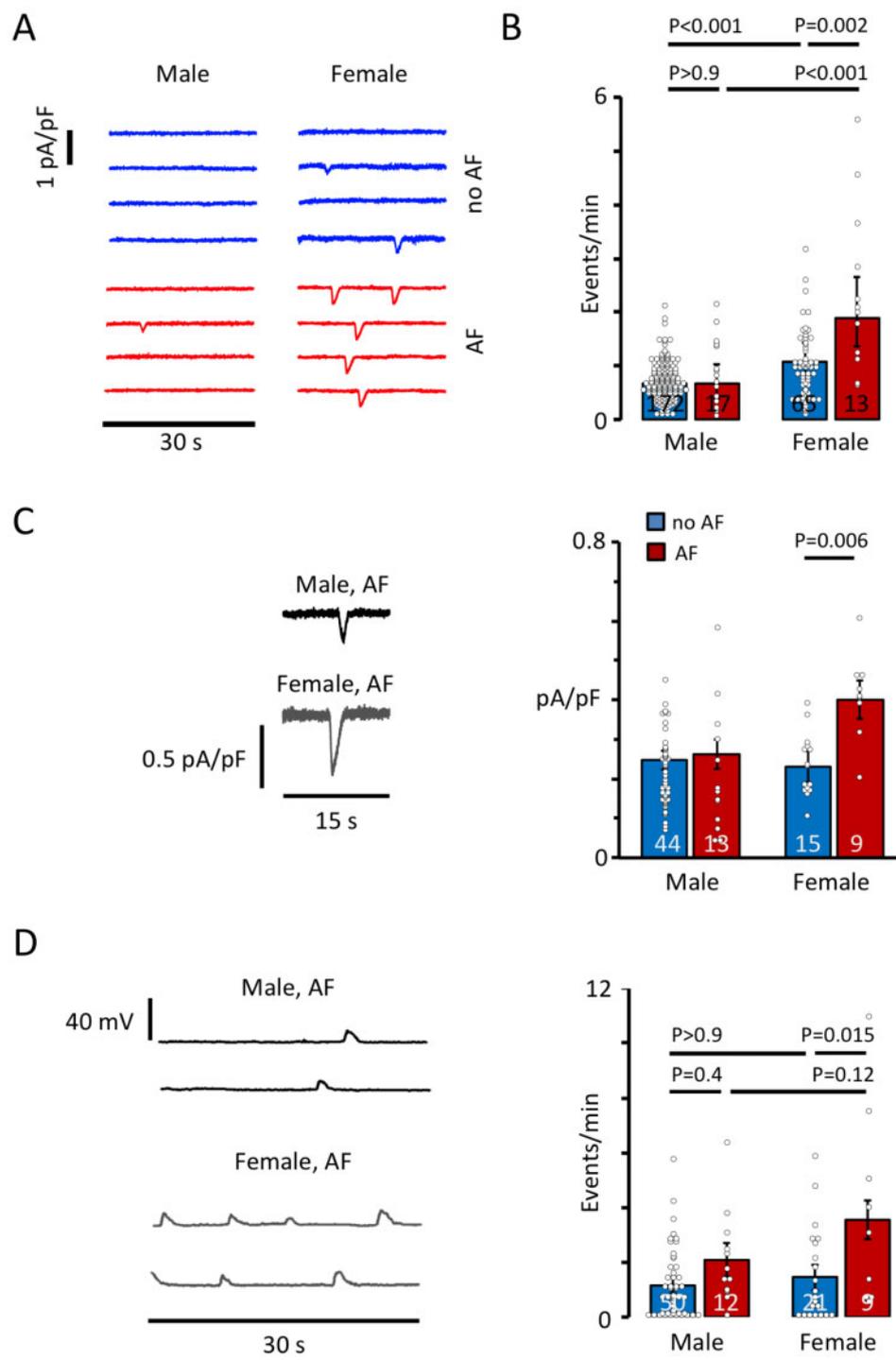


Figure 2 Effect of sex on the I_{T1} frequency and spontaneous membrane depolarizations. (A) Representative recordings of I_{T1} currents from the same patients as in Figure 1 divided into male (left traces) and female patients (right traces). (B) Mean I_{T1} frequencies. Values in (A)–(B) were analysed and corrected for the clinical factors marked as confounders in Table 1 using a linear regression model. (C) Representative recordings of I_{T1} amplitudes in a male and a female patient with AF. Mean amplitudes are shown on the right. (D) Spontaneous membrane depolarizations recorded in male and female patients with AF. The mean frequency is shown on the right. Statistical significance was determined in (C)–(D) using an unadjusted regression model. *P*-values are given for significant differences between bars. Number of patients is given for each bar.

s2808 phosphorylated RyR2 are shown in [Supplementary material online, Figure S7](#). RyR2 phosphorylation at s2814 was barely detectable in resting human atrial myocytes and there were no differences

in s2814 phosphorylation, measured as the s2814/RyR2 ratio, between myocytes from nine female patients without (0.21 ± 0.04) and four with AF (0.16 ± 0.05).

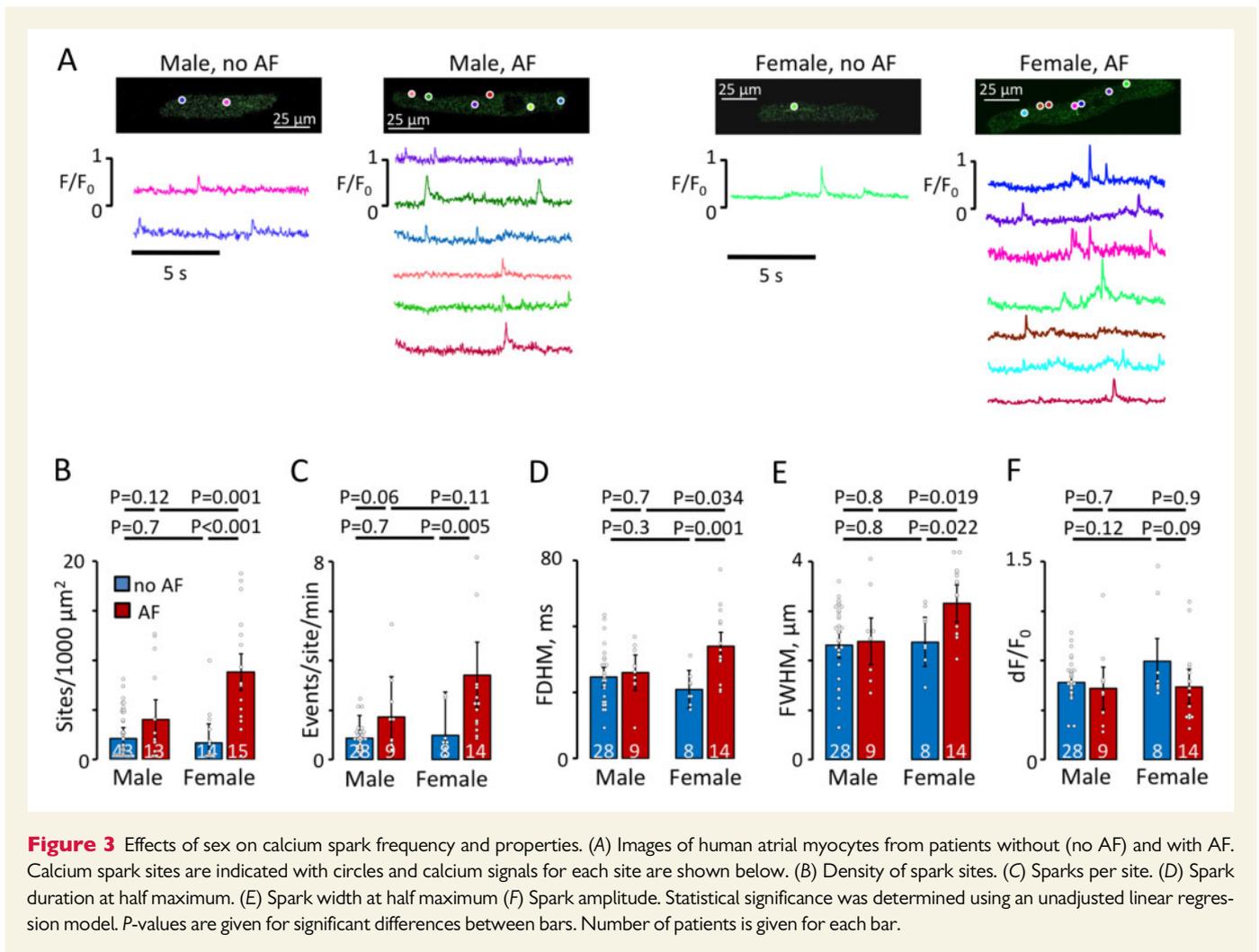


Figure 3 Effects of sex on calcium spark frequency and properties. (A) Images of human atrial myocytes from patients without (no AF) and with AF. Calcium spark sites are indicated with circles and calcium signals for each site are shown below. (B) Density of spark sites. (C) Sparks per site. (D) Spark duration at half maximum. (E) Spark width at half maximum (F) Spark amplitude. Statistical significance was determined using an unadjusted linear regression model. *P*-values are given for significant differences between bars. Number of patients is given for each bar.

3.6 Translation of sex-specific differences in calcium homeostasis

To determine if the observed sex-specific differences in calcium homeostasis could be extended to pharmacological treatments directed towards a control of spontaneous calcium release, we focused on membrane receptors that are expected to exert a stronger modulation of s2808 phosphorylation near the sarcolemma as observed in Figure 6C and D. First, we used pharmacological manipulation of A_{2A}Rs, which has been shown to modulate spontaneous calcium release in myocytes from patients with AF.¹⁰ Figure 7A shows that A_{2A}R activation with CGS21680 increased the I_{T1} frequency in all patient groups and prevention of A_{2A}R activation with ADA reduced it in all groups (Figure 7B). This effect was most pronounced in females and especially in females with AF where it reduced the I_{T1} frequency below the level observed in patients without AF.

Secondly, analysis of patients that had been treated with beta-adrenergic receptor blockers, which might reduce RyR2 phosphorylation at s2808,¹⁸ revealed that this treatment reduced the I_{T1} frequency dramatically in females with AF to levels observed in patients without AF (Figure 7C), and linear regression analysis showed a significant interaction between beta-blocker treatment and I_{T1} frequency (*P* < 0.001) as well as a combined interaction of beta-blocker treatment plus AF with I_{T1} frequency (*P* = 0.009).

In contrast to these results, I_{Ca} density was not affected by treatment of myocytes with ADA (-1.87 ± 0.24 vs. -1.87 ± 0.20 pA/pF) or in patients treated with beta-blockers (-2.03 ± 0.13 vs. -1.91 ± 0.08 pA/pF). Furthermore, none of these compounds were able to rescue the observed decrease in I_{Ca} density in male patients with AF where ADA decreased I_{Ca} density by 17 ± 10% and the I_{T1} frequency was 37 ± 11% smaller in patients treated with beta-blockers.

4. Discussion

4.1 Main findings

This study is the first to analyse a large series of 267 consecutive patients in order to analyse the specific influence of sex on calcium homeostasis in human atrial myocytes, taking into account confounding effects of other clinical factors that might affect the I_{Ca} density or the incidence of I_{T1} currents. These analyses document that the I_{Ca} density is only diminished significantly in males with AF while a higher incidence of both I_{T1} and spontaneous membrane depolarizations is observed almost exclusively in females and is exacerbated in those with AF. Analysis of the underlying mechanisms revealed that females with AF showed a differential increase in spontaneous calcium release from the SR linked to a higher level of RyR2 phosphorylation at S2808. Furthermore, prevention of A_{2A}R activation with ADA or treatment of patients with beta-blockers

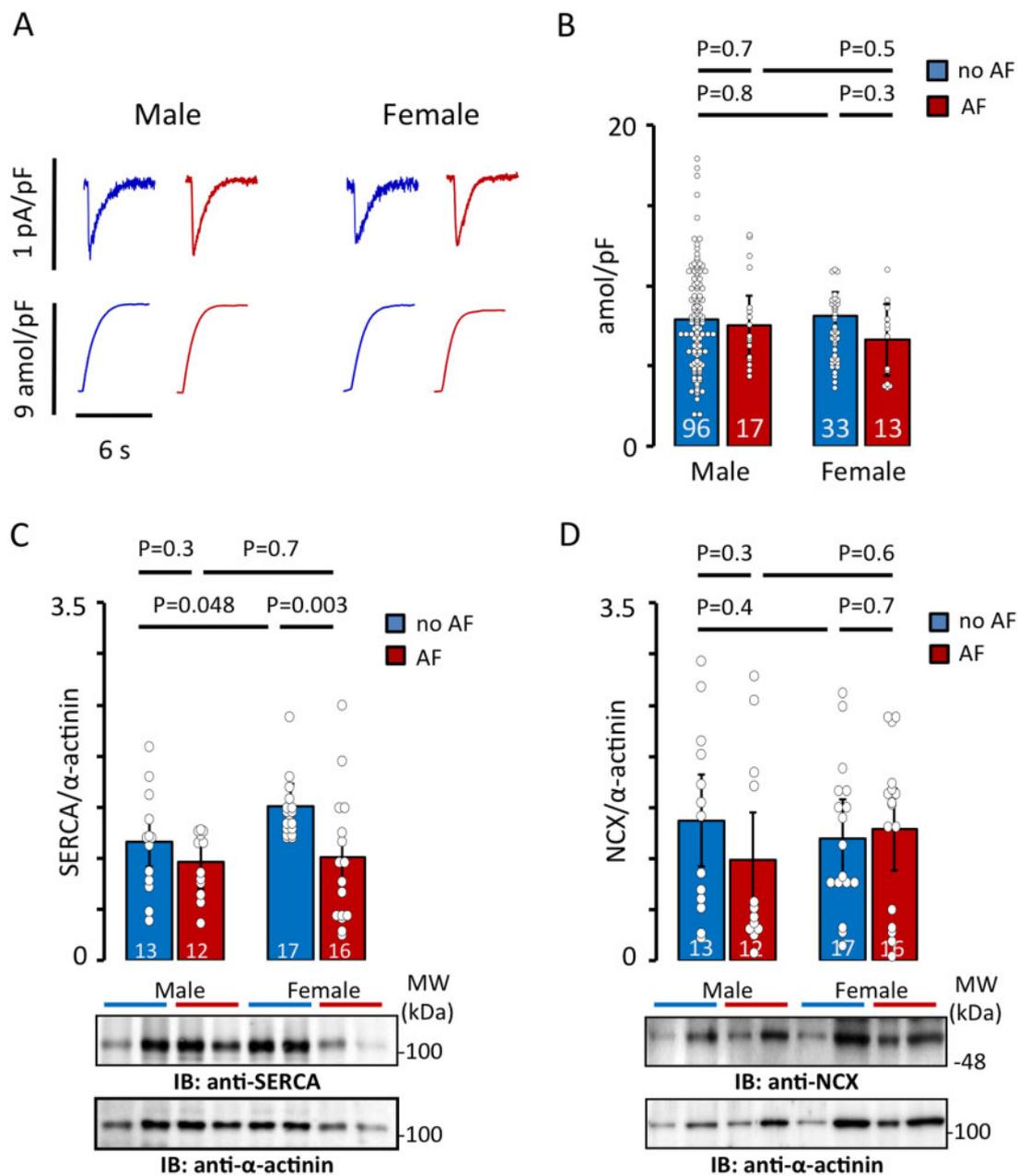


Figure 4 Effect of sex on SR calcium load and uptake. (A) Representative caffeine-induced transient inward NCX currents (top) and their time-integral (bottom) from a male and a female patient without AF (left) and with AF (right). (B) Caffeine releasable SR calcium load estimated from the time-integral of the caffeine-induced current. Values are corrected for the clinical factors marked as confounders in Table 1 using a linear regression model. (C) SERCA2a protein expression. (D) NCX-1 protein expression. Densitometry quantification of protein levels is shown in the upper panels and representative western blots in the lower panels. Protein levels were normalized to α -actinin. P-values are given for differences between bars. Statistical significance was determined using an unadjusted linear regression model. Number of patients is given for each bar.

was able to reduce the I_{T1} frequency in females with AF to levels observed in patients without AF.

4.2 Sex and L-type calcium current

While the effects of mitral valve disease¹⁶ ageing,¹⁹ or left ventricular function²⁰ on I_{Ca} density or I_{T1} frequency have been assessed in human atrial myocytes, studies addressing sex-related effects on calcium handling have been limited to mammalian models.^{21–23}

Thus, elevation of testosterone levels has been shown to reduce I_{Ca} in guinea-pig ventricular myocytes²³ pointing to potential sex-specific differences in the I_{Ca} density in healthy animals. In contrast to this, we found that sex showed no interaction with I_{Ca} density in human atrial myocytes when the confounding effects of the clinical factors from Table 1 were taken into account. Pairwise comparison of the patient groups did, nevertheless, show a significant reduction of the I_{Ca} density in men but not in women. Thus, the significant effect

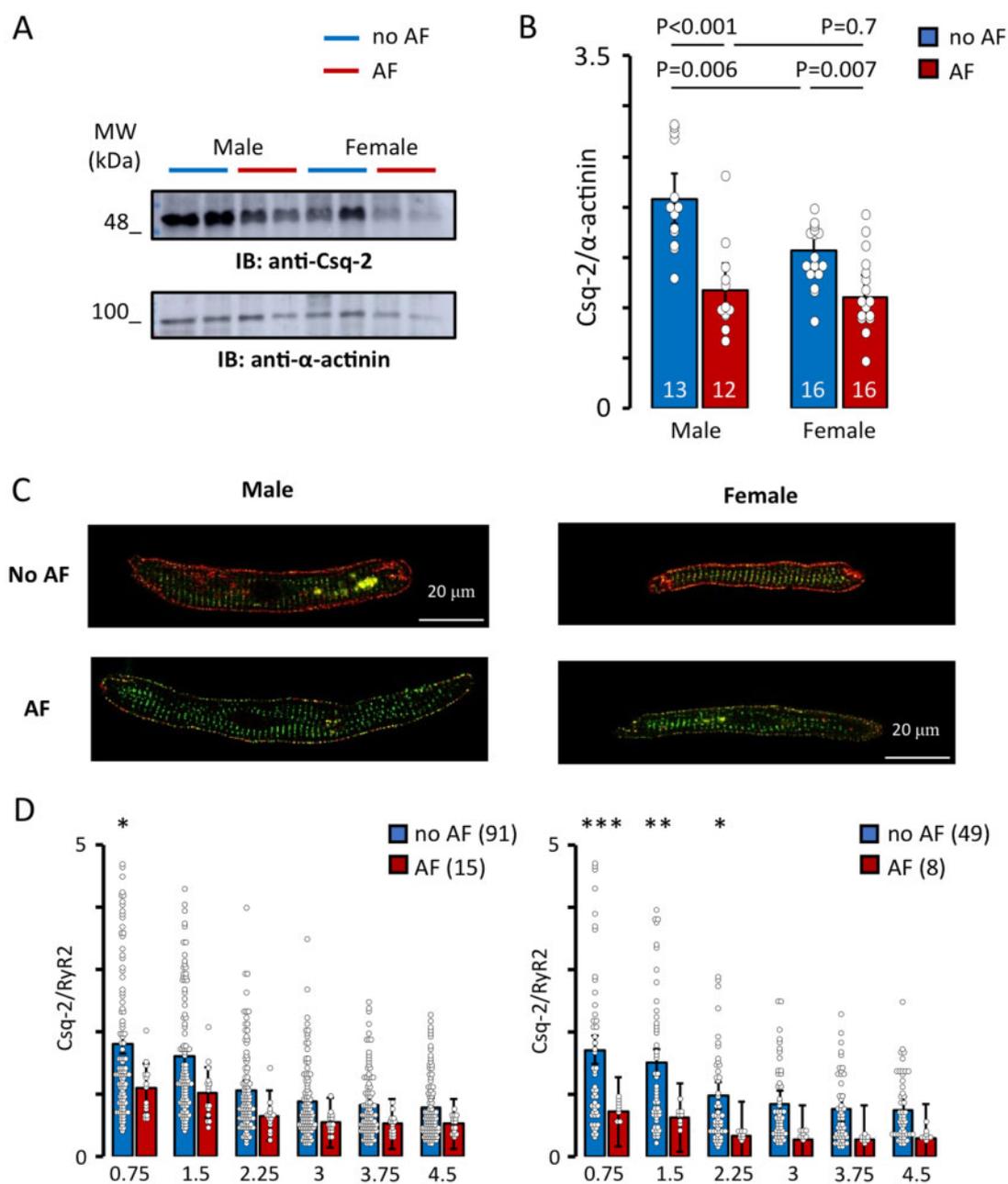


Figure 5 Effect of sex on the expression and distribution of Csq-2. (A) Representative western blots of Csq-2 and α -actinin. (B) Densitometry quantification of Csq-2 expression normalized to α -actinin. The number of patients is indicated for each bar. P -values are given above bars. (C) Overlay of fluorescently labelled RyR2 (in green) and Csq-2 (in red). (D) Csq-2/RyR2 intensity ratios measured at different distances from the sarcolemma (given below bars in μ m). Atrial myocytes from No AF patients had higher ratios than those from AF for females ($P = 0.02$) but not for males ($P = 0.06$). Statistical significance was determined using an unadjusted linear regression model. Statistical differences between pairs of AF and noAF are indicated with *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P = 0.05$. Number of experiments is given in parentheses.

of AF on I_{Ca} density reported in most studies of mixed sex,^{11,24} is possibly contributed by the male patients in the study population. Sex had no differential effect on the shape of the current–voltage relationship in patients with AF or in those without AF, suggesting that sex does not affect the gating properties of the L-type calcium channel. However, the kinetics of I_{Ca} inactivation was significantly slower in male than in female patients with AF. Considering that calcium release from the SR

modulates the fast time constant for I_{Ca} inactivation, the faster inactivation in females than males with AF might be due to a higher lability of SR calcium release in these patients (see below) or because there is only an insignificant loss of L-type calcium current in females with AF, whereas the smaller I_{Ca} amplitude in males with AF is expected to slow inactivation in this group. While the observed reduction in I_{Ca} amplitude might be due to reduced expression of L-type calcium channels previous

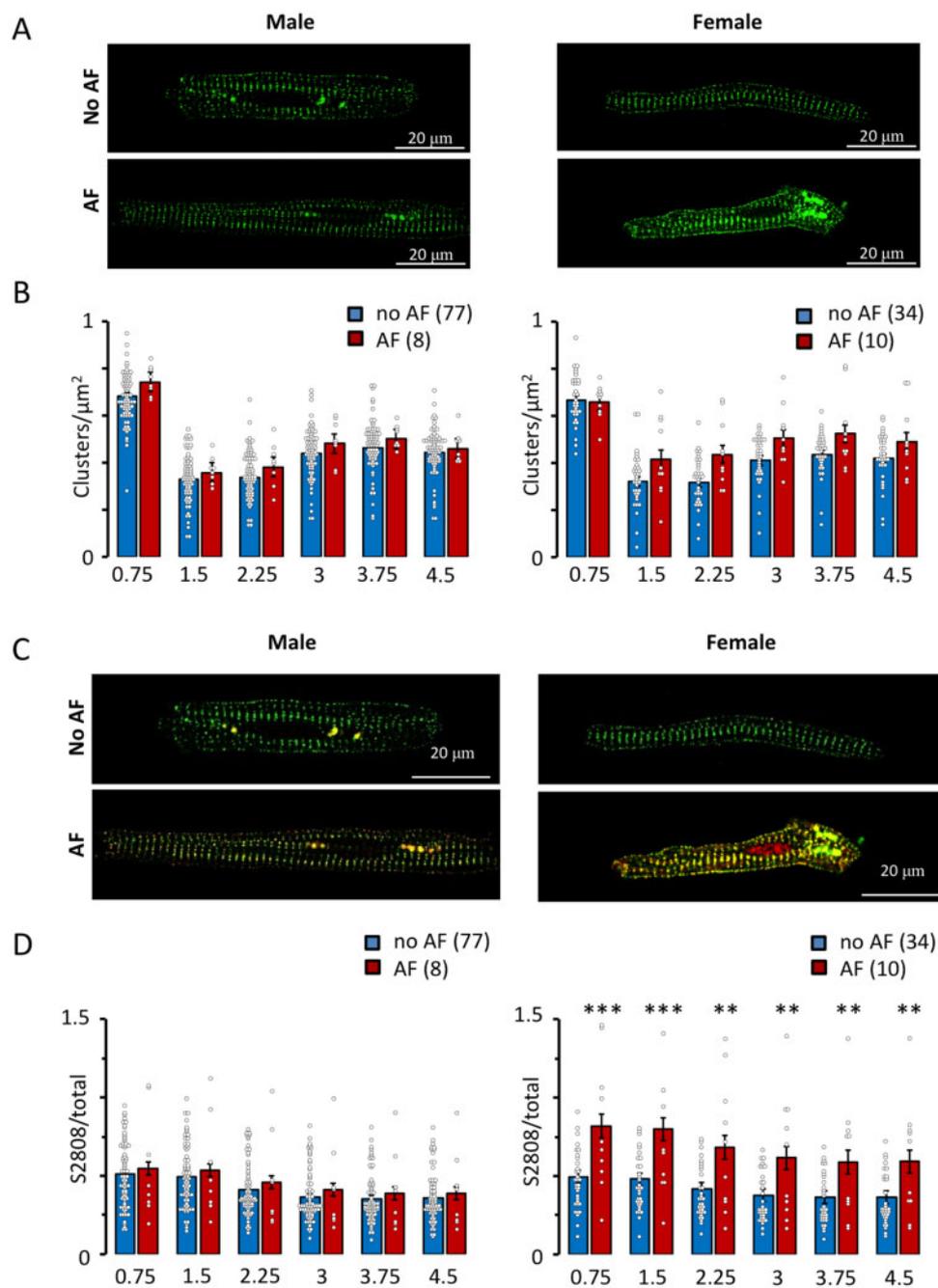


Figure 6 Effect of sex on the density and phosphorylation of the RyR2. (A) Immunofluorescent labelling of the RyR2. (B) Mean density of RyR2 clusters. (C) Overlay of total RyR2 (in green) and s2808 phosphorylated RyR2 (in red). (D) Mean s2808 phosphorylated RyR2 measured as the fluorescence intensity ratio (s2808/RyR2) for all RyR2 clusters at different distances from the sarcolemma (given below bars in μm). Statistical significance was determined using an unadjusted linear regression model. Significant differences between pairs of bars are indicated with *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$. Number of experiments is given in parentheses.

findings are ambiguous with some studies reporting a reduction^{25,26} while others found no changes.²⁷ Here, we found that the smaller I_{Ca} in males with AF did not coincide with a reduction in the density of L-type calcium channels, pointing to other factors, such as oxidative stress²⁸ or Cav β ²⁹ as potential modulators of I_{Ca} amplitude in males with AF.

4.3 Sex and spontaneous SR calcium release

When taking into account the confounding effects of other clinical factors, both sex and sex plus AF showed significant interactions with the I_{T1} frequency. Thus, male sex barely affected the I_{T1} frequency when comparing patients with and without AF, while the I_{T1} frequency was higher in

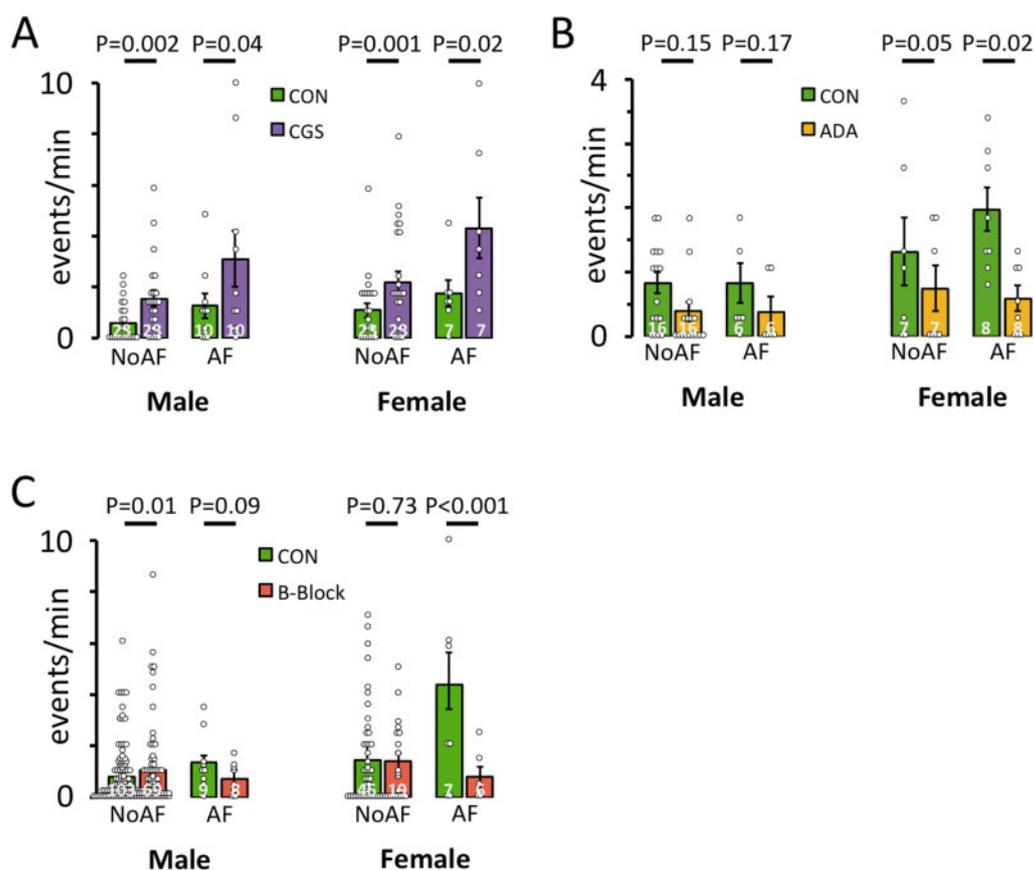


Figure 7 $A_{2A}R$ inhibition or treatment with beta-blockers reduces the I_{T1} frequency in females with AF. (A) Effect of $A_{2A}R$ activation with CGS21680 on the I_{T1} frequency. (B) Prevention of $A_{2A}R$ activation by treating myocytes with ADA reduces the I_{T1} frequency in females with AF to levels observed in patients without AF. (C) Treatment of patients with beta-blockers (B-Block) reduces the I_{T1} frequency in female patients with AF to levels in patients without AF. Data were analysed using an unadjusted regression model. *P*-values for paired comparison of pharmacological treatment and control are given above bars. Number of patients is given for each bar.

females than males without AF, and it increased dramatically in women with AF. Additionally, the I_{T1} amplitude increased significantly in women with AF, increasing the ability of the I_{T1} to induce spontaneous membrane depolarizations. In line with this, the incidence of spontaneous membrane depolarizations in AF patients was twice as high in females as in males. In accordance with a role for female sex hormones in the regulation of spontaneous membrane depolarizations in females, ovariectomy has been shown to induce calcium-handling disturbances and a higher incidence of early afterdepolarizations in guinea-pig myocytes.²¹ This would agree with a higher incidence of membrane depolarizations in elderly female patients with AF, but does not explain why spontaneous calcium release is lower in males and further studies are required to elucidate how sex hormones affect calcium homeostasis in human atrial myocytes.

Analysis of the mechanisms underlying the higher I_{T1} frequency in our human atrial myocytes demonstrated that the number of calcium spark sites was significantly increased in female but not in male patients with AF and this concurred with wider and longer lasting sparks, facilitating their fusion into calcium waves, triggering electrogenic Na–Ca exchange and membrane depolarizations. The higher density of calcium spark sites in women with AF was not caused by SR calcium overload since neither sex nor AF had any significant effect on the caffeine releasable SR calcium

content. The latter is in line with previous reports,^{9,10,15} and western blot analysis revealed that SERCA expression was in fact significantly higher in female patients without AF, which on the other hand could explain the larger spark amplitude observed in females without AF. There were no significant differences in NCX-1 or PLB expression when comparing women with and without AF, and PLB phosphorylation at ser16 or thr17 was also similar, discarding effects on SR calcium uptake. Potentially, SR calcium uptake could also be increased by a lower sarcolemmal expression in AF,^{20,30} but this notion is not supported by our measurements of unchanged SR calcium load in both male and female patients with AF.

However, measurement of Csq-2 levels and s2808 phosphorylation at each RyR2 cluster showed significantly lower Csq-2 levels in female patients with AF than without AF, which may contribute to increase the spark frequency^{31,32} in those with AF. The same is true for the higher s2808 phosphorylation, observed in myocytes from women with AF, which has previously been associated with AF in populations of mixed sex.^{10,12,14,15} The fact that increased s2808 phosphorylation is only observed in women with AF, also suggests that caution should be taken when interpreting analyses of s2808 phosphorylation in mixed populations of male and female patients with AF because the increase and

statistical significance may vary according to the fraction of female patients, especially when the study population is small. Indeed, some studies with small populations find a significant difference in s2808 phosphorylation between patients with and without AF,^{10,12,14,15} while others do not.¹³

In a previous study of a mixed sex population, paroxysmal AF has also been associated with elevation of spontaneous calcium release-induced membrane depolarizations.¹² In the present study, paroxysmal AF was initially included in the analysis but the multivariate statistical analysis of I_{Ca} density and I_{T1} frequency in patients with paroxysmal AF did not afford statistical support for interactions with sex and atrial rhythm, and we therefore chose not to include this patient group in the final analysis. It should nevertheless be pointed out that post-test comparison showed that the I_{T1} frequency in female patients with paroxysmal and long-standing persistent or permanent AF was comparable and significantly higher than the frequency recorded in male patients and in female patients without AF.

4.4 Study limitations

A limitation of this study is the modest yield of healthy human atrial myocytes, which limits the number of electrophysiological experiments that can be carried out for each patient. Therefore, measurements from individual patients might not always be representative, although we previously found that variation among samples from the same patient was significantly smaller than variation among samples from different patients in a study population.⁹

Moreover, we only used human right atrial specimens in this study, and cannot rule out that not all of the present findings apply to the left atrium also. However, extraction of left atrial tissue samples for myocyte isolation is ethically justifiable in a limited number of cases such as mitral valve surgery where the left atrium is usually diseased and dilated and has been reported to disturb the calcium homeostasis.¹⁶ Thus, electrophysiological analysis of myocytes from patients with diseased or nearly normal atria is only realistic for the right atrium.

Finally, further studies with a larger number of patients are required to reach firm conclusions on some of the effects of sex in patients with and without AF where the effect size is smaller. For example, beta-blocker treatment is expected to reduce the impact of sex on s2808 phosphorylation in patients without AF but a larger sample size is necessary to achieve sufficient statistical power to test this. The same is true for the influence of sex on the effects in paroxysmal AF, which has previously been associated with alterations in calcium homeostasis that are different from patients with long-standing persistent or permanent AF.¹² Similarly, pairwise comparisons showed a reduced I_{Ca} density in males with AF even though there were no interaction between sex, AF and I_{Ca} in this study, which is possibly due to the small number of patients with AF compared the number of patients without AF.

4.5 Clinical relevance, translation, and conclusions

This is the first study to examine the effect of sex on the intracellular calcium homeostasis in atrial myocytes from a large series of patients that takes into account confounding effects of common risk factors and concurring cardiovascular disease. Our findings demonstrate that sex has differential effects on the I_{Ca} density and the I_{T1} frequency in atrial myocytes from patients with AF, suggesting that therapeutic approaches to prevent AF may be optimized by taking into account the observed differences in calcium homeostasis between males and females. Thus, a reduction in I_{Ca} density previously associated to AF in populations of

mixed sex is more prominent in males with AF, suggesting that therapies normalizing L-type calcium channel activity might be more efficient in males and that it may be worthwhile to consider L-type calcium channels as a therapeutic target in males with AF. In this regard, the present findings show that beta-blocker treatment is unable to rescue I_{Ca} in males with AF, pointing to alternative targets, such as Cav β ²⁹ that is capable of restoring I_{Ca} in diseased hearts. On the other hand, therapies targeting mechanisms that modulate spontaneous calcium release and membrane depolarizations^{10,13,15,18} are expected to be efficient in females with AF where we observed a high incidence of I_{T1} currents and membrane depolarization, but unsuccessful in males where the incidence of these arrhythmogenic events is low even in patients with AF. Indeed, we here show that prevention of A_{2A}R activation was capable of reducing the high incidence of I_{T1} s in females with AF to levels observed in patients without AF. Also, in line with a beneficial effect of reducing receptor-mediated hyperphosphorylation of the RyR2, we demonstrate that female AF patients treated with beta-blockers had an I_{T1} frequency similar to that observed in patients without AF.

It should nevertheless be kept in mind that the patients treated with beta-blockers did have AF in spite of a low I_{T1} frequency, which might suggest that an elevated I_{T1} frequency is not the cause but rather a consequence of AF. However, patients with genetic risk variants at chromosome 4q25 that increase the risk of AF present elevation of the I_{T1} frequency that precedes the development of AF.¹⁶ This in turn suggests that I_{T1} suppression with beta-blockers might prevent or delay the onset of AF in patients prone to present calcium release-induced ectopic activity. By contrast, beta-blockers may be less effective in patients where the underlying mechanism is atrial fibrosis³³ or dysregulated ion channel activity that is unrelated to spontaneous calcium release.³⁴

In summary, our findings demonstrate that further studies aiming to discover pharmacological targets for restoration of the L-type calcium current in male patients with AF are warranted while therapies aiming to normalize RyR2 phosphorylation may be useful to prevent excessive SR calcium release in females with AF.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Authors' contributions

A.H.-M., C.T., V.J.-S., A.L., H.G.-M., F.C., and L.H.-M. designed the research. A.H.-M., C.T., V.J.-S., A.L., H.G.-M., H.C., C.N.-C., S.C., and P.I.-C. performed the research. A.H.-M., C.T., V.J.-S., A.L., H.G.-M., H.C., C.N.-C., S.C., P.I.-C., I.B., R.B., E.R.-D., E.R.-F., X.V., F.C., J.C., and L.H.-M. analysed the data. A.H.-M., C.T., V.J.-S., F.C., J.C., and L.H.-M. wrote the article.

Acknowledgements

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

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by grants from The Spanish Ministry of Science Innovation and Universities [SAF2017-88019-C3-1-R MICIU /AEI/ FEDER /

UE] to L.H.-M. [SAF2017-88019-C3-2-R MICIU /AEI/ FEDER /UE] to R.B. and [SAF2017-87349-R MICIU /AEI/ FEDER /UE] to F.C.; and from the Spanish Ministry of Health and Consume, ISCIII, CIBERCV [CB16/11/00276] and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) to J.C., Fundació Marato TV3 [20152030/31] to L.H.-M./F.C. Also supported by ISC III [PIE14/00034] and IWT [SBO-140028] to F.C., a PhD grant [FPU/01250] to S.C., a PERIS grant from Generalitat de Catalunya to A.L. and [SGR2017-1769] to L.H.-M.

Data availability

The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

References

- Ko D, Rahman F, Schnabel RB, Yin X, Benjamin EJ, Christophersen IE. Atrial fibrillation in women: epidemiology, pathophysiology, presentation, and prognosis. *Nat Rev Cardiol* 2016;**13**:321–332.
- Gowd BM, Thompson PD. Effect of female sex on cardiac arrhythmias. *Cardiol Rev* 2012;**20**:297–303.
- Humphries KH, Kerr CR, Connolly SJ, Klein G, Boone JA, Green M, Sheldon R, Talajic M, Dorian P, Newman D. New-onset atrial fibrillation: sex differences in presentation, treatment, and outcome. *Circulation* 2001;**103**:2365–2370.
- Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the framingham heart study. *Circulation* 1998;**98**:946–952.
- Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allesie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;**92**:1954–1968.
- Ravens U. Sex differences in cardiac electrophysiology. *Can J Physiol Pharmacol* 2018;**96**:985–990.
- Allesie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:230–246.
- Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ. Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms. *Circulation* 1996;**94**:2968–2974.
- Hove-Madsen L, Llach A, Bayes-Genís A, Roura S, Font ER, Arís A, Cinca J. Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation* 2004;**110**:1358–1363.
- Llach A, Molina CE, Prat-Vidal C, Fernandes J, Casado V, Ciriuela 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;**32**:721–729.
- Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca^{2+} currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999;**85**:428–436.
- Voigt N, Heijman J, Wang Q, Chiang DY, Li N, Karck M, Wehrens XH, Nattel S, Dobrev D. Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 2014;**129**:145–156.
- Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, SchönDube FA, Hasenfuss G, Maier LS. Camkii-dependent diastolic Ca^{2+} leak and elevated diastolic Ca^{2+} levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 2010;**106**:1134–1144.
- 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;**111**:2025–2032.
- 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^{2+} leak and increased Na^{+} - Ca^{2+} exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2012;**125**:2059–2070.
- Dinanian S, Boixel C, Juin C, Hulot JS, Coulombe A, Rucker-Martin C, Bonnet N, Le Grand B, Slama M, Mercadier JJ, Hatem SN. Downregulation of the calcium current in human right atrial myocytes from patients in sinus rhythm but with a high risk of atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2008;**29**:1190–1197.
- Herraz-Martínez A, Llach A, Tarifa C, Gandía J, Jiménez-Sabado V, Lozano-Velasco E, Serra SA, Vallmitjana A, Vázquez Ruiz de Castroviejo E, Benítez R, Aranega A, Muñoz-Guijosa C, Franco D, Cinca J, Hove-Madsen L. The 4q25 variant rs13143308t links risk of atrial fibrillation to defective calcium homeostasis. *Cardiovasc Res* 2019;**115**:578–589.
- 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;**107**:2459–2466.
- Herraz-Martínez A, Álvarez-García J, Llach A, Molina CE, Fernandes J, Ferrero-Gregori A, Rodríguez C, Vallmitjana A, Benítez R, Padró JM, Martínez-González J, Cinca J, Hove-Madsen L. Ageing is associated with deterioration of calcium homeostasis in isolated human right atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 2015;**106**:76–86.
- Molina CE, Abu-Taha IH, Wang Q, Roselló-Díez E, Kamler M, Nattel S, Ravens U, Wehrens XHT, Hove-Madsen L, Heijman J, Dobrev D. Profibrotic, electrical, and calcium-handling remodeling of the atria in heart failure patients with and without atrial fibrillation. *Front Physiol* 2018;**9**:18.
- Yang HY, Firth JM, Francis AJ, Alvarez-Laviada A, MacLeod KT. The effect of ovariectomy on intracellular calcium (Ca^{2+}) regulation in guinea pig cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017;**313**:H1031–H1043.
- Yaras N, Tuncay E, Purali N, Sahinoglu B, Vassort G, Turan B. Sex-related effects on diabetes-induced alterations in calcium release in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**293**:H3584–H3592.
- Bai CX, Kurokawa J, Tamagawa M, Nakaya H, Furukawa T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation* 2005;**112**:1701–1710.
- Llach A, Molina CE, Fernandes J, Padró J, Cinca J, Hove-Madsen L. Sarcoplasmic reticulum and L-type Ca^{2+} channel activity regulate the beat-to-beat stability of calcium handling in human atrial myocytes. *J Physiol* 2011;**589**:3247–3262.
- Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS, Huang SK, Tseng YZ, Lien WP. Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca^{2+} -ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban: an insight into the mechanism of atrial electrical remodeling. *J Am Coll Cardiol* 1999;**33**:1231–1237.
- Brundel IC, Henning RH, Tuinenburg AE, Deelman LE, Tieleman RG, Grandjean JG, van Gilst WH, Crijns HJ. Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:9.
- Schotten UHH, Frechen D, Greiser M, Stellbrink C, Vazquez-Jimenez JF, Morano I, Allesie MA, Hanrath P. The L-type Ca^{2+} -channel subunits α_{1c} and β_{2} are not downregulated in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2003;**35**:6.
- Carnes CA, Janssen PM, Ruehr ML, Nakayama H, Nakayama T, Haase H, Bauer JA, Chung MK, Fearon IM, Gillinov AM, Hamlin RL, Van Wagoner DR. Atrial glutathione content, calcium current, and contractility. *J Biol Chem* 2007;**282**:28063–28073.
- Rusconi F, Ceriotti P, Miragoli M, Carullo P, Salvarani N, Rocchetti M, Di Pasquale E, Rossi S, Tessari M, Caprari S, Cazade M, Kunderfranco P, Chemin J, Bang M-L, Potticelli F, Zaza A, Faggian G, Condorelli G, Catalucci D. Peptidomimetic targeting of Ca_v2 overcomes dysregulation of the L-type calcium channel density and recovers cardiac function. *Circulation* 2016;**134**:534–546.
- Shanmugam MM, Gao S, Severac-Bastide R, Fischmeister R, Babu GJ. Decreased sarcoplipin protein expression and enhanced sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} uptake in human atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;**410**:4.
- Glukhov AV, Kalyanasundaram A, Lou Q, Hage LT, Hansen BJ, Belevych AE, Mohler PJ, Knollmann BC, Periasamy M, Gyorke S, Fedorov VV. Calsequestrin 2 deletion causes sinoatrial node dysfunction and atrial arrhythmias associated with altered sarcoplasmic reticulum calcium cycling and degenerative fibrosis within the mouse atrial pacemaker complex1. *Eur Heart J* 2015;**36**:686–697.
- Lou Q, Belevych AE, Radwański PB, Liu B, Kalyanasundaram A, Knollmann BC, Fedorov VV, Gyorke S. Alternating membrane potential/calcium interplay underlies repetitive focal activity in a genetic model of calcium-dependent atrial arrhythmias. *J Physiol* 2015;**593**:1443–1458.
- Reil J-C, Hohl M, Selejan S, Lipp P, Drautz F, Kazakow A, Münz BM, Müller P, Steendijk P, Reil G-H, Allesie MA, Böhm M, Neuberger H-R. Aldosterone promotes atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2012;**33**:2098–2108.
- Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Osuna L, Almedral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto Á, 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;**55**:2346–2354.

Translational perspective

Statistical analysis taking into account confounding effects of concurrent disease, risk factors, and treatments revealed differential sex-dependent alterations of the calcium homeostasis in AF. The analysis suggests that suppression of calcium release-induced membrane depolarizations with adenosine receptor antagonists may be efficient in women with AF only while therapies aiming to restore L-type calcium current may be more efficient in males with AF.

ANEXO II

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Doña Milagros Alonso Martínez, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundació de Gestió Sanitària del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor, para que se realice el estudio:

TÍTULO: Identificación de factores de riesgo moleculares y electrofisiológicos, que conllevan un mayor riesgo de padecer fibrilación auricular - (AF-RISK_2015) - LEIF HOVE-MADSEN			
PROMOTOR: L. HOVE-MADSEN			
CÓDIGO	Nº EudraCT	VERSIÓN	Ref. HSCSP
AF-RISK_2015	NO PROCEDE	v. 1 de fecha 29/09/2014	15/285 (OTROS)
-Hoja de Información al Participante y Consentimiento Informado, versión 1 de fecha 29/09/2014			

Y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- La capacidad de los investigadores y las instalaciones y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como el plan de reclutamiento de los sujetos, así como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por tanto este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado en el **Centro de Investigación Cardiovascular CSIC-ICCC (Barcelona)** por el Dr. L. Hove-Madsen como investigador principal.

Lo que firmo en Barcelona, a 30 de noviembre de 2015



Dra. Milagros Alonso Martínez



TÍTULO: Identificación de factores de riesgo moleculares y electrofisiológicos, que conllevan un mayor riesgo de padecer fibrilación auricular - (AF-RISK_2015) - LEIF HOVE-MADSEN			
PROMOTOR: L. HOVE-MADSEN			
CÓDIGO	Nº EudraCT	VERSIÓN	Ref. HSCSP
AF-RISK_2015	NO PROCEDE	v. 1 de fecha 29/09/2014	15/285 (OTROS)
-Hoja de Información al Participante y Consentimiento Informado, versión 1 de fecha 29/09/2014			

Dña. **MILAGROS ALONSO MARTÍNEZ**, SECRETARIA DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE LA FUNDACIÓ DE GESTIÓ SANITÀRIA DEL HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU DE BARCELONA,

HACE CONSTAR QUE:

- 1º En la reunión celebrada el día 27 de noviembre de 2015, se decidió emitir el informe correspondiente al estudio de referencia.
- 2º En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente – Real Decreto 223/2004 – para que la decisión del citado CEIC sea válida.
- 3º El CEIC del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, tanto en composición como en sus PNTs, cumple con las normas de BPC.
- 4º La composición del CEIC del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau es el siguiente:

Presidente:

Dr. Antonio López Pousa. Médico. Especialista en Oncología Médica

Vicepresidente:

Dr. Gerard Urrútia Cuchí. Médico. Especialista en Epidemiología.

Secretaria:

Dra. Milagros Alonso Martínez. Médico. Especialista en Farmacología Clínica. Máster en Bioética y Derecho. Comité de Ética Asistencial.

Vocales:

- Sra. Ester Amado Guirado. Farmacéutica de Atención Primaria.
Sra. M^a Teresa Ricart Basagaña. Diplomada en Enfermería.
Dr. Josep Corbella Duch. Doctor en Derecho. Comité de Ética Asistencial.
Dr. Francesc Jané Carrencà. Médico. Especialista en Farmacología Clínica.
Dr. Xavier León Vintró. Médico. Especialista en Otorrinolaringología.
Dr. Jordi Mancebo Cortés. Médico. Especialista en Medicina Intensiva.
Sra. Estela Moreno Martínez. Farmacéutica. Especialista en Farmacia Hospitalaria.
Dr. Javier Pagonabarraga Mora. Especialista en Neurología.
Sra. M^a Virtudes Pacheco. Asistente social. Unidad de Atención al Usuario.
Sra. Margarida Messeguer Rofes. Persona ajena a les profesiones sanitarias y a la Institución.

Barcelona, a 30 de noviembre de 2015

Dra. Milagros Alonso Martínez

FUNDACIÓ DE GESTIÓ SANITÀRIA DE
L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU
COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA

