



# Estudi de la Fibril·lació Auricular: de la fisiopatologia al tractament

Eduard Guasch i Casany

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# **Estudi de la Fibril·lació Auricular: de la fisiopatologia al tractament**

Tesi presentada per Eduard Guasch i Casany  
per a optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Doctorand: Eduard Guasch i Casany

Director: Lluís Mont Girbau

Departament de Medicina, Universitat de Barcelona

Barcelona, 2012







## ÍNDEX GENERAL

INDEX DE FIGURES .....	V
INDEX DE TAULES .....	IX
SOBRE LA TESI .....	XI
LLISTA D'ABREVIATURES.....	XV
<b>1. ANTECEDENTS .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Fisiologia de la conducció elèctrica.....</b>	<b>5</b>
1.1.1. Gènesi del potencial de membrana.....	6
1.1.2. Configuració del potencial d'acció .....	7
1.1.3. Acoblament excitació-contracció.....	10
<b>1.2. Fisiopatologia de la FA .....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Etiologia .....	11
1.2.1.1. <i>Cardiopatia</i> .....	12
1.2.1.2. <i>Factors genètics</i> .....	12
1.2.1.3. <i>Factors extrínsecs</i> .....	13
1.2.2. Remodelat.....	14
1.2.2.1. <i>Remodelat estructural</i> .....	14
1.2.2.2. <i>Remodelat autonòmic</i> .....	17
1.2.2.3. <i>Remodelat elèctric</i> .....	18
1.2.3. Mecanismes bàsics .....	19
1.2.3.1. <i>Reentrada</i> .....	19
1.2.3.2. <i>Activitat desencadenada</i> .....	20
<b>1.3. Exercici físic i aritmogènesi .....</b>	<b>21</b>
<b>1.4. Tractament.....</b>	<b>23</b>
1.4.1. Tractament antiarítmic .....	23
1.4.2. Tractament del substrat.....	24
1.4.3. Procediments d'ablació .....	25

1.4.4.	Prevençió tromboembòlica .....	26
<b>1.5.</b>	<b>Fisiologia cardíaca i microRNA.....</b>	<b>28</b>
<b>2.</b>	<b>OBJECTIU GENERAL.....</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>SUBPROJECTE 1: ESTUDI DELS EFECTES ARITMOGÈNICS DE L'EXERCICI FÍSIC DE RESISTÈNCIA EN UN MODEL ANIMAL.....</b>	<b>33</b>
3.1.	Justificació.....	33
3.2.	Hipòtesi.....	36
3.3.	Objectius.....	36
3.4.	Mètodes .....	36
3.5.	Resultats .....	49
3.6.	Conclusions .....	59
<b>4.</b>	<b>SUBPROJECTE 2: ESTUDI DE LA PARTICIPACIÓ DE MIR-21 EN EL REMODELAT ESTRUCTURAL AURICULAR I POTENCIAL TERAPÈUTIC .....</b>	<b>61</b>
4.1.	Justificació.....	61
4.2.	Hipòtesis .....	62
4.3.	Objectius.....	63
4.4.	Mètodes .....	63
4.5.	Resultats .....	70
4.6.	Conclusions .....	80
<b>5.</b>	<b>SUBPROJECTE 3: ESTUDI D'EFICÀCIA I SEGURETAT DE LA TRIPLE COMBINACIÓ ANTITROMBÒTICA.....</b>	<b>81</b>
5.1.	Justificació.....	81
5.2.	Hipòtesi.....	82
5.3.	Objectius.....	83
5.4.	Mètodes .....	83
5.5.	Resultats .....	90
5.5.1.	Estudi retrospectiu.....	90
5.5.2.	Estudi prospectiu.....	92
5.6.	Conclusions .....	97

<b>6. DISCUSIÓ</b> .....	<b>99</b>
<b>6.1. Models animals en l'estudi de la FA</b> .....	<b>99</b>
<b>6.2. Fisiopatologia de la FA</b> .....	<b>103</b>
6.2.1. Fisiopatologia de la FA de l'esportista.....	103
6.2.2. Paper de miR-21 en el remodelat estructural auricular .....	106
<b>6.3. Tractament i prevenció de la FA</b> .....	<b>107</b>
<b>7. CONCLUSIONS GLOBALES</b> .....	<b>115</b>
<b>8. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES</b> .....	<b>117</b>
<b>9. ANNEX: Publicacions</b> .....	<b>137</b>





## **INDEX DE FIGURES**

FIGURA 1: PRIMERS REGISTRES ECG PUBLICATS DE PACIENTS AMB FA. ....	2
FIGURA 2: EVOLUCIÓ DEL NÚMERO D'ARTICLES PUBLICATS CADA ANY SOBRE LA FA EN ELS DARRERS 10 ANYS .....	4
FIGURA 3: ESQUEMA DEL SISTEMA DE CONDUCCIÓ ELÈCTRICA EN EL COR .....	5
FIGURA 4: EQUILIBRI IÒNIC DELS MIÒCITS DURANT EL REPÒS .....	7
FIGURA 5: MORFOLOGIA DEL PÀCC AURICULAR I PRINCIPALS CORRENTS IÒNIQUES IMPLICADES EN LA SEVA CONFIGURACIÓ. ....	8
FIGURA 6: REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DE LA FISIOPATOLOGIA DE LA FA. ....	11
FIGURA 7: MECANISMES PELS QUE LA FIBROSI INTERSTICIAL ALTERA LA CONDUCCIÓ CARDÍACA. ....	15
FIGURA 8: SÍNTESI DELS ESTUDIS CLÍNICS QUE RELACIONEN EXERCICI FÍSIC I FA .....	23
FIGURA 9: LLOC D'ACTUACIÓ EN LA CASCADA DE LA COAGULACIÓ DELS ANTICOAGULANTS USATS EN ESTUDI EN LA FA. ....	27
FIGURA 10: REPRESENTACIÓ DE LA SÍNTESI I ACTUACIÓ DELS MICRORNA .....	29
FIGURA 11: RESULTATS PREVIS OBTINGUTS EN EL MODEL D'EXERCICI FÍSIC DE RESISTÈNCIA.. ....	35
FIGURA 12: CINTA RODANT UTILITZADA PER A L'ENTRENAMENT DE LES RATES.....	37
FIGURA 13: PREPARACIÓ PER UN ESTUDI ELECTROFISIOLÒGIC A UNA RATA. ....	39
FIGURA 14: QUANTIFICACIÓ DE L'INICI I DURACIÓ DE L'EFFECTE D'ATROPINA I PROPRANOLOL.....	43
FIGURA 15: MÈTODE EMPRAT PER A L'ESTIMACIÓ DEL TO PARASIMPÀTIC I TO SIMPÀTIC.....	44
FIGURA 16: MÈTODE EMPRAT PER A LA QUANTIFICACIÓ DE LA TINCIÓ DEL VERMELL DE PICROSIRIUS.. .....	45
FIGURA 17: APARELL DE LANGENDORF UTILITZAT PER A L'ÀLLAMENT ENZIMÀTIC DE MIÒCITS AURICULARS.....	47
FIGURA 18: PARÀMETRES ECOCARDIOGRÀFICS AURICULARS EN EL GRUP DE DESENTRENAMENT. 16 SETMANES. ....	50
FIGURA 19: QUANTIFICACIÓ DE LA FREQUÈNCIA CARDÍACA HORÀRIA EN ELS DIVERSOS PUNTS TEMPORALS DE L'EXPERIMENT DE REVERSIBILITAT .....	51
FIGURA 20: QUANTIFICACIÓ DE L'ÍNDEX PARASIMPÀTIC I SIMPÀTIC DESPRÉS DE 16 SETMANES D'EXERCICI.....	53

FIGURA 21: RESULTATS DELS REGISTRES ELECTROFISIOLÒGICS DE LES CORRENTS IÒNIQUES IMPLICADES EN LA REPOLARITZACIÓ DELS MÒCITS AURICULARS EN RATES;	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
FIGURA 22: QUANTIFICACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE MRNA DE LES SUBUNITAT QUE CONFORMEN EL CANAL IÒNIC RESPONSABLE D'I <sub>TO</sub> .	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
FIGURA 23: QUANTIFICACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE MRNA DE LES SUBUNITAT QUE FORMEN EL CANAL IÒNIC RESPONSABLE D'I <sub>CAL</sub> .	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
FIGURA 24: INDUCIBILITAT DE FA EN TOTS ELS GRUPS EXPERIMENTALS EN L'EXPERIMENT DE REVERSIBILITAT.	54
FIGURA 25: QUANTIFICACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE MRNA DE DIFERENTS MARCADORS DE FIBROSI MIOCÀRDICA EN AMB DUES AURÍCULES EN L'EXPERIMENT DE REVERSIBILITAT	57
FIGURA 26: QUANTIFICACIÓ DE LA FIBROSI INTERSTICIAL EN MOSTRES HISTOLÒGIQUES EN L'EXPERIMENT DE REVERSIBILITAT	58
FIGURA 27: VALORACIÓ DE L'ESTRÈS INDUIT PER L'EXERCICI	58
FIGURA 28: SONDES USADES PER A L'EXPERIMENT DE BLOQUEIG DE MIR-21	65
FIGURA 29: REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DELS 6 SEGMENTS PER A LA VALORACIÓ DEL WMSI.	69
FIGURA 30: RESULTATS DE LA MESURA DEL WMSI	70
FIGURA 31: RESULTATS DE L'ECOCARDIOGRAFIA EN LA DESCRIPCIÓ DEL MODEL D'INFART.	71
FIGURA 32: VALORACIÓ DE LA FIBROSI MIOCÀRDICA AURICULAR INDUÏDA PER L'INFART DE MIOCARDI.	72
FIGURA 33: QUANTIFICACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE MIR-21 I SPROUTY1.	73
FIGURA 34: QUANTIFICACIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE LES MAPK ERK1/2 EN AURÍCULA ESQUERRA	73
FIGURA 35: INDUCIBILITAT DE FA EN EL MODEL D'INFART DE MIOCARDI	75
FIGURA 36: QUANTIFICACIÓ DE MIR21 EN ELS DIFERENTS GRUPS EXPERIMENTALS.	76
FIGURA 37: PARÀMETRES ELECTROFISIOLÒGICS MESURATS EN TOTS ELS GRUPS EXPERIMENTALS DE L'EXPERIMENT DE BLOQUEIG DE MIR-21	76
FIGURA 38: DURACIÓ DE LA FA INDUÏDA DURANT L'EEF EN L'EXPERIMENT DE BLOQUEIG DE MIR-21	77
FIGURA 39: QUANTIFICACIÓ DE LA FIBROSIS INTERSTICIAL AURICULAR A LES 8 SETMANES.	78
FIGURA 40: DURACIÓ DE L'ONA P EN L'ECG EN L'EXPERIMENT DE BLOQUEIG DE MIR-21.	78
FIGURA 41: ALTRES INTERVALS ECG EN L'EXPERIMENT DE BLOQUEIG DE MIR-21	79
FIGURA 42: MESURES ECOCARDIOGRÀFIQUES EN TOTS ELS GRUPS EXPERIMENTALS EN L'EXPERIMENT DE BLOQUEIG DE MIR-21.	80

FIGURA 43: ESQUEMATITZACIÓ DEL SEGUIMENT D'UN PACIENT EN DUES ETAPES.....	85
FIGURA 44: ESQUEMA DE L'ESTUDI PROSPECTIU I DEFINICIÓ DELS GRUPS DE SEGUIMENT. ....	86
FIGURA 45: MÈTODES PER A ESTIMAR LA QUALITAT DE L'ANTICOAGULACIÓ. ....	89
FIGURA 46: TAXA DE COMPLICACIONS HEMORRÀGIQUES EN EL GRUP TT I DTP.....	91
FIGURA 47: ESQUEMA GLOBAL DELS PACIENTS INCLOSOS I GRUPS DE SEGUIMENT EN L'ESTUDI PROSPECTIU. .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
FIGURA 48: TRACTAMENT REBUT I SEGUIMENT EN L'ESTUDI PROSPECTIU .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
FIGURA 49: SUPERVIVÈNCIA LLIURE DE TROMBOSIS EN ELS GRUPS TT I DT EN L'ESTUDI PROSPECTIU.....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
FIGURA 50: TAXA D'HEMORRÀGIES EN ELS GRUP TT I DT EN L'ESTUDI PROSPECTIU. ....	96
FIGURA 51: TAXA D'HEMORRÀGIES AGREGADA EN ELS GRUPS TT I DTP. ....	97



## INDEX DE TAULES

TAULA 1: RESULTATS DE LA MEDICIÓ DE L'ECG I DE L'EEF EN L'EXPERIMENT DE REVERSIBILITAT....	55
TAULA 2: PARÈMETRES ECOCARDIOGRÀFICS VENTRICULARS EN L'ESTUDI DE REVERSIBILITAT. ....	52
TAULA 3: RESULTATS DE L'ESTUDI ELECTROFISIOLÒGIC EN EL MODEL D'INFART .....	74
TAULA 4: CARACTERÍSTIQUES DEMOGRÀFIQUES I INDICACIONS PER A L'ANTICOAGULACIÓ DELS PACIENTS INCLOSOS EN L'ESTUDI RETROSPECTIU.....	90
TAULA 5: CARACTERÍSTIQUES DELS SAGNATS EN AMBDÓS GRUPS TT I DTP EN L'ESTUDI RETROSPECTIU.....	92
TAULA 6: QUALITAT DE L'ANTICOAGULACIÓ VALORAT SEGONS ELS DOS MÈTODES DESCRITS EN L'ESTUDI RETROSPECTIU.....	92
TAULA 7: CARACTERÍSTIQUES BASALS DELS PACIENTS AMB INDICACIÓ DE TRIPLE TRACTAMENT..;	<b>ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
TAULA 8: CARACTERÍSTIQUES DE L'EPISODI QUE MOTIVA LA INDICACIÓ DE CORONARIOGRAFIA. ....	93
TAULA 9: COMPARACIÓ ENTRE LES CARACTERÍSTIQUES BASALS DELS PACIENTS DEL GRUP TT I DTP.;	<b>ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
TAULA 10: DESCRIPCIÓ DE LES COMPLICACIONS TROMBÒTIQUES EN CADASCUN DELS DOS GRUPS TT I DT EN L'ESTUDI PROSPECTIU. ....;	<b>ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
TAULA 11: QUALITAT EN EL NIVELL D'ANTICOAGULACIÓ EN L'AGREGAT DE TOTS ELS PACIENTS.;	<b>ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>



## SOBRE LA TESI

Els resultats exposats en aquesta tesi doctoral reflecteixen els resultats obtinguts en els darrers anys de la residència de Cardiologia i com a *fellow* a la Unitat d'Arítmies de l'Hospital Clínic i el grups IDIBAPS de Patologia experimental de l'IIBB/CSIC, així com durant la meua estada al laboratori del Dr Stanley Nattel des de Gener de 2010.

Està redactada i compleix amb els criteris de presentació en el format clàssic. Dels resultats aquí exposats, se n'ha derivat de forma directa una publicació original en la que el doctorand consta com a primer autor:

**Guasch E**, Sionis A, Reverter JC, Andrea R, Loma-Osorio P, Freixa X, Heras M. Safety issues of adjunctive clopidogrel in patients discharged after percutaneous coronary intervention with stent placement and requiring oral anticoagulation. *Int J Cardiol* 2011;146:e1-e4. FI 6.802 / Q1.

Així mateix, la resta de resultats que es presenten en aquesta tesi han sigut o seran publicats en les publicacions que s'indiquen a continuació. Tanmateix, per no estar acceptats encara per a publicació o figurar el doctorand com a quart autor, no poden constar per al còmput de la present tesi doctoral. Algunes d'aquestes publicacions formaran part també d'altres tesis doctorals (publicacions marcades amb #), sempre evitant la duplicació de resultats:

Benito B, Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, **Guasch E**, Shi Y, Tardif JC, Brugada J, Nattel S, Mont Ll. Cardiac Arrhythmogenic Remodeling in a Rat Model of Long-Term Intensive Exercise Training *Circulation* 2011;123:13-22. FI 14,816 / Q1 (#)

**Guasch E**(\*), Benito B(\*), Qi XY, Naud P, Shi Y, Tardif JC, Tadevosyan A, Chen Y, Gillis MA, Dobrev D, Mont L; Nattel S. Mechanisms of Atrial Fibrillation Promotion by Long-Term Endurance Exercise: Exploration in a Rat Model. *Enviat per a revisió a Circulation.* FI 14,816 / Q1.(#)



Cardin S(\*), **Guasch E**(\*), Luo X, Naud P, Le Quang K, Shi Y, Tardif JC, Comtois P, Nattel S. Mechanisms of atrial remodeling in ischemic heart failure: Could miR21 be a novel pharmacological target in AF prevention? (\*) Co-primers autors. *Enviat per a revisió a Circulation. FI 14,816 / Q1.*

Gay-Jordi G, **Guasch E**, Benito B, Brugada J, Nattel S, Mont Ll, Serrano-Mollar A. Losartan prevents heart fibrosis induced by long-term intensive exercise training in an rat model. *Enviat per a revisió a Cardiovascular Research. FI 6,051 / Q1*

El doctorand va ser autor, sota la supervisió del Dr. Stanley Nattel, de l'apartat de fisiopatologia del següent article del grup *AF Science* (format per investigadors reconeguts en el camp de la FA). Una part significativa de la introducció d'aquesta tesi en té l'origen. La Figura 6 de la present tesi doctoral va ser ideada i esquematitzada pel doctorand i publicada com a Figura 1 d'aquest article.

Camm AJ, Al-Khatib SM, Calkins HJ, Halperin JL, Kirchhof P, Lip GYH, Nattel S, Ruskin J, Banerjee A, Blendea D, **Guasch E**, Needleman M, Savelieva I, Viles-Gonzalez J, Williams ES. A proposal for new clinical concepts in the management of atrial fibrillation. *Acceptat a American Heart Journal.*

El següent article, escrit pel doctorand sota la supervisió del Dr. Lluís Mont, ha sigut font d'alguns apartats de la introducció i per a l'adaptació de la Figura 5:

**Guasch E**, Mont Ll. Ranolazine: potential therapy for arrhythmias?. *Rev Esp Cardiol Supl 2010(1):62A-72A.*

Tots els articles citats fins aquí, publicats o enviats per a revisió, es troben en l'annex d'aquesta tesi.

El doctorand ha participat també en els següents treballs originals sobre la fisiopatologia i tractament de la fibril·lació auricular:

Calvo N, Nadal M, Berruezo A, Andreu D, Arbelo E, Tolosana JM, **Guasch E**, Matiello M, Matas M, Alsina X, Sitges M, Brugada J, Mont L. Improved Outcomes and Complications of Atrial Fibrillation Catheter Ablation Over Time: Learning Curve, Techniques and Methodology Rev Esp Cardiol. 2012;65:131–138 IF 2.746 / Q2

Calvo N, Mont L, Tamborero D, Berruezo A, Viola G, **Guasch E**, Nadal M, Andreu D, Vidal B, Sitges M, Brugada J Efficacy of circumferential pulmonary vein ablation of atrial fibrillation in endurance athletes Europace 2010;12(1):30-6. IF 1.861 / Q3

Tamborero D, Mont L, Berruezo, A, **Guasch E**, Rios J, Nadal M, Matiello M, Andreu D, Sitges M, Brugada J. Circumferential Pulmonary Vein Ablation: does the use of a Circular Mapping Catheter improve results? A Prospective Randomized Study Heart Rhythm 2010;7:612-8. IF 4.559 / Q1

En les següents revisions, el doctorand ha tractat sobre els mecanismes electrofisiològics implicats en el remodelat cardíac per l'exercici físic i sobre la fisiopatologia de les arítmies ventriculars en pacients amb repolarització precoç:

Benito B(\*), **Guasch E**(\*), Rivard L, Nattel S. Clinical and Mechanistic Issues in Early Repolarization: of Normal Variants and Lethal Arrhythmia Syndromes. J Am Coll Cardiol 2010;56:1177-86. (\*) Co-primers autors. IF 12.640 / Q1

**Guasch E**, Benito B, Nattel S. Exercise training, inflammation and heart failure: Working out to cool down J Physiol 2010;588(14):2525-2526. IF 4.764 / Q1

Naud P(\*), **Guasch E**(\*), Nattel S. Physiological versus pathological cardiac electrical remodelling: Potential basis and relevance to clinical manegement. J Physiol 2010;588(24):4855–4856. (\*) Co-primers autors. IF 4.764 / Q1



## **LLISTA D'ABREVIATURES**

DT: doble tractament antitrombòtic

DTp: doble tractament antitrombòtic posterior a TT

ECG: electrocardiograma

EEF: estudi electrofisiològic

EEM: Error estàndard de la mitja

Erk1/2: *extracellular signal-regulated kinases 1/2*

FA: Fibril·lació auricular

IM: infart de miocardi

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

miRNA: micro RNA

mRNA: RNA missatger

PAcc: potencial d'acció

RT-PCR: *real time – polymerase chain reaction*

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TT: Triple tractament antitrombòtic (aspirina, tienopiridina, anticoagulació oral)



# 1 ANTECEDENTS

## 1. A

Molt ha canviat la concepció que tenim de la fibril·lació auricular (FA) des de la visualització per primer cop de *fremissement fibrillaire* induïda en aurícules de gos el 1874 o la seva expressió semiològica en un pols irregular i d'amplitud variable en humans, anomenat llavors *delirium cordis*, un any després.<sup>1</sup> El 1909, Lewis descrivia les característiques bàsiques dels pacients amb FA i les distingia del “nodal rhythm”.<sup>2</sup> Poc després publicava dos registres electrocardiogràfics en FA i definia les ones *f* (Figura 1).<sup>3,4</sup>

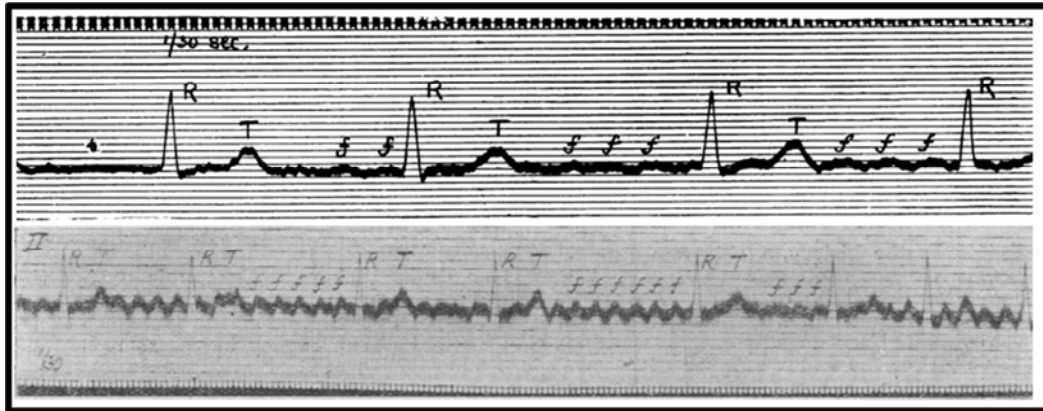


Figura 1: Dos dels primers registres ECG publicats de pacients amb FA. Reproduït de Lewis T<sup>3,4</sup>

Durant molt temps s'havia considerat la FA com una variant de la normalitat, sense significat patològic, però tot i això avui utilitzem fàrmacs antiarítmics-aritmogènics, suggerim als pacients complexos procediments d'ablació i receptem tractaments anticoagulants que requereixen un seguiment rigorós. Durant molt de temps ens ha estat passant per davant, i no l'hem sabut reconèixer, tal com preveia, sense saber-ho, Lewis en una conferència al University College Hospital de Londres, fa just un segle (1912):<sup>3</sup>

**“ The history of the recognition of fibrillation of the auricles will impress you with the dimness of our eyes and the opacity of the obstacles which embarrass our vision. You will know how blind we have been to things which, once seen, are so apparent. ”**

Clínicament, la FA es caracteritza per una pèrdua de la sincronia contràctil de les aurícules, que es contrauen de forma desorganitzada, com un “sac de cucs”. En l'ECG la identifiquem per la manca d'ones P i la seva substitució per les anomenades ones *f* a una freqüència de

400-600 bpm. El node aurículo-ventricular actua de filtre i permet una freqüència ventricular menor, però irregular.

A nivell epidemiològic, la FA és l'arítmia cardíaca més freqüent, i la seva prevalença segueix incrementant-se no només pel creixement en valors absoluts de la població i el seu envelliment, sinó que augmenta després d'ajustar per sexe i edat.<sup>5</sup> En edats mitges de la vida, la prevalença se situa entorn al 1%, però s'incrementa ràpidament amb l'edat.<sup>6</sup> Es calcula que el risc de patir FA en algun moment de la vida per a una persona de 55 anys és d'un 25%.<sup>7,8</sup>

Al diagnòstic de FA l'acompanya una elevada morbi-mortalitat. El trombo-embolisme cerebral és la complicació més temuda. Els pacients amb FA no tractats tenen un increment de risc d'accident vascular cerebral més de 5 vegades superior a la població sense FA.<sup>9</sup> En aparèixer de forma sobtada, la incapacitació ocasionada per un ictus en un pacient amb FA és major, i la mortalitat de l'episodi agut és doble, en comparació als ictus apareguts en pacients sense arítmia.<sup>10</sup> Globalment, després d'ajustar pel sexe, edat i altres factors de risc cardiovascular, la FA dobla la mortalitat en la població afectada.<sup>11</sup>

L'elevada prevalença i morbi-mortalitat associada a la FA té no sols un elevat impacte social i en el malalt, també requereix una elevada despesa econòmica. Diversos estudis estimen que el cost directe per pacient se situa de mitja entre 1000 i 6000 € anuals en funció del país i les característiques del pacient i de la FA. La major part del cost prové de la despesa derivada dels ingressos hospitalaris per l'arítmia o les seves complicacions.<sup>12</sup> A nivell nacional representava un 0,62% de la despesa del National Health Service al Regne Unit el 1995, que es va incrementar fins al 0,97% l'any 2000.<sup>13</sup> En 5 anys, el pes relatiu de la FA en el



pressupost nacional de salut s'havia incrementat un 50%, fins i tot abans de la popularització dels procediments d'ablació i de l'aparició de nous fàrmacs antiarítmics i anticoagulants.

L'impacte social i econòmic s'ha reflectit en un interès científic creixent. En els darrers deu anys, el número de publicacions a *ISI Web of Knowledge* sota el terme de búsqueda "atrial fibrillation" s'ha multiplicat per un valor superior a 2 (Figura 2A), un increment relatiu superior a les publicacions sota el terme "heart" o "heart failure" (Figura 2B).

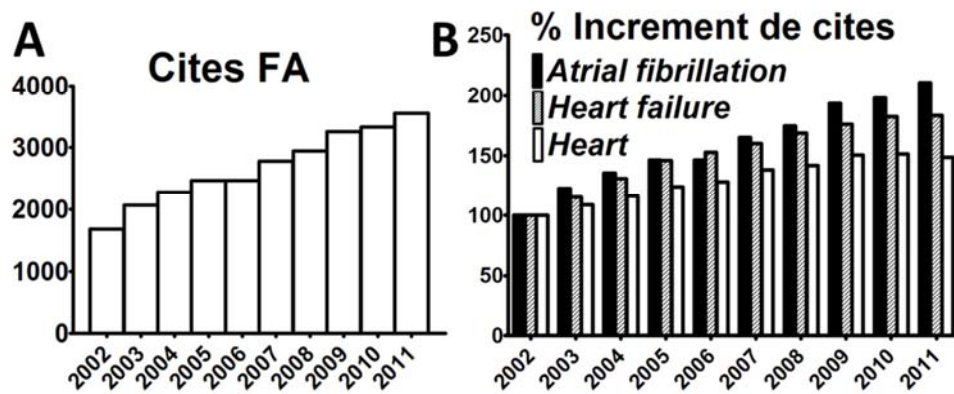


Figura 2: Evolució del número d'articles publicats cada any sobre la FA. (A) Articles publicats sobre "fibril·lació auricular" en els darrers anys. (B) Comparació de l'increment relatiu de publicacions en comparació a les publicacions sobre "insuficiència cardíaca" o "cor" en els darrers el mateix període. Dades extretes d'*ISI Web of Knowledge*

Amb tot, el coneixement que tenim avui en dia de la FA és encara molt parcial. No en tenim una visió de conjunt, sinó petites parcel·les no connectades entre sí i que donen una visió molt reduïda. Una proporció propera al 10% de pacients s'etiqueten com a "FA aïllada",<sup>14</sup> és a dir, d'etiologia i fisiopatologia desconeguda. Encara no entenem, i sovint no s'accepta, com una activitat considerada saludable com l'exercici físic en pot ser un factor de risc. Moltes de les teories de meitats del segle passat sobre els mecanismes bàsics de la FA són encara vàlids, sense que haguem pogut confirmar-los ni rebutjar-los definitivament. Encara més, el tractament dista molt de ser ni tan sols adequat, els fàrmacs són poc selectius i tenen efectes

secundaris freqüents, les combinacions són perilloses, i el temor de sagnats i arítmies potencialment mortals sempre està present quan tractem un pacient amb “*només una fibril·lació auricular*”. Queda encara molt per aprendre...

### 1.1. Fisiologia de la conducció elèctrica

El batec cardíac resulta del desplaçament d'un estímul elèctric per tot el cor. Quan els miòcits són excitats elèctricament es promou l'entrada cíclica de calci i desencadena l'activitat contràctil. En condicions fisiològiques, l'estímul elèctric s'origina en el node sinusal, situat a la porció alta de l'aurícula dreta, prop de la vena cava superior. A partir del node sinusal l'impuls elèctric es propaga per la resta del cor per unes vies de conducció preferencial, que inclouen el feix de Bachmann fins a l'aurícula esquerra, i el node auriculoventricular, el feix de His i les seves branques, i les fibres de Purkinje, fins a ambdós ventricles (Figura 3).

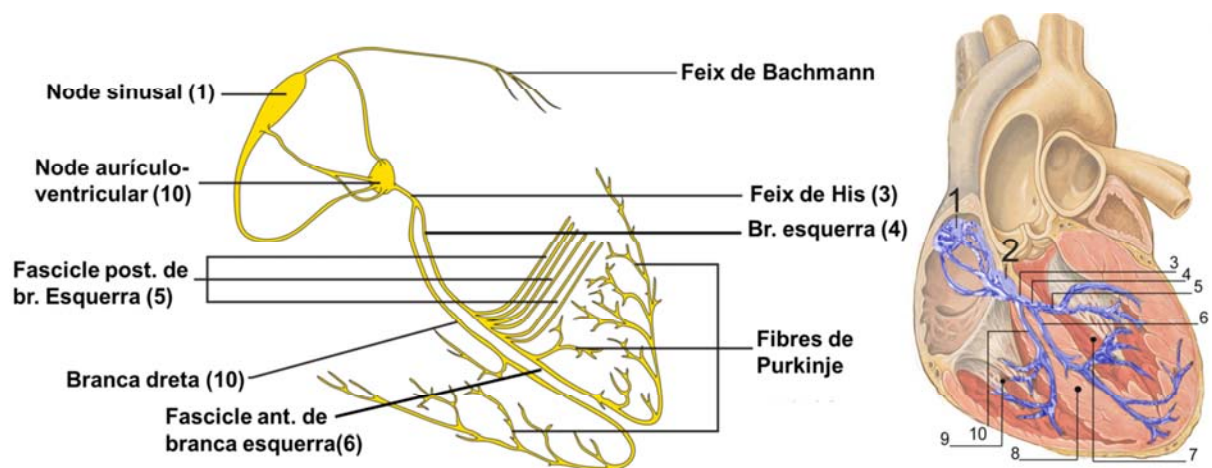


Figura 3: Esquema del sistema de conducció elèctrica en el cor, amb les principals vies indicades en groc (esquerra) o blau (dreta). Modificat de Wikimedia Commons, sota llicència Commons.

### 1.1.1. Gènesi del potencial de membrana

La concentració d'ions en l'interior i l'exterior de les cèl·lules difereix significativament. En miòcits en repòs, sense activitat espontània, hi ha un predomini d'ions negatius en l'interior del miòcit en comparació amb l'espai extracel·lular (Figura 4), generant una diferència de potencial entre ambdues vessants de la membrana. Per conveni, la diferència de potencial de la membrana, es defineix com a:

$$ddp = (\text{potencial exterior}) - (\text{potencial interior})$$

resultant en un potencial de membrana amb un valor negatiu.

Els ions difonen d'una banda a l'altra de la membrana en funció de la conductivitat de la membrana, i del gradient elèctric i de concentració. El potencial de Nernst és la diferència de potencial a la que no s'observa un moviment net d'ions a través de la membrana, ja la difusió a favor del gradient elèctric s'equilibra amb la difusió a favor de gradient de concentració (Figura 4B). Els ions tendiran a difondre's per a modificar el potencial de membrana i assolir el seu potencial de Nernst.

La membrana lipídica és impermeable al pas d'ions i la seva conductivitat depèn de l'obertura dels canals iònics que en permeten la difusió. Cada canal iònic sol ser més específic per a un ió (que li dona nom) que per als altres, i es pot trobar a la membrana en un estat obert, tancat o inactiu. El pas d'un estat a un altre és variable i específic en cada canal. En general, un canal s'obre quan el potencial de membrana assoleix un valor llindar, i s'inactiva o es tanca per un procés dependent de temps i/o voltatge.

En repòs, els únics canals oberts són de potassi ( $I_{K1}$ ). El potencial de membrana, doncs, serà molt proper al potencial de Nernst del potassi, ja que la resta d'ions difonen molt mínimament. La intensitat de la corrent de potassi  $I_{K1}$  és major a ventricle que a aurícula, propiciant que el potencial de repòs sigui de de 5 a 10 mV menys negatiu a l'aurícula ( $\sim -80$  mV) que en el ventricle ( $\sim -90$ mV)

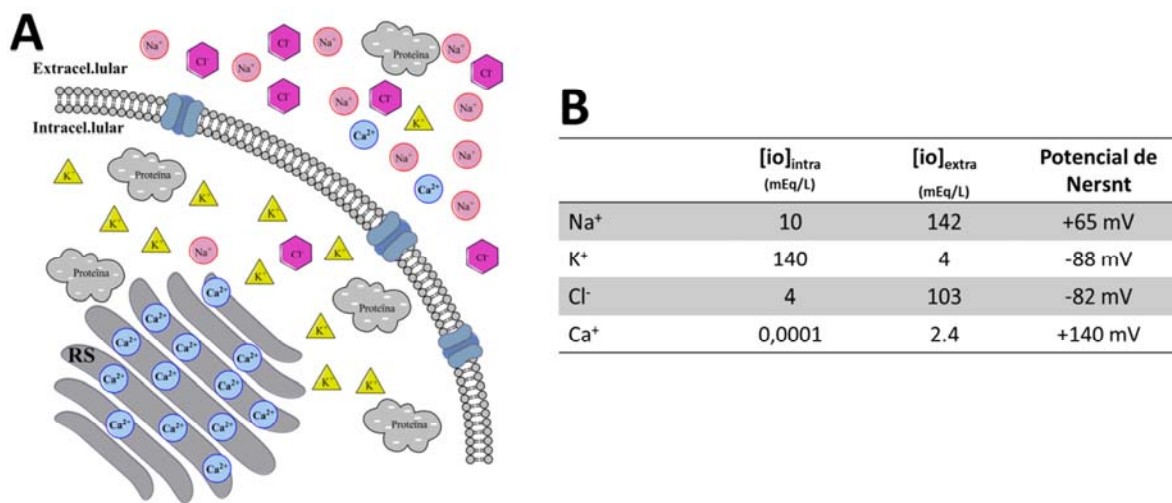


Figura 4: Equilibri iònic dels miòcits durant la fase de repòs. (A) Representació de la distribució en el citoplasma i espai intersticial dels principals ions implicats en el PAcc. (B) Concentració a l'interior i exterior de la cèl·lula i potencial de Nernst per a cada ió. RS: reticle sarcoplasmàtic.

### 1.1.2. Configuració del potencial d'acció

El potencial d'acció (PAcc) és la unitat bàsica de la transmissió de l'estímul elèctric i representa el canvi del potencial de membrana en funció del temps en un punt determinat de la membrana del miòcit. A la Figura 5 s'hi representa un esquema de la morfologia d'un PAcc. L'obertura i inactivació dels canals iònics generen corrents transmembrana que modifiquen el potencial de membrana i confeccionen la morfologia del PAcc.

El PAcc s'inicia quan una porció de membrana es despolaritza lleument ( $\sim -70$ mV) com a

conseqüència de la fase 0 d'una zona adjacent. En miòcits humans, aquesta lleu despolarització desencadena l'obertura dels canals de sodi i la fase 0 del PAcc. En la fase 0, l'entrada a la cèl·lula de grans quantitats de sodi amb càrrega positiva, modifica i positivitza el potencial de membrana. La corrent ràpida de sodi s'inactiva en pocs milisegons. El voltatge positiu en la membrana activa la corrent de sortida de potassi  $I_{to}$ , que inicia la repolarització en la fase 1 del PAcc.  $I_{to}$  s'inactiva ràpidament i dona pas a la meseta del PAcc (fase 2), caracteritzada per una fase d'equilibri entre les corrents despolaritzants i repolaritzants. Les magnituds de  $I_{CaL}$  i  $I_{NaL}$  (corrent lenta de sodi, romanent de la corrent ràpida de sodi) per una banda, i per les diverses corrents de sortida de potassi d'altra banda ( $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ , més  $I_{Kur}$  a l'aurícula) són similars, i la corrent neta a través de la membrana és gairebé nul·la. La inactivació progressiva de  $I_{CaL}$  i la intensitat creixent de les diverses corrents de potassi repolaritzen el miòcit fins a retornar al potencial de repòs (fase 4).

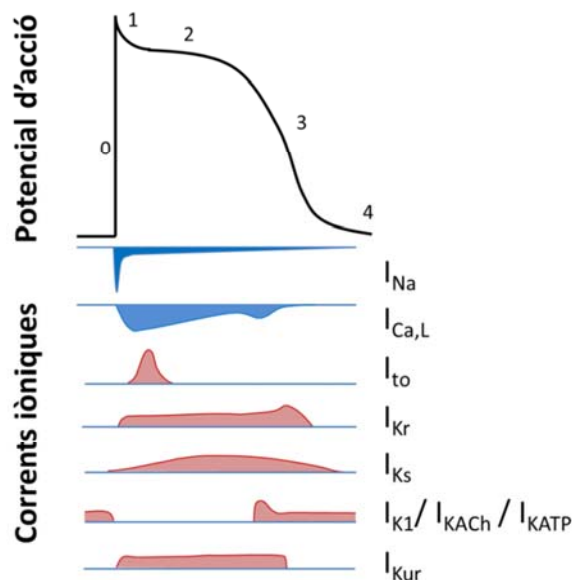


Figura 5: Morfologia del PAcc auricular i principals corrents iòniques implicades en la configuració del PAcc auricular. En blau, les corrents despolaritzants (d'entrada), en vermell repolaritzants (de sortida).

La corrent de potassi  $I_{K1}$  posseeix propietats de rectificació. L'entrada d'ions de potassi per sota del potencial de Nernst és proporcional al voltatge de membrana. Per contra, la corrent de sortida s'incrementa lleugerament més enllà del potencial de Nernst, però es redueix dràsticament més enllà. D'aquesta manera,  $I_{K1}$  s'inactiva a voltatges positius, durant la despolarització del miòcit, però s'obre novament en la fase 3 tardana, participant en la darrera fase de la repolarització. En la fase 4,  $I_{K1}$  és la principal conductància activa i, tal com s'ha descrit, fixa el potencial de membrana en repòs del miòcit. Tot i que en menor intensitat, dues corrents dependents de lligants,  $I_{KATP}$  i  $I_{KACH}$ , també tenen característiques de rectificació i propietats similars a  $I_{K1}$ .

Els canvis en la presència, intensitat o característiques de cadascuna d'aquestes corrents implica canvis en les característiques del PAcc i de les propietats electrofisiològiques del miòcit.

La despolarització durant la fase 0 d'un segment de membrana modifica per contigüitat el potencial de membrana de la porció de membrana adjacent i permet la conducció longitudinal en els miòcits. El salt de miòcit a miòcit és facilitat per unions intercel·lulars especialitzades formades per unes proteïnes anomenades connexines. Les connexines formen porus que comuniquen el citoplasma de cèl·lules adjacents i hi permeten el pas d'ions, formant un sinciti funcional. En l'ésser humà s'han descrit 21 tipus de connexines, distribuïdes per tot l'organisme. A nivell auricular, la principal és la Cx 40. Tot i que en els primers mesos de vida les connexines tendeixen a distribuir-se més o menys homogèniament en tota la membrana del miòcit, posteriorment es disposen a les unions termino-terminal;<sup>15</sup> consegüentment, en cors adults la conducció en la direcció paral·lela a la disposició dels

miòcits és més ràpida que en la direcció perpendicular. Aquesta conducció longitudinal preferencial es coneix com a anisotropia.

### 1.1.3. Acoblament excitació-contracció

L'entrada de calci durant la fases 1 i 2 del PAcc a través dels canals tipus L de calci ( $I_{CaL}$ ) incrementa la concentració citoplasmàtica de calci. Aquest increment és sensat pel receptor de ryanodina (RyR), que en presència de calci citoplasmàtic allibera grans quantitats del calci emmagatzemat a l'interior del reticle sarcoplasmàtic. En condicions de repòs, el reticle sarcoplasmàtic conté una concentració de calci 10000 vegades superior al citoplasma. El calci s'uneix a troponina C, ocasionant un canvi conformacional que permet a la miosina interaccionar amb els miofilaments d'actina, iniciant la contracció. La concentració citoplasmàtica de calci es redueix posteriorment mitjançant la reintroducció al reticle sarcoplàsmic per un transportador dependent d'ATP (SERCA, *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) o la seva extrusió a l'espai extracel·lular a través de l'intercanviador de Na-Ca (NCX). L'activitat de SERCA és regulada per la seva unió a fosfolamban (PLB). En estat no fosforilat, PLB s'uneix i inhibeix SERCA. Quan el PLB es fosforila per la protein-kinasa dependent d'AMP<sub>c</sub> (PKA) perd la capacitat d'inhibició sobre SERCA, que internalitza i incrementa la concentració de calci en l'interior del reticle sarcoplàsmic (que posteriorment serà alliberat durant la contracció). La isoforma II de la protein-kinasa dependent de Ca<sup>2+</sup>/calmodulin (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase*, CAMK-II) té una funció essencial en regular aquest procés mitjançant la fosforilació de PLB, SERCA, RyR i  $I_{Ca,L}$ .

## 1.2. Fisiopatologia de la FA

Tot i que prèviament s'havia considerat a la FA com una activació caòtica i desorganitzada del miocardi auricular, avui sabem que és una patologia organitzada, jerarquitzada i amb uns mecanismes fisiopatològics definits.

En una visió esquemàtica representada a la Figura 6, les diverses etiologies de la FA (anell extern, vermell) indueixen un remodelat auricular a diversos nivells (estructural, autonòmic i electrofisiològic, en l'anell mig, en verd) que condueix als fenòmens elèctrics (reentrada, mecanismes focals, en l'anell interior) que són la base de la FA.

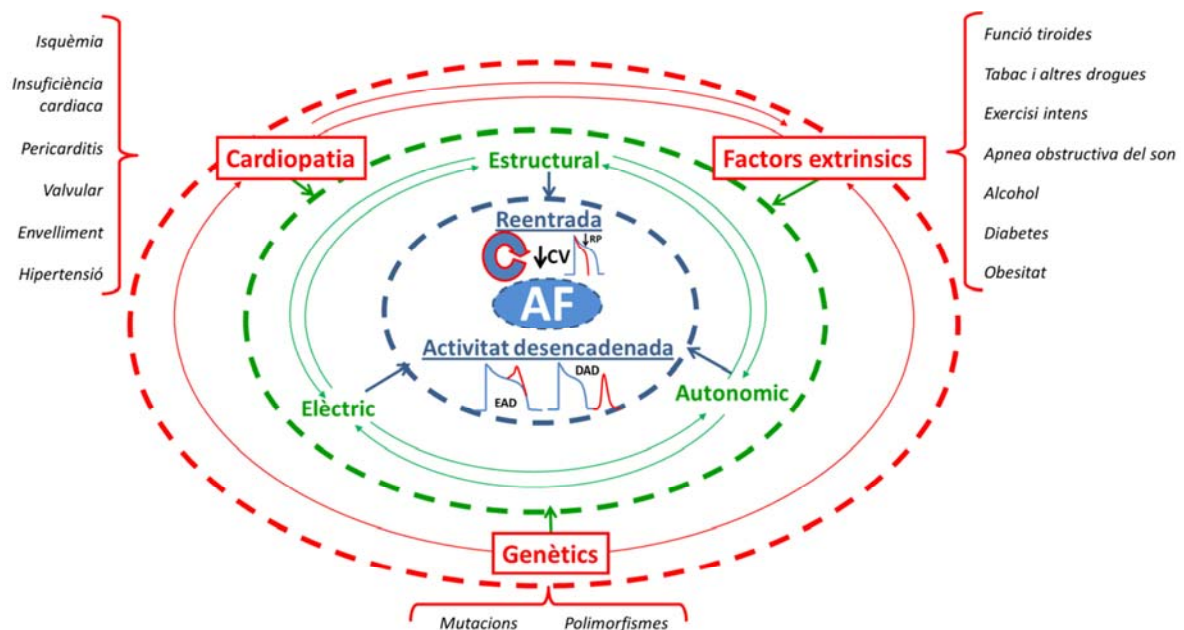


Figura 6: Representació esquemàtica de la fisiopatologia de la FA. En l'anell exterior (vermell) s'hi representen les etiologies que condueixen al desenvolupament d'un remodelat auricular (anell central, verd), responsables dels mecanismes electrofisiològics bàsics (anell central, blau). Adaptat de *Camm AJ et al.*<sup>16</sup>

### 1.2.1. Etiologia

Si els mecanismes que condueixen al desenvolupament de FA són múltiples, les etiologies que les originen són extremadament variades. Les cardiopaties estructurals són les majors



contribuïdores a l'epidemiologia de la FA, però el paper modulador dels factors genètics és cada cop més reconegut. En aproximadament un 10% de pacients no és possible identificar una cardiopatia subjacent tot i un estudi sistemàtic.<sup>14</sup> En aquests casos s'aplica la denominació de FA aïllada, i estudis recents apunten a diversos factors extrínsecs com a desencadenants.

#### *1.2.1.1. Cardiopatia*

Les cardiopaties contribueixen de forma molt important a l'epidemiologia de la FA. La insuficiència cardíaca, camí final comú de moltes cardiopaties, indueix un substrat proarítmic complex, que inclou canvis estructurals,<sup>17</sup> elèctrics<sup>18</sup> i autonòmics.<sup>19</sup> L'edat és el predictor més potent de FA, però el coneixement de la seva fisiopatologia dista molt del que la seva importància de salut pública mereix. L'increment de l'anisotropia degut a la fibrosi miocàrdica associada a l'edat<sup>20</sup> i la redistribució de connexines<sup>15</sup> hi estan possiblement implicats, però conformen possiblement només una part del substrat. Els pacients afectats de diabetis mellitus i hipertensió arterial tenen un risc elevat de FA, fins i tot abans de desenvolupar una cardiopatia evident, tot i que els mecanismes encara són desconeguts. La isquèmia auricular aguda<sup>21</sup> i crònica<sup>22</sup> promouen l'aparició de FA a través de la promoció d'activitat desencadenada i fibrosis. Les valvulopaties mitrals indueixen dilatació auricular, trastorns de la conducció i remodelat elèctric.<sup>23,24</sup>

#### *1.2.1.2. Factors genètics*

El perfil genètic individual és cada cop més reconegut com un factor crític en el desenvolupament de FA. Certes mutacions en gens que codifiquen canals iònics, connexines o proteïnes estructurals promouen l'aparició de FA comportant-se com a patologies amb

herència mendeliana.<sup>25</sup> Els polimorfismes genètics són variacions en la seqüència d'un gen molt més freqüents en la població que les mutacions. Tot i que confereixen un risc relatiu baix de FA, contribueixen a un gran número de casos de FA en la població general degut a la seva major prevalença. En base a la seva implicació en els mecanismes aritmogènics coneguts, aquells gens implicats en l'expressió de canals iònics, connexines i proteïnes involucrades en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) van ser els primers que es van analitzar, mostrant relacions importants.<sup>25</sup> Els anàlisis de relació de genoma complet (*genome-wide linking*) han ampliat la nostra perspectiva i revelat nous candidats prèviament no sospitats. El gen PITX2 ha demostrat de forma consistent la relació més potent amb el desenvolupament de FA, amb un risc relatiu de 1,8.<sup>26</sup> PITX2 s'ha implicat en la repressió de la funció de marcapassos en l'aurícula esquerra<sup>27</sup> i en la formació de les venes pulmonars durant l'embriogènesi,<sup>28</sup> però també podria regular la funció dels canals iònics en l'edat adulta.<sup>29,30</sup> Dos gens més s'han relacionat amb el desenvolupament de FA per mecanismes menys coneguts, el factor de transcripció ZFH3 i KCNN3, un canal de potassi activat per calci important en la musculatura vascular.<sup>25,31</sup>

#### 1.2.1.3. Factors extrínsecs

Els factors externs influeixen en el risc de FA més enllà del desenvolupament de patologia cardíaca evident, i el seu pes epidemiològic radica especialment en els pacients que prèviament eren considerats com FA aïllada. El tabac causa un increment dosi-dependent del risc de FA.<sup>32,33</sup> Tot i que la gran quantitat de components del tabac han dificultat l'estudi de la relació fisiopatològica, s'ha suggerit que el tabac indueix un increment de la fibrosi miocàrdica auricular<sup>34</sup> probablement mediada per una disminució de miR-133 i miR-590,<sup>35</sup> un increment del to simpàtic<sup>36</sup> i la inducció d'efectes electrofisiològics directes per part de la

nicotina.<sup>37</sup> El consum puntual de marihuana, cocaïna i alcohol pot desencadenar episodis de FA, mentre que el consum crònic d'alcohol té un efecte tòxic sobre els miòcits que contribueix al desenvolupament d'un substrat aritmogènic. La FA post-cirurgia cardíaca comporta una elevada morbiditat i un increment del cost hospitalari, i s'hi ha implicat el dany endotelial<sup>38</sup> i la redistribució de connexines.<sup>39</sup> L'efecte beneficiós de l'administració dels glucocorticoides en estudis clínics suggereix la contribució d'un procés inflamatori quirúrgic.<sup>40</sup> La dilatació auricular,<sup>41</sup> l'alteració del balanç autonòmic<sup>42</sup> i la hipercàpnia<sup>43</sup> contribueixen a desencadenar FA durant els episodis de d'apnea obstructiva.<sup>44</sup>

Un dels factors extrínsecs emergents que més ha destacat recentment com a promotor de la FA és l'exercici de resistència, com així ho demostren gran quantitat d'estudis clínics i epidemiològics.<sup>45-51</sup>

### 1.2.2. Remodelat

El remodelat auricular inclou els canvis persistents en l'aurícula, a nivell estructural, autonòmic o elèctric, que faciliten l'aparició de FA.

#### 1.2.2.1. *Remodelat estructural*

Els canvis en la morfologia o estructura del miocardi, bé sigui a nivell macro o microscòpic,<sup>52</sup> conformen el remodelat estructural. La dilatació auricular i la fibrosi miocàrdica en són els principals components.

La fibrosi auricular és conseqüència de l'augment del dipòsit extracel·lular de col·lagen.<sup>53</sup> El col·lagen se sintetitza com a precursor, se secreta a l'espai extracel·lular en forma de procol·lagen, on madura per l'acció de lisil-oxidasa i forma fibres insolubles que serveixen

com a material de sustentació (Figura 7A). Quan el dipòsit extracel·lular de col·lagen s'incrementa, la seva disposició entre miòcits contigus pot interferir en la normal conducció de l'estímul elèctric (Figura 7B). L'increment de la fibrosi auricular ocasiona una reducció aparent de la velocitat de conducció en el miocardi,<sup>54</sup> de forma desigual i heterogènia entre les diferents zones de l'aurícula,<sup>17,54</sup> Aquests trastorns corresponen, a nivell microscòpic, a una conducció en zig-zag (Figura 7C-E).<sup>55</sup> La reducció de la velocitat facilita la formació de reentrades,<sup>56</sup> i les reentrades que sostenen la FA s'assenten sobre les zones amb major contingut fibròtic.<sup>57</sup>

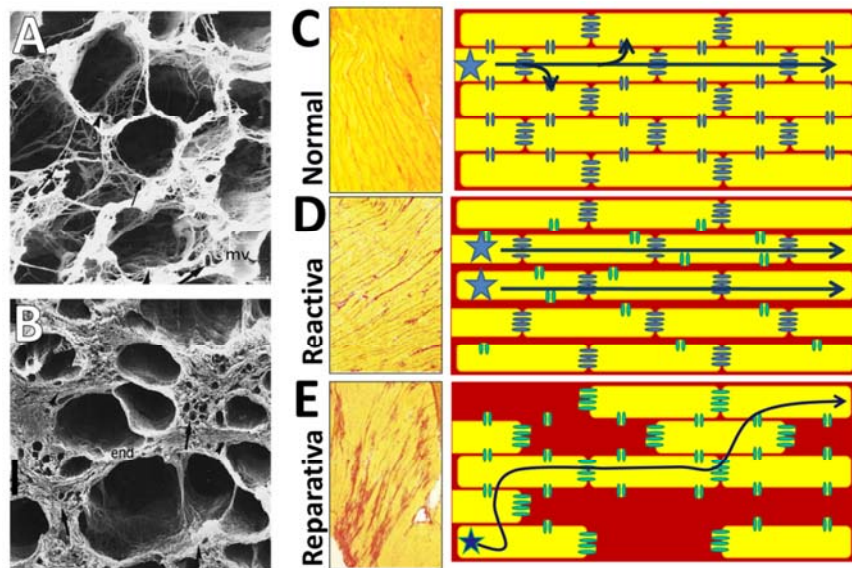


Figura 7: Mecanisme pels que la fibrosi intersticial altera la conducció cardíaca. (A) Imatge de microscòpia electrònica de rastreig de les fibres de col·lagen en condicions fisiològiques en el miocardi; els miòcits s'hi han eliminat. (B) Fibres de col·lagen en un miocardi fibròtic, formant trabècules gruixudes que alteren la normal conducció elèctrica. (C-E) A l'esquerra microfotografies de tincions histològiques (vermell de picosirius, fibrosi en vermell, reproduïdes de Kawara et al<sup>56</sup>), a la dreta esquema de la conducció (groc: miòcits, vermell fibrosi, blau/verd: connexines, estrella i fletxa blava: inici de l'estímul i direcció de la conducció). (C) En condicions normals, la conducció és preferentment longitudinal, i la conducció transversal sincronitza l'activació dels diferents feixos. (D) Davant de la fibrosi reactiva, el col·lagen es diposita entre els feixos de miòcits, provocant disrupció de les connexines laterals. Tot i que es pot incrementar la velocitat de conducció longitudinal,<sup>58</sup> es perd la sincronia entre feixos i es pot incrementar l'heterogeneïtat de la conducció. (E) En la fibrosi reparativa, la conducció no pot ser lineal i ha de seguir recorreguts en zig-zag.

La fibrosi miocàrdica, *per se* i sense altres cofactors, és capaç de desencadenar episodis de FA. La conducció en zig-zag en l'interior de les zones de miocardi fibròtic origina canvis variables en la velocitat de conducció com a conseqüència dels desajustos entre la intensitat de l'estímul elèctric ofert i el rebut per miòcits adjacents (*source-sink mismatch*).<sup>59</sup> Als canvis en la velocitat de conducció el segueixen canvis en la duració del PAcc i del període refractari.<sup>17,54</sup> Els trastorns locals del període refractari són suficientment heterogenis com per a propiciar bloquejos de la conducció i iniciar reentrades i FA.<sup>60</sup> Models d'insuficiència cardíaca<sup>61</sup> i ratolins transgènics<sup>62</sup> demostren que un substrat caracteritzat només per un increment del dipòsit de col·lagen és suficient per a sostenir la FA.

Clínicament, la fibrosi subjacent a la FA s'ha demostrat tant en pacients amb cardiopatia<sup>63,64</sup> com en pacients amb FA aïllada.<sup>65</sup> La intensitat del dipòsit de la fibrosi auricular prediu l'aparició de FA després d'una cirurgia cardíaca.<sup>66</sup> Diversos tractaments amb capacitat antifibròtica, com els bloquejants del SRAA<sup>67</sup> i pirfenidona,<sup>54</sup> un fàrmac utilitzat per al tractament de la fibrosi pulmonar idiopàtica, redueixen la fibrosi auricular i prevenen l'aparició de FA.

El col·lagen és sintetitzat i secretat pels fibroblasts. Els fibroblasts representen més de la meitat de la població cel·lular del miocardi, tot i que contribueixen només en un 5-20% en el volum del cor dels mamífers.<sup>68,69</sup> En no ésser excitablels elèctricament, se'ls atribuïa un paper merament estructural. Recentment s'ha descrit que la interacció entre miòcits i fibroblasts modifica les característiques electrofisiològiques del miocardi.<sup>70</sup> Tot i que l'evidència *in vivo* és escassa,<sup>71,72</sup> s'ha suggerit que el citoplasma dels fibroblasts està connectat amb altres fibroblasts i miòcits a través de connexines<sup>73</sup> i estructures nanotubulars.<sup>72</sup> També podrien contribuir en la relació fibroblast-miòcit interaccions paracrines<sup>74</sup> i l'estimulació de canals

iónics activats per estirament en el miòcit.<sup>75</sup> Globalment, la interacció miòcit-fibroblast podria ocasionar canvis en la duració del PAcc<sup>74,76</sup> i de la velocitat de conducció,<sup>74,75,77</sup> així com en la seva activitat espontània.<sup>78</sup> Significativament, en la patologia les interaccions s'incrementen quan els fibroblasts s'activen i es diferencien a miofibroblast.<sup>76</sup>

La dilatació auricular incrementa la superfície sobre la que s'estableixen les reentrades i n'incrementa l'estabilitat, propiciant-ne el manteniment.<sup>79</sup> La dilatació auricular és un substrat comú en diversos models de FA, generalment acompanyant a d'altres factors com la fibrosi o trastorns elèctrics,<sup>24</sup> i és una troballa freqüent que es relaciona també amb la incidència de FA aïllada.<sup>48</sup>

Una reducció o redistribució de les unions intercel·lulars (connexines) modifica el pas de l'estímul elèctric d'un miòcit a un altre. Les conseqüències funcionals de les modificacions en les connexines són encara controvertides. En pacients amb FA s'ha descrit tant un increment com una reducció en l'expressió de connexines.<sup>63</sup> Originant encara més la confusió, estudis in vitro demostren que reduccions significatives de fins al 50% del número de connexines no redueix la velocitat de conducció<sup>80</sup> i, fins i tot, per la teoria del cable, pot incrementar la velocitat de conducció longitudinal<sup>58</sup> a càrrec d'incrementar l'anisotropia.<sup>80</sup> Actualment, se sap que la fosforilació de les connexines influeix definitivament en la seva funcionalitat,<sup>81</sup> així com la seva redistribució a la zona lateral del miòcits<sup>63,81</sup> provocant alentiment i bloqueig de la conducció<sup>82</sup> La modulació de les connexines permet la reversió de FA en alguns estudis, però els resultats no han sigut confirmats per altres autors i semblen ser dependents de l'etiologia.<sup>83,84</sup>

#### 1.2.2.2. Remodelat autonòmic

El to autonòmic i el balanç entre els seus dos components, simpàtic i parasimpàtic, són importants moduladors de les característiques electrofisiològiques de l'aurícula. El protagonisme del remodelat autonòmic en el desenvolupament de la FA en diverses patologies és cada cop més reconegut.<sup>85,86</sup> Tot i que per separat ambdós components són capaços d'induir escurçament del PAcc i de la refractorietat<sup>87,88</sup> la seva actuació conjunta té efectes sinèrgics.<sup>89</sup> En alguns models animals d'insuficiència cardíaca, l'activació simultània de to simpàtic i parasimpàtic precedeix l'aparició de FA,<sup>90</sup> per un mecanisme en el que possiblement participen les anomenades post-despolaritzacions precoces en fase 3.<sup>91</sup> LA FA post-operatòria ve precedida per canvis en el balanç autonòmic.<sup>92</sup>

Globalment, la capacitat aritmogènica del to parasimpàtic és superior a la del to simpàtic degut a un efecte més heterogeni del to parasimpàtic en l'aurícula, que incrementa el risc de formació de reentrades.<sup>93</sup> L'activació intensa del to parasimpàtic és capaç de desencadenar FA fins i tot en cors sans<sup>94</sup> i en la majoria de pacients amb FA aïllada, presumiblement sense un remodelat estructural evolucionat, els paroxismes es desencadenen en situacions vagals en un 70% de casos. L'eliminació per radiofreqüència dels ganglis parasimpàtics de l'aurícula esquerra s'ha implicat amb l'eficàcia dels procediments d'ablació de la FA.<sup>95</sup>

#### 1.2.2.3. Remodelat elèctric

Els trastorns primaris en l'excitabilitat i del període refractari dels miòcits constitueixen la base del remodelat elèctric. Els canvis en les propietats de les corrents iòniques que conformen el PAcc (Figura 5) poden desencadenar l'aparició de FA. Un increment de les corrents repolaritzants o reducció de les despolaritzants durant el *plateau* del PAcc escurça el PAcc i la refractorietat del teixit miocàrdic, fet que afavoreix la formació de reentrades. La

velocitat de conducció de l'estímul elèctric en el miocardi ve determinada per la corrent ràpida de sodi que inicia la fase 0 del PAcc. La reducció de la corrent ràpida de sodi alenteix la conducció i facilita la instauració de reentrades. Els trastorns del metabolisme del calci a nivell de qualsevol de les proteïnes implicades en el maneig intracel·lular indueixen la formació d'arítmies a través de la formació de post-despolaritzacions tardanes (PDT).

### 1.2.3. Mecanismes bàsics

L'activació irregular de l'aurícula pot ser resultat de la descàrrega d'estímuls a alta freqüència d'una zona limitada de l'aurícula (bé sigui una sola reentrada o un mecanisme focal) o per la presència de múltiples reentrades sincròniques en tota l'aurícula. En qualsevol cas, s'accepta que tant un mecanisme basat en la reentrada com un mecanisme focal poden resultar en la presència de FA, però no es disposa de proves concloents que decantin per un o altra. La troballa d'un mecanisme de reentrada en una porció de miocardi no implica forçosament que aquest circuit mantingui la FA, sinó que pot ser-ne simplement una conseqüència. D'altra banda, la presència d'una activació focal persistent endo o epicàrdica pot ser l'expressió en la superfície del miocardi d'una reentrada intramiocàrdica. És probable que tant reentrades com mecanismes focals coexisteixin i contribueixin al manteniment de la FA en diferents punts temporals de la seva evolució.

#### 1.2.3.1. *Reentrada*

El concepte de reentrada que sosté la FA és un factor comú en moltes teories sobre la base de la FA. Una reentrada fixa, el concepte de rotor mare o múltiples reentrades itinerants en l'aurícula (*multiple wavelet*) són les teories més reconegudes.



Com a reentrada s'entén a l'activació cíclica d'una porció de miocardi. Per a que pugui establir-se una reentrada, es requereix que s'estableixi un bloqueig en un punt del circuit i capacitat d'activació retrògrada. Serà més fàcil que s'estableixi una reentrada com més curta sigui la longitud d'ona.<sup>96</sup> La longitud d'ona es defineix com la distància que pot recórrer l'estímul elèctric durant un període equivalent al període refractari, i representa l'espai mínim necessari per a que s'estableixi una reentrada. Una longitud d'ona curta implica que, per a la quantitat de teixit auricular, es podran establir més reentrades i la FA serà més estable. La longitud d'ona es pot resumir com a producte dels seus determinants:

$$\lambda = vel. \times PR$$

on  $\lambda$  és la longitud d'ona, *vel.* és la velocitat de conducció i PR el període refractari. A menor velocitat de conducció i període refractari més curt, menor longitud d'ona.

Per a iniciar una reentrada es requereix que en un moment inicial l'estímul elèctric es bloquegi en algun punt del circuit. El bloqueig es pot establir per barreres físiques (per exemple cicatrius quirúrgiques, tractes fibròtics<sup>56</sup>), o bé ésser funcionals, per la presència de marcades diferències en el període refractari en zones contigües (per exemple en la FA per increment del to vagal<sup>97</sup>). S'ha descrit que petites zones, d'uns pocs mil·límetres quadrats, són suficients per a establir una reentrada.<sup>98</sup>

#### 1.2.3.2. *Activitat desencadenada*

Un marcat increment en la freqüència de descàrrega en una petita zona del miocardi, que no pot ésser seguit pel miocardi circumdant i origina una conducció fibril·latòria a la resta de l'aurícula, és la base dels mecanismes focals. No s'ha demostrat que l'automaticitat incrementada pugui ser el mecanisme fonamental d'un focus de FA, però existeix certa

evidència que l'activitat desencadenada (*triggered activity*) pot estar en la base de determinats episodis de FA.<sup>21,99,100</sup>

L'activitat desencadenada són oscil·lacions del potencial de membrana causades per post-despolaritzacions que, quan arriben a cert llindar de potencial, poden desencadenar un nou PAcc.

Les PDT ocorren per l'alliberament anormal de calci del reticle sarcoplasmàtic un cop finalitzat el PAcc, durant la diàstole (fase 4). Les PDT resulten per una funcionalitat defectuosa del RyR o per una sobrecàrrega de calci en el reticle sarcoplasmàtic i són un mecanisme aritmogènic probable quan la FA és secundària a insuficiència cardíaca<sup>99,100</sup> o isquèmia auricular.<sup>22</sup>

Les post-despolaritzacions precoces són oscil·lacions del potencial de membrana originats per la reactivació dels canals de calci durant un PAcc prolongat (fase 2 o 3 del PAcc). El seu paper com a origen de la FA és molt menys conegut que el de les PDT, tot i que podria presentar-se en alguns casos molt determinats,<sup>101</sup> especialment pacients amb canalopaties congènites i bradicàrdia sinusal.

### **1.3. Exercici físic i aritmogènesi**

Els efectes saludables de l'exercici físic en pacients sans o amb cardiopatia han sigut repetidament comprovats en diverses publicacions<sup>102</sup> i la seva necessitat és reconeguda àmpliament per la societat. Els beneficis obtinguts són dependents de la intensitat, i s'ha relacionat una millor condició física a una menor mortalitat.<sup>103</sup> Tot i això, una quantitat

creixent d'evidència està posant en dubte aquesta relació lineal, especialment en la fisiologia del ventricle dret i aurícula. Publicacions recents demostren el desenvolupament d'una miocardiopatia de ventricle dret induïda per l'exercici similar a la displàsia aritmogènica de ventricle dret.<sup>104</sup> Les lesions repetides al ventricle dret durant els episodis repetits d'exercici físic d'elevada intensitat en són probablement la causa.<sup>105</sup>

De forma similar, diversos estudis han relacionat l'exercici físic intens i sostingut amb la FA. Els primers indicis relacionant FA i esport van sorgir en corredors d'orientació finesos.<sup>50</sup> Estudis posteriors van confirmar aquesta relació, especialment marcada en atletes de resistència, i de forma molt intensa en corredors de marató,<sup>106</sup> ciclistes professionals<sup>51</sup> i esquiadors de fons,<sup>45</sup> en els que la prevalença de FA se situa entre el 6 i el 12% en la cinquena i sisena dècades de la vida, molt per sobre de l'esperat per edat i sexe (prevalença de 0,3 a 0,5%).<sup>107</sup> Tanmateix, el risc no queda reclòs als atletes d'alt rendiment. Estudis inicials suggerien una relació intensitat-risc,<sup>48</sup> fet que s'ha confirmat en un estudi epidemiològic amb més de 16000 individus sans que ha demostrat una relació dosi-resposta entre exercici físic i FA.<sup>46</sup>

Característicament, la FA en els atletes apareix en la cinquena dècada de la vida, després de més de 15-20 anys de pràctica esportiva d'elevada intensitat<sup>49,50</sup>. Ni els atletes joves, amb una carrera esportiva prèvia més curta,<sup>108</sup> ni la població activa d'edat avançada<sup>109</sup> (probablement indicant un biaix de població sana) tenen un risc incrementat de FA. Tot i que no s'ha estudiat específicament la modalitat esportiva, la majoria d'estudis publicats demostrant una major incidència de FA inclouen atletes involucrats en esports amb un gran component aeròbic, de resistència, amb un risc menor per a altres esports dinàmics i sense estudis que descriguin aquesta relació en els esports estàtics (Figura 8).

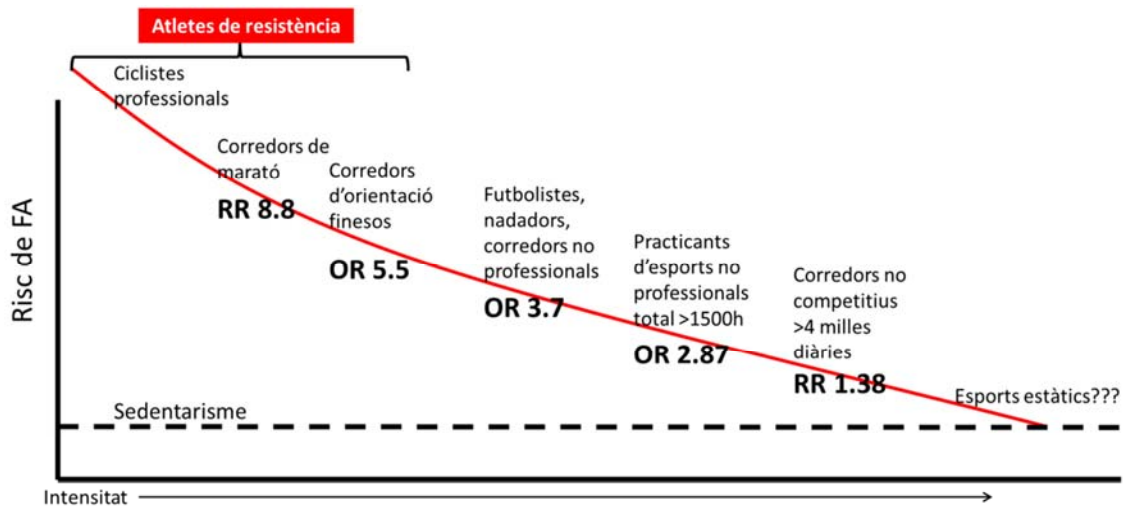


Figura 8: Síntesi dels estudis clínics que relacionen exercici físic i FA, situant el tipus d'exercici en funció del risc relatiu (RR) o odds ratio (OR) d'increment del risc de FA.

## 1.4. Tractament

El tractament crònic dels pacients amb FA requereix un abordatge múltiple. La decisió sobre la intenció de controlar la freqüència cardíaca o mantenir el ritme sinusal condicionarà l'ús de determinats antiarítmics, procediments d'ablació o de la modulació del substrat. Actualment, no disposem d'evidència que beneficiï una o altra estratègia en general,<sup>110</sup> tot i que en algunes circumstàncies el control del ritme sembla oferir avantatges en termes de milloria de la funció ventricular sistòlica.<sup>111</sup> La prevenció de les complicacions tromboembòliques s'ha de considerar en tots els pacients amb FA, independentment del patró clínic o de l'estratègia antiarítmica.

### 1.4.1. Tractament antiarítmic

El tractament antiarítmic, entès de forma clàssica, comprèn la inhibició de determinades corrents iòniques que modifiquen la morfologia del PAcc, l'excitabilitat o l'automatisme del miòcit i dificulten el manteniment dels mecanismes bàsics que sostenen la FA.

Si s'opta per una estratègia encaminada a mantenir el ritme sinusal, els fàrmacs més usats prolonguen el període refractari i la longitud d'ona. La capacitat d'amiodarona per a bloquejar múltiples corrents probablement justifica la seva major eficàcia per al manteniment del ritme sinusal,<sup>112</sup> tot i que la toxicitat pulmonar i tiroide en són els principals factors limitants. Els fàrmacs bloquejants dels canals de sodi com flecainida o propafenona, presenten una eficàcia inferior a amiodarona en absència d'efectes secundaris extracardíacs, però resten contraindicats en pacients amb cardiopatia estructural per la seva capacitat aritmogènica ventricular. El desenvolupament de fàrmacs antiarítmics amb selectivitat auricular intenten superar aquesta limitació.<sup>113</sup> El bloqueig selectiu auricular de la corrent lenta de sodi de ranolazina n'és un exemple.<sup>114</sup> L'augment de la mortalitat en pacients amb factors de risc cardiovascular que reben dronedarona,<sup>115</sup> un anàleg amb amiodarona amb una menor toxicitat sistèmica, n'ha reduït l'entusiasme inicial.<sup>116</sup>

Els fàrmacs beta-bloquejants, els antagonistes de calci no-dihidropiridínics, la digoxina, l'amiodarona i la dronedarona estan indicats per al control de la freqüència ventricular en diverses situacions clíniques, en cas que s'opti per una estratègia de control de freqüència.<sup>117</sup>

#### 1.4.2. Tractament del substrat

Els fàrmacs antiarítmics clàssics no modifiquen la història natural de la FA més enllà de prevenir el remodelat induït per la mateixa FA. Els tractaments encaminats a tractar el substrat que sosté la FA per a prevenir-ne la seva aparició és un dels camps de recerca emergents, i constitueixen el que anomenem *upstream therapies*.

L'actuació sobre el remodelat estructural ha sigut el més estudiat entre els diversos grups farmacològics, i els inhibidors del SRAA entre tots ells. Els inhibidors de l'enzim

convertidor d'angiotensina i els inhibidors de l'ARA2 han obtingut resultats positius en prevenció de FA en múltiples anàlisis secundaris de grans estudis<sup>118</sup> i en alguns randomitzats de petita mida específicament destinats a estudiar la recurrència de FA.<sup>119</sup> Globalment, han demostrant un efecte significatiu, si bé modest, en diversos meta-anàlisis.<sup>67,120</sup> Malgrat tot, aquesta diferència no es va reproduir en un meta-anàlisi en el que només es varen incloure els estudis que incloïen com a objectiu primari la incidència de la FA en pacients en risc elevat.<sup>121</sup> Aquesta diferència probablement remarca la importància d'una actuació molt precoç en la història natural de la FA.

L'efecte anti-inflamatori i antioxidant de les estatines s'ha suggerit que també que podria reduir la incidència de FA, tot i que un meta-anàlisi recent suggereix que un efecte positiu al curt terme podria desaparèixer en estudis amb un seguiment més llarg.<sup>122</sup>

Estudis randomitzats<sup>123</sup> i un recent meta-anàlisi<sup>124</sup> demostren una manca d'efecte beneficiós dels àcids grassos poli-insaturats omega 3.

L'ús de teràpies biològiques destinades a modificar l'expressió dels canals iònics o de proteïnes relacionades amb la fibrosis en els fibroblasts és un dels camps amb un futur més esperançador.<sup>125</sup>

#### 1.4.3. Procediments d'ablació

Iniciada fa menys de 15 anys per al tractament de pacients amb FA focal en les venes pulmonars,<sup>126</sup> en l'actualitat els procediments d'ablació extensos, incloent la modificació del substrat mitjançant la realització de línies d'ablació, permet l'abordatge de pacients amb FA amb una major afectació estructural.<sup>127</sup>

La taxa d'èxit de l'ablació de FA és superior a la dels fàrmacs antiarítmics,<sup>128</sup> reduint el risc relatiu de recidiva en un 65%.<sup>129</sup> En general, es recomana com a alternativa en pacients que romanen simptomàtics després d'intentar com a mínim un fàrmac antiarítmic.<sup>117,130</sup> Tanmateix, és una teràpia que requereix una lenta corba d'aprenentatge i la necessitat de centres amb una elevada experiència és crítica, ja que el seu èxit es relaciona directament amb l'experiència de l'operador i el centre.<sup>131</sup>

#### 1.4.4. Prevenició tromboembòlica

La complicació més temuda de la FA és el desenvolupament d'embolismes perifèrics i cerebrals. El risc global anual de tromboembolisme és d'un 4%,<sup>117</sup> sense que es diferenciï de forma significativa en funció del patró de la FA, paroxística o persistent.<sup>132</sup>

El tractament anticoagulant amb antagonistes de la vitamina K redueix en més de dos terços els casos de tromboembolisme i aconsegueix reduir l'increment de mortalitat associat a la FA.<sup>133</sup> La protecció que ofereix aspirina és molt menor, entorn a un 20%.<sup>134</sup> El benefici de l'anticoagulació és major a major risc tromboembòlic.<sup>135,136</sup>

El risc de tromboembolisme no és repartit de forma igual en tots els pacients. Durant els darrers anys, s'han ideat diversos algoritmes per a seleccionar els pacients de més baix risc, tributaris de no rebre tractament antitrombòtic, i administrar anticoagulació oral a tota la resta. L'escala CHADS<sub>2</sub> (*Congestive heart failure, hypertension, age, diabetes, previous stroke*) ha sigut la més usada recentment. Permet discernir el risc entre un 1,9% en el grup de baix risc i 18% en el grup d'alt risc,<sup>137</sup> però tot i així aporta un baix poder discriminatori entre els grups de risc baix i mig.<sup>138</sup> En l'actualitat, l'adopció de l'escala CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc és la recomanada,<sup>117</sup> que afegeix el sexe femení i la vasculopatia com a factors de risc, i dona

més pes a l'edat avançada, reduint el número de pacients tributaris de ser inclosos en el grup de risc baix. En el futur, noves tècniques com la ressonància magnètica poden ser d'ajuda per a l'estratificació de risc.<sup>139</sup>

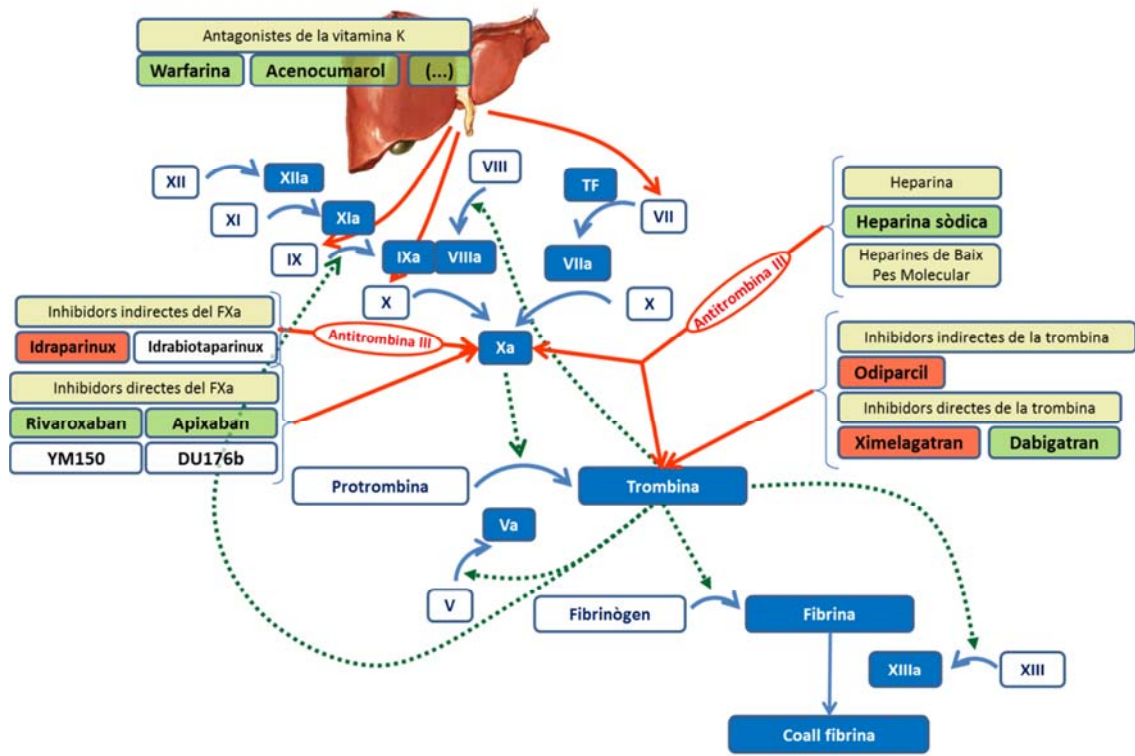


Figura 9: Lloc d'actuació en la cascada de la coagulació dels anticoagulants usats o en estudi en la FA. Les línies vermelles indiquen inhibició, les verdes activació. En verd els fàrmacs que han demostrat ser eficaços i segurs en el tractament de la FA, en vermell, fàrmacs que han sigut retirats; en blanc, fàrmacs en estudi.

Després de la decepció d'altres candidats a substituir els antagonistes de la vitamina K (ximelagatran com a paradigma), l'aparició dels nous anticoagulants orals està revolucionant l'orientació del tractament antitrombòtic (Figura 9). Els inhibidors directes del FXa, com rivaroxaban<sup>140</sup> o apixaban<sup>141</sup>, o del FIIa, com dabigatran,<sup>142</sup> han demostrat ser no inferiors, o fins i tot superiors en eficàcia i seguretat, al tractament amb anticoagulants antagonistes de la vitamina K. Però la comercialització d'aquests fàrmacs es troba encara en les primeres fases i



les reticències i problemes no són infreqüents. La FDA està investigant dabigatran per l'aparició de complicacions hemorràgiques severes en estudis post-comercialització.<sup>143</sup> Hi ha recels sobre si la manca de necessitat de controls d'hemostàsia farà perdre al pacient la visió de la importància del tractament.

Donada la tendència dels trombus a originar-se a l'orelleta esquerra, la implantació de dispositius és una estratègia atractiva,<sup>144,145</sup> però actualment limitat a encara un grup molt seleccionat de pacients amb contraindicació a l'anticoagulació oral o alt risc hemorràgic.

### **1.5. Fisiologia cardíaca i microRNA.**

En els darrers anys, els miRNA han sorgit com a importants reguladors de la síntesi proteica arreu de l'organisme. Els miRNAs són oligonucleòtids, d'una mitja de 22 nucleòtids, sintetitzats en forma de precursor, i que acaben madurant al citoplasma (Figura 10). Un cop madurs, s'uneixen a les regions 3'-UTR del mRNA, evitant-ne la traducció o provocant la degradació del complex miRNA-mRNA. La regió 5' del miRNA és crítica per al reconeixement de la seqüència diana, i els 8 nucleòtids que conformen la *seed region* són els més importants. Amb tot, la unió de miRNA amb la seva diana no requereix d'una complementarietat perfecta, de manera que un miRNA pot inhibir una gran quantitat de mRNAs.

Els miRNA s'expressen amb intensitat diferent en funció de l'òrgan estudiat. A data de març de 2012 s'han descrit més de 1500 miRNA diferents.<sup>146</sup> En el cor, són una vintena els que estan especialment enriquits.<sup>147</sup> Entre aquests, tres miRNA s'expressen específicament en cardiomiòcits, miR-208a/b i miR-499.<sup>148</sup> miR-1 ha sigut el més àmpliament estudiat i sembla

regular l'expressió del gen de la connexina 43, GJA1, i de KCNJ2, responsable de  $I_{K1}$ .<sup>149</sup> miR-1 participa també en el control intracel·lular del calci.<sup>150</sup> El grup de miR-15 i miR-21 són inhibidors de l'apoptosi.<sup>151,152</sup> La disminució de miR-133 i miR-590 semblen estar implicats en la fibrosi miocàrdica auricular secundària a la nicotina,<sup>35</sup> tot i que miR-133 també regula l'expressió de KCNH2 i KCNQ1 i per tant, la duració del PAcc.

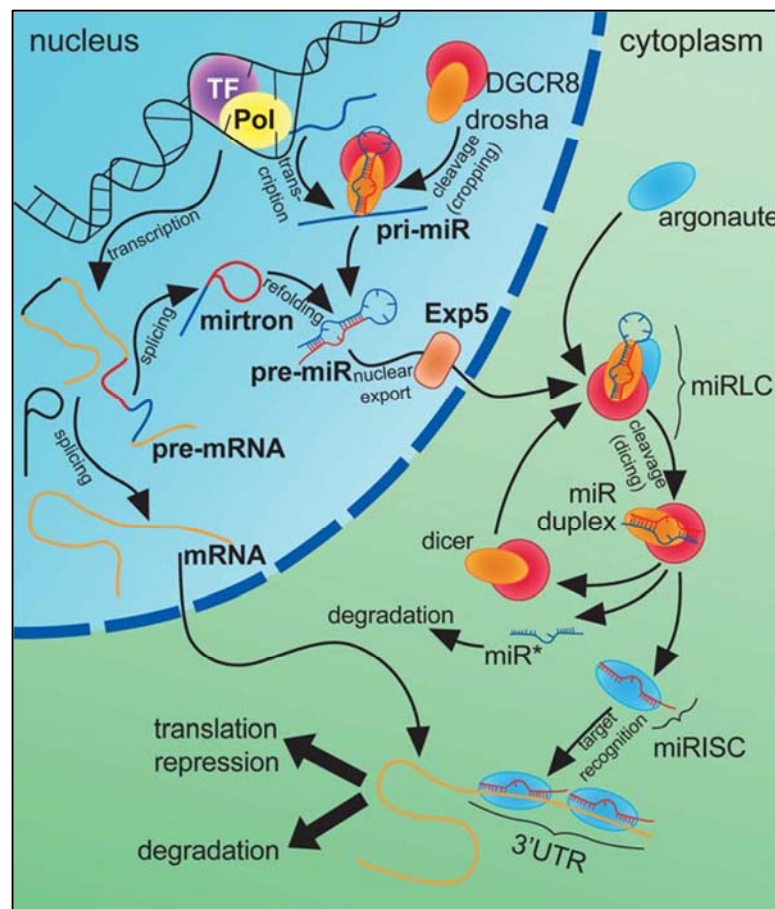


Figura 10: Representació de la síntesi i actuació dels microRNA. Bé sigui a través de mirtron o pri-miR, es pleguen formant els pre-miR i és transportat al citoplasma. Després de madurar fins a miRNA reconeix el corresponent mRNA diana, n'inhibeix la traducció a proteïna i, de forma variable, n'afavoreix la degradació. Reproduït de Condorelli *et al.*<sup>153</sup>

El paper dels miRNA en la fisiologia cardíaca i la seva desregulació en processos patològics<sup>153</sup> els han convertit en dianes emergents de la búsqueda de noves estratègies

diagnòstiques i terapèutiques. La presència en plasma de dos dels miRNA específics del múscul cardíac com miR-208b i miR499 s'han proposat per al diagnòstic precoç d'infart de miocardi.<sup>154</sup> Els inhibidors dels miRNA són oligonucleòtids complementaris a una seqüència més o menys llarga del miRNA, però que inclou com a mínim la regió *seed*. Es comercialitzen en forma de LNA-antimiR (Exiqon®) o d'antagomir. L'administració d'inhibidors de miRNAs han demostrat prevenir o revertir el remodelat ventricular advers en diverses cardiopaties o en la isquèmia miocàrdica.<sup>151,152,155</sup> Tanmateix, es desconeix la seva participació i possibilitats com a diana terapèutica en la FA.

# 2 OBJECTIUS GENERAIS

L'objectiu global de la tesi és estudiar la fisiopatologia i el tractament de la FA mitjançant una aproximació clínica i experimental. En concret, s'estableixen tres objectius principals:

- Estudiar la fisiopatologia de la FA de l'atleta i la resposta a la finalització de l'exercici físic en un model animal.
- Estudiar el paper de miR-21 en el remodelat estructural auricular en un model animal i el potencial terapèutic del seu bloqueig.
- Conèixer l'epidemiologia, i la relació eficàcia–seguretat de la triple combinació antitrombòtica com a règim terapèutic en els pacients amb FA.

Aquests tres objectius seran estudiats en tres sub-projectes separats.



# 3

## **SUB-PROJECTE 1:** ESTUDI DELS EFECTES ARITMOGÈNICS DE L'EXERCICI FÍSIC DE RESISTÈNCIA EN UN MODEL ANIMAL

---

3. E

### **3.1. Justificació**

L'aparició d'arítmies en una població jove i paradigma de la vida sana com són els atletes és un problema social important, però les causes i mecanismes que comporten aquest problema romanen desconegudes. En base a coneixements generals de la fisiopatologia de la FA i de l'adaptació fisiològica a l'exercici<sup>156</sup> s'ha suggerit la participació de diversos mecanismes com la dilatació auricular, el canvis en el to autonòmic o en l'estat inflamatori sistèmic.<sup>47</sup> La dilatació auricular és una troballa que comparteixen els atletes d'alt rendiment<sup>108,156</sup> i els pacients amb FA aïllada.<sup>48</sup> La bradicàrdia sinusal en els atletes és causada per un increment del to parasimpàtic, acompanyat o no de canvis en la freqüència cardíaca intrínseca o el to simpàtic;<sup>156-158</sup> és ben conegut que les situacions amb predomini del to parasimpàtic són

desencadenants de paroxismes de FA fins i tot en cors sense cardiopatia.<sup>48,94</sup> En pacients amb cardiopatia l'exercici millora la supervivència<sup>102</sup> per un mecanisme en el que possiblement participa una normalització de la repolarització ventricular,<sup>159</sup> però es desconeix si s'afecta la repolarització auricular.

Per a solventar aquesta mancança, el grup IDIBAPS d'Arítmies, Estimulació i Imatge Cardíaca inicià l'any 2004 l'estudi del substrat aritmogènic en un model animal d'exercici físic, en col·laboració amb el laboratori de Patologia Experimental de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC). Estudis inicials van demostrar que en rates sotmeses a exercici físic de resistència mantingut durant llargs períodes s'indueix FA amb major freqüència durant un EEF (

Figura 11A). Un cicle sinusal i de Wenckebach prolongats suggerien un to parasimpàtic incrementat en les rates entrenades. L'increment de fibrosi miocàrdica en mostres histològiques en pot constituir un remodelat estructural subjacent (

Figura 11C).<sup>53</sup>

Un millor coneixement dels mecanismes que contribueixen al desenvolupament de la FA de l'atleta és un pas essencial per a la comprensió de la patologia i per a poder iniciar la búsqueda tant de estratègies terapèutiques específiques com, preferiblement, el desenvolupament d'eines preventives o de detecció precoç d'un substrat proaritmogènic.

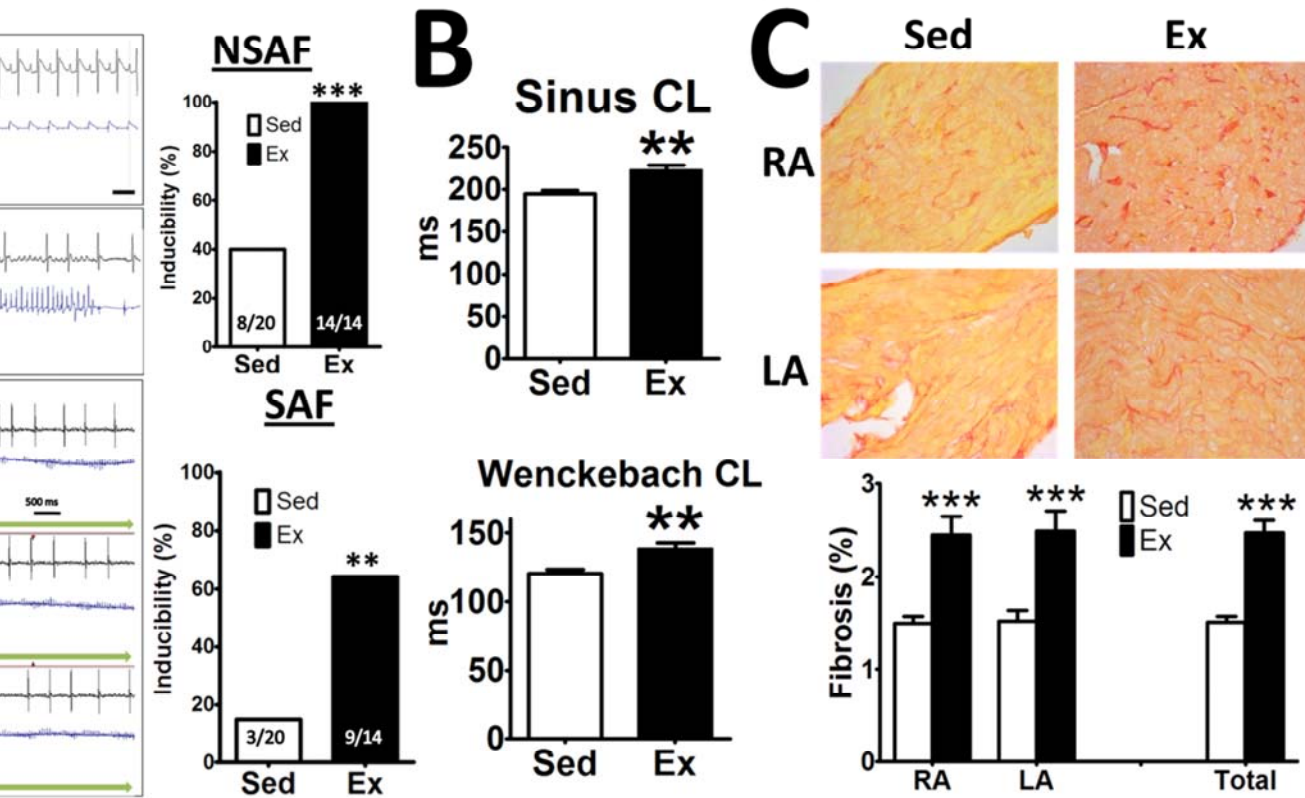


Figura 1. Resultats de l'estudi electrofisiològic i de la fibrosi en el model d'exercici físic de resistència. (A) Resultats de l'estudi electrofisiològic, mostrant tres traçats representatius (en una ratxa d'inducibilitat). (B) Mesura del cicle sinusal i del cicle de Wenckebach. (C) Microfotografies representatives i quantificació de la fibrosi en les aurícules dretes i esquerra i total. NSAFA: fibril·lació auricular no sostinguda; SAFA: fibril·lació auricular sostinguda; CL: longitud de cicle.



### **3.2. Hipòtesi**

L'exercici físic de resistència, mantingut durant llargs períodes de temps, promou el desenvolupament d'un substrat per a la FA consistent en una combinació de remodelat estructural, autonòmic i elèctric, tots ells presents però amb una importància variable. El substrat aritmogènic i la susceptibilitat a la FA són reversibles en aturar l'exercici físic.

### **3.3. Objectius**

Els objectius específics d'aquest subprojecte són:

- Estudiar el remodelat elèctric auricular que es desenvolupa com a conseqüència de l'exercici físic.
- Confirmar que el to parasimpàtic es troba incrementat com a conseqüència de l'exercici en el nostre model.
- Estudiar com es modifiquen els components del substrat aritmogènic en aturar l'exercici físic.
- Valorar si aturar l'exercici físic permet revertir la inducibilitat de FA.

### **3.4. Mètodes**

#### Descripció del model

Per a replicar els efectes de l'exercici físic intens i mantingut, s'adoptà un model d'exercici en cinta rodant en rates. Un conjunt de rates Wistar mascle d'entre 125 i 200 grams de pes van assignar al grup sedentari (Sed) o exercici (Ex) de forma aleatòria. Les rates del grup Ex

es van sotmetre a un entrenament consistent en carrera en una cinta rodant (Figura 12). Aquest disposa d'una reixa metàl·lica en la part posterior de cada carril que administra petites descàrregues elèctriques al contacte amb la rata i les encoratja a córrer. Començant en el primer dia d'entrenament, i durant dues setmanes, la intensitat i la duració de l'exercici es van incrementar progressivament per a permetre l'adaptació de les rates, assolint finalment una velocitat de 28 m/min durant 60 minuts. Només es van incloure en l'anàlisi aquelles rates que dominaven la tècnica de córrer adequadament, amb una quantitat mínima de descàrregues elèctriques. L'entrenament es va mantenir 5 dies a la setmana, fins a completar 16 setmanes. Un subgrup de rates del grup Ex van aturar l'entrenament a les 16 setmanes i van restar en repòs 4 (grup DEx4) o 8 setmanes (grup DEx8) per a estudiar la reversibilitat del substrat i la inducibilitat. En tots els punts temporals, les rates del grup Sed es van mantenir en les mateixes condicions que les rates Ex.

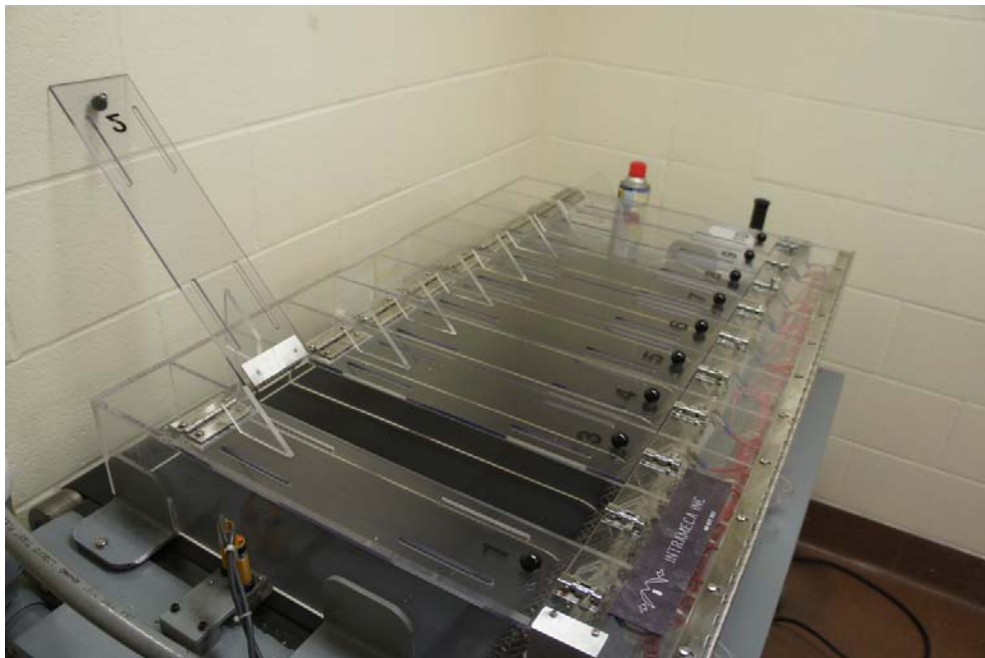


Figura 12: Cinta rodant utilitzada per a l'entrenament de les rates, amb capacitat per a 10 rates simultànies.

En el grup Ex, els animals van ésser estudiats com a mínim 3 dies després de la darrera sessió d'entrenament per a evitar la interferència de la resposta aguda a l'exercici. Després dels estudis *in vivo*, el cor va ser extret i processat d'acord a les necessitats (immersos en formalina per a estudis histològics, congelats en N<sub>2</sub> líquid per a biologia molecular o perfosos retrògradament per aïllament de miòcits).

### Ecocardiografia

Els estudis ecocardiogràfics es van dur a terme amb una sonda 10S (4,5 – 11,5 MHz) en un aparell Vivid-7 sota anestèsia amb isofluorà al 2% i O<sub>2</sub> al 100%. Les principals medicions es van obtenir mitjançant el mode M en la pla paraesternal d'eix llarg: mides de l'aurícula esquerra (en telesístole i telediàstole) i dreta (en telesístole), diàmetre i gruix de paret del ventricle dret (ambdós en telediàstole). El mode M en eix curt del pla paraesternal a l'alçada dels músculs papil·lars es va usar per a mesurar el diàmetre del ventricle esquerre (diàmetre telediastòlic i telesistòlic) i el gruix de la paret posterior i septum interventricular. Tots els diàmetres i gruixos es van indexar segons la massa corporal. La fracció d'ejecció es va obtenir amb la fórmula inclosa en el software incorporat a Vivid7. El registre Doppler d'ona contínua es va obtenir en el tracte de sortida del ventricle esquerre en pla apical de 5 càmeres per a calcular el temps de relaxació isovolumètric (TRIV), que es va corregir per la freqüència cardíaca (TRIVc).

### Estudi electrofisiològic

El procediment es va realitzar sota anestèsia amb isofluorà inhalat al 2% i intubació oro-traqueal (O<sub>2</sub> 100%, ventilació 2,5 mL/respiració, 60 respiracions/minut). El pol distal d'un electrocatèter de 1,9F (Scisence, London, ON, Canadà) es va avançar fins a l'aurícula

dreta a través d'un accés jugular (Figura 13). L'electrocardiograma (ECG, derivació DII) i l'electrograma auricular intracavitari es van processar amb un convertidor analògic-digital i emmagatzemar en un ordinador (IOX 2.5.1.6, EMKA Technologies, Paris, França) per a poder ser analitzat posteriorment en un software específic per al seu anàlisi (ECG Auto 2.5.1.26, EMKA Technologies, Paris, França). L'estimulació elèctrica es va dur a terme amb un generador d'impulsos (Harvard Aparatus, MA, Estats Units) governat amb un software programat pel nostre mateix grup.

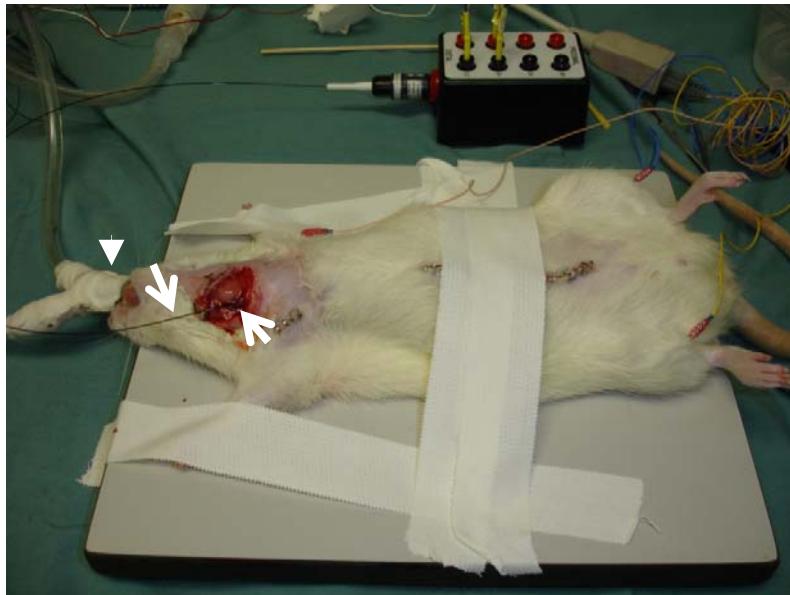


Figura 13: Fotografia durant un estudi electrofisiològic a una rata. El camp quirúrgic al coll s'ha ampliat per a poder observar l'entrada del catèter a la jugular. Les fletxes blanques senyalen el catèter i la seva entrada a la jugular dreta. Els caps de fletxa mostra la connexió del tub oro-traqueal al respirador.

En l'ECG, es varen mesurar els principals intervals que reflecteixen l'activació i repolarització cardíaca. La ona P es va mesurar des de l'inici de l'ona P en línia isoelectrica fins a la tornada a la línia isoelectrica. L'interval PR es va mesurar des de l'inici de l'ona P fins a l'inici del complex QRS (ona Q o R, segons la morfologia). La duració del QRS es va mesurar des de l'inici del complexí QRS (ona Q o R, segons la morfologia) fins al final de la

ona S; degut al curt, o sovint inexistent segment ST, es va interpretar al final del QRS al canvi de pendent entre la ona S i la ona T. L'interval QT es va mesurar des de l'inici del complex QRS (ona Q o R, segons la morfologia) fins al retorn a la línia isoelectrica; per a corregir pels canvis de duració de l'interval QT amb la freqüència cardíaca, es mostra l'interval QT corregit pel RR (QT<sub>c</sub>), calculat segons la fórmula:

$$QT_c = \frac{QT (ms)}{\sqrt{\frac{RR (ms)}{150}}}$$

Aquesta fórmula ha demostrat corregir el QT de forma eficient per a la freqüència cardíaca habitual de les rates.<sup>161</sup> Tots els intervals de l'ECG van ser mesurats de forma semiautomàtica per una utilitat del programa ECG Auto. Es varen mesurar els intervals de tots els complexos presents en 30 segons de registre i es va calcular la mitja per a obtenir el resultat final.

El cicle de Wenckebach es va buscar en etapes consecutives de 10 batecs, en els que la longitud del cicle d'estimulació es va reduir en 2 ms a cada etapa fins a objectivar-se prolongació i bloqueig auriculo-ventricular (bloqueig auriculo-ventricular tipus Mobitz I). La longitud de cicle més llarga en la que es va observar bloqueig auriculo-ventricular es va definir com a cicle de Wenckebach.

El període refractari auricular es va quantificar mitjançant estimulació programada a aurícula dreta amb un tren de 9 estímuls (S1, longitud de cicle de 150 ms) seguit d'un extraestímul (S2). L'interval d'acoblament de S2 es va reduir en 2 ms en cada etapa fins a la refractorietat o un cicle d'acoblament de 20 ms. El període refractari es va definir com el menor interval d'acoblament S1-S2 capaç de generar una ona de despolarització auricular.

La inducibilitat de FA es va estudiar amb tècniques d'estimulació amb dos (S2-S3) o tres extraestímuls (S2-S3-S4) administrats amb fins a un període d'acoblament mínim de 20 ms durant ritme sinusal espontani i després d'un tren de 9 estímuls a un cicle de 150 ms. En cas de no induir-se arítmies auriculars es va procedir a estimulació auricular en ràfegues (*burst*) amb un cicle de 60 ms i 40 ms aplicats durant 7,5, 15 i 30 segons. Es va definir la FA com un ritme auricular irregular en l'electrograma auricular (cicle inferior a 100ms), absència d'ones P en l'ECG amb línia basal oscil·lant i ritme ventricular irregular. Quan es va induir FA, es va registrar la duració de la FA, i es va considerar no sostinguda quan es va mantenir entre 1 i 30 segons, i sostinguda quan la duració fou de més de 30 segons.

#### Registres de telemetria

En un subgrup de 15 rates (8 Ex, 7 Sed), es va obtenir un registre electrocardiogràfic mitjançant telemetria durant 24 hores consecutives en cinc punts temporals: basalment (setmana 0), 8 setmanes, 16 setmanes, DEx4 i DEx8. El registre es va iniciar a les 14:00h, i el cicle de foscor estava establert entre les 18:00 i les 6:00, essent la resta d'hores de llum. L'ECG obtingut es va emmagatzemar en un ordinador (IOX 2.5.1.6) per a l'anàlisi posterior *offline* (ECG Auto 2.5.1.26). Mitjançant un mòdul de reconeixement semi-automàtic del QRS, es van identificar i registrar tots els intervals RR; es va calcular la mitja del RR a cada hora per grup en cada punt temporal. Els períodes amb una elevada variabilitat del RR es van revisar manualment per assegurar-se la fiabilitat dels resultats, i aquells períodes amb menys del 95% del temps adequats per a ser analitzar van ser exclosos.

#### Valoració del to autonòmic

Es van estimar de forma separada els dos components del to autonòmic (simpàtic, parasimpàtic) a través dels canvis de la freqüència cardíaca després del bloqueig seqüencial amb atropina i propranolol. Tots els animals van ser sotmesos a la medicació del to simpàtic i parasimpàtic en ordre aleatori en 24 hores. Les medicions es van dur a terme en rates despertes, sense restricció de moviments a les que se'ls havia implantat un catèter derivat a l'esquena per a l'administració *in vivo* de fàrmacs.

Per a estudiar el patró temporal en la instauració i duració de l'efecte d'ambdós fàrmacs en les rates, es van administrar per separat dosis úniques de propranolol (2 mg/kg) i atropina (1 mg/kg) en un subgrup de tres rates. Es va quantificar la freqüència cardíaca en diferents punts temporals (basalment, 15 segons, 30 segons, 45 segons, 60 segons, 2 minuts, 3 minuts, 5 minuts, 10 minuts, 20 minuts, 30 minuts, 40 minuts, 50 minuts, 60 minuts i 70 minuts) (Figura 14). L'atropina va assolir un màxim en la seva acció taquicarditzant després de 45 segons de la injecció, i el seu efecte es va mantenir durant 30 minuts. El propranolol va mostrar un patró més progressiu, trigant un minut a arribar a l'efecte màxim i persistent durant 50 minuts. En base a aquests resultats, es va decidir que els experiments posteriors s'haurien de completar en no més de 15 minuts després de l'administració del primer fàrmac per a assegurar que l'efecte d'ambdós fàrmacs era simultani al mesurar la freqüència cardíaca, i es va seleccionar un interval de 5 a 7 minuts entre ambdós fàrmacs.

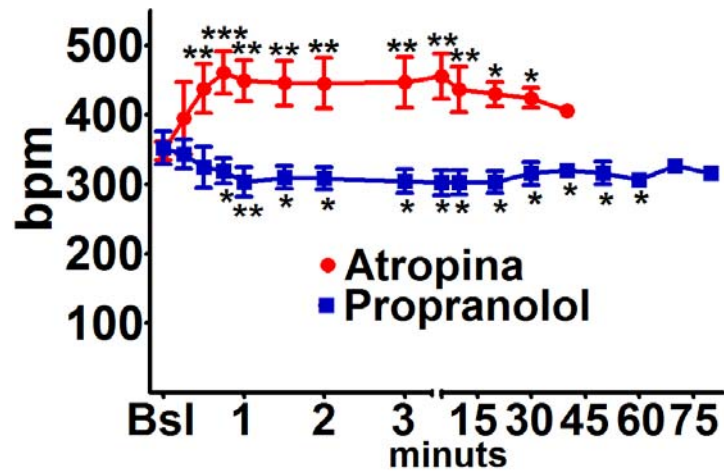


Figura 14: Quantificació de l'inici i duració de l'efecte d'atropina i propranolol. Es mostra la freqüència cardíaca (mitja±EEM) després de l'administració de cada fàrmac ANOVA d'un factor significativa al nivell de 0,01. N=3 en ambdós experiments. \*p<0.05; \*\*p<0.01;\*\*\*p<0.001 vs basal.

El mètode seguit per a l'estimació dels dos components del to autonòmic s'esquematitza a la Figura 15. Per a estimar el to parasimpàtic es va administrar inicialment propranolol (2 mg/kg) endovenós per a bloquejar el component simpàtic, i de 5 a 7 minuts després es bloquejà el component parasimpàtic amb atropina (1 mg/kg). Es va definir l'índex del to parasimpàtic com a la diferència entre la freqüència cardíaca després de propranolol i la freqüència cardíaca després del doble bloqueig atropina+propranolol.

Per a estimar el to simpàtic, es va administrar inicialment atropina (1 mg/kg) seguit de propranolol (2 mg/kg). L'índex del to simpàtic es va definir com la diferència entre la freqüència cardíaca sota bloqueig del to parasimpàtic i la freqüència cardíaca sota doble bloqueig parasimpàtic+simpàtic.



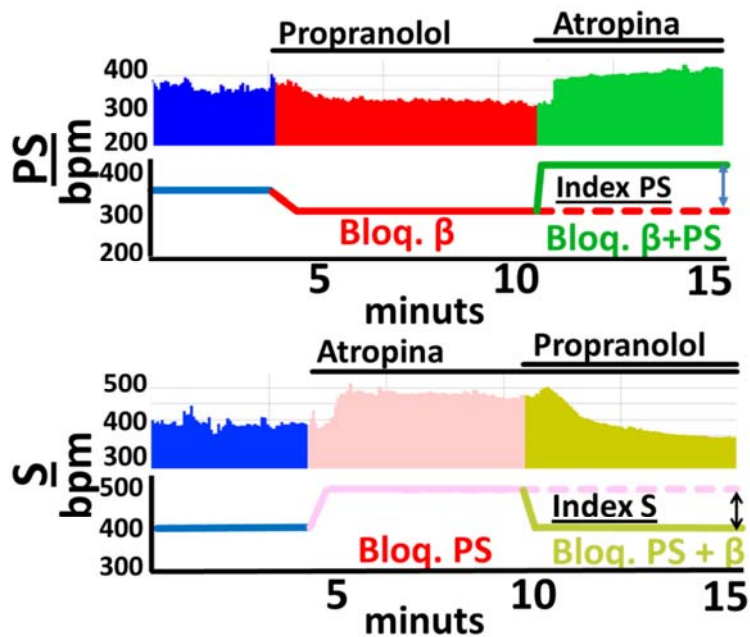


Figura 15: Mètode emprat per a l'estimació del to parasimpàtic (PS) i del to simpàtic (S) mitjançant la diferència de la freqüència cardíaca després del bloqueig seqüencial d'ambdós components. En cadascun dels components simpàtic i parasimpàtic es mostra un traçat representatiu d'una medició (part superior) i un esquema amb el canvi de freqüència cardíaca (part inferior). Bpm: batecs per minut; bloq.: bloqueig.

### Quantificació de la fibrosi

La fibrosi intersticial miocàrdica es va quantificar en mostres histològiques d'ambdues aurícules tenyides amb vermell de Picosirius. La tinció de vermell de Picosirius tenyeix de forma específica les fibres de col·lagen de color vermell i en permet la seva quantificació. De cada animal, es van obtenir de 6 a 10 seccions auriculars separades 500 $\mu$ m en mostres de cor en parafina i tenyides segons el protocol estàndard.<sup>160,162</sup> Per a l'avaluació de la fibrosi es van prendre microfotografies cobrint la totalitat de la secció amb un microscopi Olympus BX60 i una càmera QImaging QCam. L'àrea tenyida en vermell es va quantificar mitjançant un software d'anàlisi d'imatges (Image J, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estats Units). El col·lagen perivascular, pericàrdic i endocàrdic van ser exclosos

de la quantificació. Els resultats es van correlacionar amb l'àrea tissular total i es mostra com a percentatge (Figura 16).



Figura 16: Mètode emprat per a la quantificació de la tinció del vermell de Picrosirius. (A) Microfotografia original, abans de l'anàlisi, amb els tractes fibròtics tenyits en vermell intens (caps de fletxa). (B) Mitjançant un software específic es marca (en negre a la imatge) de forma semiautomàtica les àrees tenyides de vermell en la preparació. (C) Després d'excloure manualment l'endocardi, l'epicardi i els vasos sanguinis (marcats amb fletxes), es quantificarà la resta de zones tenyides en vermell (àrea rodejada en groc en la imatge).

### Aïllament de mRNA

Mostres congelades de teixit auricular es varen homogeneïtzar usant un politró. Es va obtenir RNA total mitjançant Trizol seguint les instruccions del fabricant, i es va quantificar el RNA obtingut mitjançant un espectrofotòmetre Nanodrop ND-100.

L'expressió del gens implicats en el remodelat iònic (canals iònics de  $I_{to}$  i  $I_{CaL}$ ) es van obtenir d'un anàlisi mitjançant *TaqMan low-density arrays* (TLDA, Applied Biosystems, Estats Units) segons mètodes descrits.<sup>163</sup> Breument, seguint la purificació de RNA es va aplicar tractament amb DNasa I (Sigma, Estats Units) i es va confirmar la manca de contaminació de DNA genòmic amb RT-PCR. La qualitat del RNA total es va valorar mitjançant microelectroforesis amb gel de poliacrilamida (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Estats Units) i només els RNAs amb un número RIN per sobre de 7,5 van ser utilitzats pels anàlisis d'expressió. El DNAc es va obtenir a partir de 420 ng de RNA total utilitzant el

High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Les reaccions de RT-PCR es van realitzar i van ser llegides en un sistema ABI PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Per a la corrent  $I_{to}$ , es va quantificar l'expressió de les subunitats  $\alpha$ : KCND2 (Kv4.2) i KCND3 (Kv4.3), i les subunitats  $\beta$  i reguladores: Kcnip2 (KChIP2), Pias3 (KChAP), KCNE2 (MIRP1), KCNE3 (MIRP2), Kcnab1 (Kv $\beta$ 1), Kcnab2 (Kv $\beta$ 2) i Kcnab3 (Kv $\beta$ 3). Per a la corrent  $I_{CaL}$  es va quantificar l'expressió de la subunitat  $\alpha$  Cacna1c (Cav1.2), de les subunitats  $\alpha 2\delta$  Cacna2d1 (Cava2 $\delta$ 1), Cacna2d2 (Cava2 $\delta$ 2) i Cacna2d3 (Cava2 $\delta$ 3), de la subunitat beta Cacnb2 (Cav $\beta$ 2) i la subunitat gamma Cacng2 (Cav $\gamma$ 2)

L'expressió dels marcadors fibròtics en l'estudi de reversibilitat del substrat estructural es va realitzar mitjançant tècniques de RT-PCR convencionals. El DNAc es va obtenir a partir de 1  $\mu$ g de mRNA amb iScript cDNA (Bio-Rad Laboratories, CA, Estats Units). 100 ng de cDNA es van amplificar mitjançant iCycler IQ<sup>TM</sup> (Bio-Rad Laboratories) utilitzant kits TaqMan específics per a cada gen (Applied Biosystems, CA, Estats Units). Es van quantificar els precursors de col·lagen I i III (procol·lagen I i procol·lagen III), un enzim implicat en el remodelat de la matriu extracel·lular (*matrix metalloproteinase 2*, MMP2) i un potent inductor de fibrosi miocàrdica (*transforming growth factor- $\beta$ 1*, TGF $\beta$ 1). Tots aquests s'havien demostrat incrementats a les 16 setmanes d'exercici en estudis previs.<sup>160</sup>

En ambdós casos, els nivells d'expressió es mostren mitjançant el mètode  $2^{-\Delta Ct}$ .

### Aïllament de miòcits

Es van aïllar els miòcits auriculars mitjançant digestió enzimàtica en un sistema de Langendorf (Figura 17). Les rates van ser anestesiades amb ketamina (100 mg/kg) i xylazina (10 mg/kg) i es va administrar heparina sòdica (1 mg/kg). El cor es va extreure i submergir

ràpidament en solució freda (4°C) de Tyrode (NaCl 136 mM, KCl 5.4mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, HEPES 5mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33 mM, glucosa 10mM) amb 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Es canulà l'aorta i el cor es va perfondre retrògradament amb solució de Tyrode a 37°C amb 200 µM Ca<sup>2+</sup> a 37°C fins a reiniciar el batec cardíac, mantenint-lo durant 4 minuts per a assegurar-se una correcta perfusió. Posteriorment, la solució se substituï per solució de Tyrode sense calci i consecutivament per solució enzimàtica (solució de Tyrode, col·lagenasa 200 UI mg/mL) que es va recircular durant 50 a 55 minuts. Passat aquest temps, i comprovada la consistència tova del teixit auricular, es van retirar ambdues aurícules i es van submergir en solució KB (KCl 20mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, glucosa 10mM, mannitol 40mM, albúmina 0.1%, àcid L-glutàmic 70mM, àcid β-hidroxibutíric 10mM, taurina 20mM, EGTA 10mM), trossejades i recollides amb extremada cura. Els miòcits obtinguts es van mantenir a temperatura ambient fins a ser usades, no després de 6 hores després d'obtenir-les.



Figura 17: Aparell de Langendorff utilitzat per a l'aïllament enzimàtic de miòcits auriculars. En el detall del requadre superior-dreta s'observa una ampliació del cor i la perfusió retrògrada.

### Valoració de l'estrès

Es va avaluar l'estrès que desenvoluparen les rates durant l'entrenament mitjançant l'ús de escales qualitatives. L'escala que es va emprar valora paràmetres de l'aspecte i autocora de les rates i del seu comportament.<sup>164</sup> Un observador extern va complimentar de forma cega un qüestionari en ambdós grups de rates (Sed, Ex) una hora després que les rates entrenades finalitzessin l'exercici, i una segona ocasió en fase de repòs (més de 12 hores després de finalitzar l'exercici). Totes les mesures es van repetir com a mínim per duplicat.

### Anàlisi estadístic

Les variables quantitatives s'expressen com a mitja±EEM. La distribució normal es va valorar visualment mitjançant la gràfica Q-Q, i la prova de Shapiro-Wilks. Els anàlisis estadístics de les variables quantitatives amb distribució normal es van fer generalment incorporant totes les dades en un model lineal d'efectes mixt (procediment MIXED) en el que es van considerar els efectes principals i totes les interaccions possibles. Davant la troballa d'interacció significativa entre els efectes principals, es va procedir a realitzar comparacions posthoc per parelles entre els grups individuals que conformen els efectes principals. En absència d'interacció però amb un o més efectes principals significatius, les comparacions post-hoc es van dur a terme entre els diferents grups dels efectes principals. En qualsevol dels dos casos, els anàlisis posthoc es van ajustar mitjançant LSD (*least significant differences*). Quan els grups estaven correlacionats (diverses mesures per a un mateix animal, per exemple en diferents punts temporals o diferents cambres cardíques), es va considerar aquest com un factor repetit i la matriu de covariàncies es va seleccionar entre

*compound symmetry*, Toeplitz, autoregressiu (AR1) i no estructurat (*unstructured*) mitjançant el *Akaike Information Criteria* (AIC) més baix.

Les variables quantitatives que no seguien una distribució normal degut a asimetria de la distribució (*skewness*) envers valors petits, s'aplicà una transformació logarítmica i posteriorment la prova estadística pertinent. En cas de no ser possible la normalització de la variable, es va aplicar l'estadístic no paramètric corresponent (U de Mann-Whitney per a comparació entre dos grups, prova de Kruskal-Wallis per a més de dos grups).

Les variables categòriques es mostren com a percentatge i es van comparar mitjançant  $\chi^2$  o prova de Fisher exacta (quan alguna de les caselles presentà un valor esperat inferior a 5).

### **3.5. Resultats**

#### Caracterització del substrat aritmogènic en l'exercici físic

En estudis previs, el nostre grup ha demostrat que l'exercici físic indueix un remodelat auricular que és capaç de sostenir FA, i en el que hi participa el remodelat estructural en forma de fibrosis (

**Figura 11).** En un subgrup de rates es va practicar una ecocardiografia a les 16 setmanes d'exercici. L'entrenament va induir el desenvolupament d'hipertrofia ventricular excèntrica, amb una lleugera, però significativa reducció de la fracció d'ejecció i disfunció diastòlica lleugera (Taula 1). Els resultats referents a les aurícules es mostren a la Figura 18. Tant l'aurícula esquerra com l'aurícula dreta presentaven una dilatació significativa després de 16

setmanes d'exercici, que pot contribuir al substrat aritmogènic de la FA. La dilatació auricular s'acompanyava d'hipertrofia dels miòcits auriculars mesurada mitjançant la capacítancia durant els registres electrofisiològics (Sed vs Ex;  $73,5 \pm 5,0$  pF vs  $129,1 \pm 8,7$  pF,  $p < 0,001$ ).

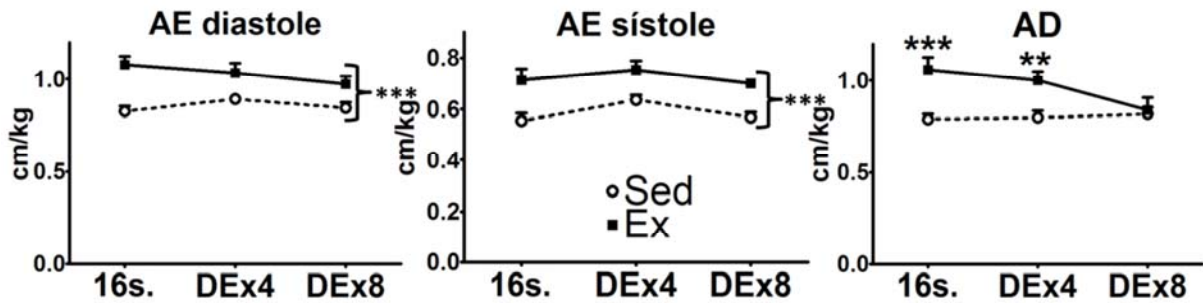


Figura 18: Paràmetres ecocardiogràfics auriculars (mitja  $\pm$  EEM) en el grup de desentrenament. 16 setmanes: n=15 (Sed), n=10 (Ex); DEx4: n=15 (Sed), n=10 (Ex); DEx8: n=10 (Sed), n=6 (Ex). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  Sed vs Ex.

Els resultats previs suggerien un canvi en el balanç autonòmic (

**Figura 11B**). En aquest subprojecte es van obtenir registres de telemetria en rates despertes i sense restricció de moviments durant 24 hores que van permetre una primera aproximació al balanç autonòmic. Els animals entrenats van desenvolupar una lleugera bradicàrdia sinusal a partir de les 8 setmanes, que es va fer més intensa a partir de les 16 setmanes d'exercici (Figura 19).

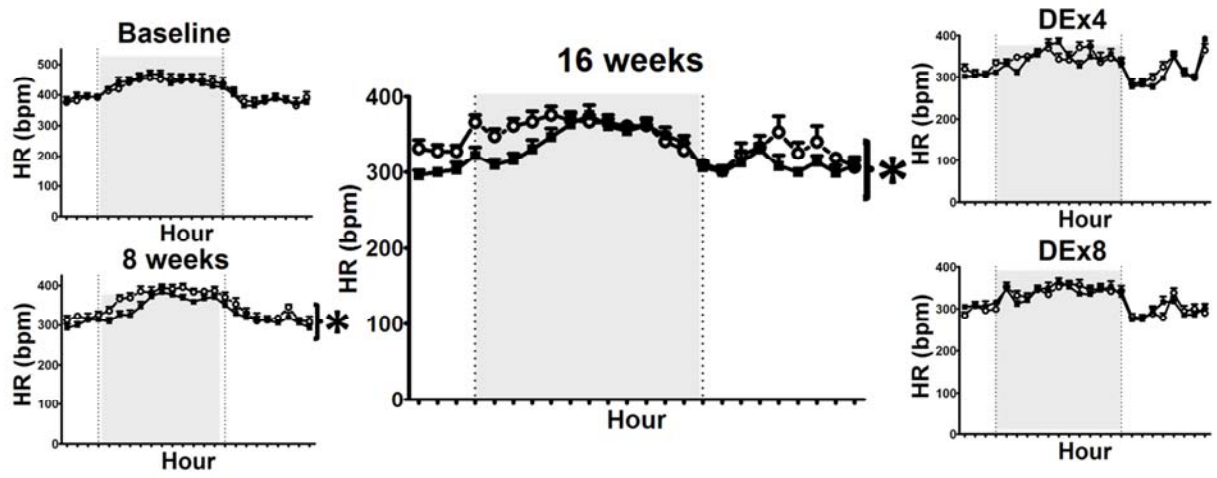


Figura 19: Quantificació (mitja±EEM) de la freqüència cardíaca en cada hora durant un 24 hores consecutives en els diversos punts temporals. Ex n=8; Sed n=7. \*p<0.05 Sed vs Ex.



16 setmanes		DEx4		DEx8	
Sed (n=15)	Ex (n=10)	Sed (n=15)	Ex (n=10)	Sed (n=10)	Ex (n=6)
1.6±0.03	1.51±0.03***	1.23±0.04	1.42±0.07**	1.19±0.04	1.33±0.07
0.3±0.03	0.75±0.03	0.56±0.03	0.69±0.05	0.55±0.02	0.7±0.06
0.8±0.01	0.32±0.01	0.29±0.01	0.3±0.01	0.26±0.01	0.28±0.01
0.1±0.01	0.36±0.02**	0.32±0.01	0.32±0.02	0.3±0.01	0.31±0.02
0.7±0.04	1.91±0.06	1.77±0.05	1.97±0.14	1.73±0.05	1.8±0.12
85.3±1.04	85.4±1.54	88.49±0.89	86.41±1.17	88.44±1.17	83.12±1.85
1.9±0.05	1.73±0.08*	1.42±0.05	1.37±0.06	1.39±0.09	1.53±0.05
3.4±1.04	3.62±0.10***	3.68±0.12	3.73±0.12**	3.63±0.07	3.67±0.26
0.5±0.02	0.42±0.01	0.44±0.02	0.45±0.02	0.44±0.02	0.46±0.02
3.8±0.11	3.476±0.077	3.08±0.14	3.36±0.15	3.15±0.11	3.09±0.07

índexs ventricular (mitja±EEM) en l'estudi de reversibilitat. DTD VE: diàmetre telediastòlic ventricle esquerre; DTS VE: diàmetre telesistòlic ventricle esquerre; SIV: septe interventricular; FEVE: fracció d'ejecció del ventricle esquerre; TRIVc: temps relaxació isovolumètric corregit pel RR; TAPSE: *tricuspid annulus plane systolic excursion*. El número d'animals usats s'indica en la primera fila. \*p<0,05; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 Sed vs Ex (efecte principal significatiu, per tant aplica a tots els punts temporals).

La bradicàrdia en aquests registres pot ser conseqüència d'una reducció del to simpàtic, increment del to parasimpàtic o a canvis en la freqüència cardíaca intrínseca. Cal remarcar que la intensitat de la bradicàrdia va ser especialment marcada durant el cicle de llum (coincidint amb la fase de son de les rates) en la que fisiològicament el to parasimpàtic és més alt, i per contra, mínima durant el cicle de fosc (predomini simpàtic i mínim component parasimpàtic).

Per a estudiar la contribució d'ambdós components del to autònic a la bradicàrdia en el grup Ex, es va mesurar la contribució individual del to simpàtic i parasimpàtic al control de la funció cardíaca mitjançant el seu bloqueig seqüencial amb atropina i propranolol. Després de 16 setmanes d'exercici, l'índex parasimpàtic estava marcadament incrementat en les rates del grup Ex, demostrant-ne una potenciació (Figura 20). No es varen detectar canvis significatius en el to simpàtic ni en la freqüència cardíaca intrínseca (després del bloqueig doble, Sed vs Ex;  $318 \pm 8$  bpm vs  $338 \pm 8$  bpm,  $p=ns$ ). Aquests resultats demostren un remodelat autòmic consistent en una potenciació del to parasimpàtic en les rates entrenades, susceptibles a desenvolupar FA.

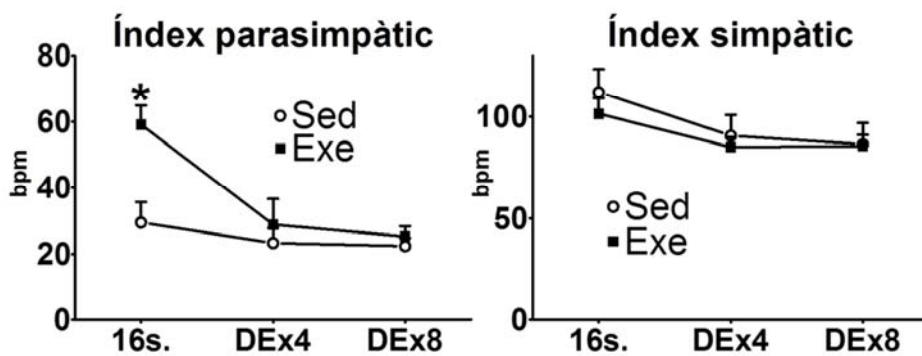


Figura 20: Quantificació (mitja  $\pm$  EEM) de l'índex parasimpàtic i simpàtic després de 16 setmanes d'exercici físic en cinta rodant. Modelat lineal d'efectes mixtes, temps com a factor repetit. N=6 en cada grup. Interacció significativa al nivell de 0,05. \* $p < 0,05$  Sed vs Ex

El remodelat elèctric representa el tercer pilar del substrat aritmogènic en la FA.<sup>18</sup> L'efecte net és nul, reflectit per la manca de canvis en el període refractari auricular a les 16 setmanes de l'exercici (Taula 2).

### Reversibilitat de la inducibilitat en aturar l'entrenament

Els resultats previs i els presentats en aquest subprojecte demostren que el remodelat estructural i auricular són potencials contribuïdors al desenvolupament d'un substrat auricular per a la FA en atletes. Per a aprofundir en la seva contribució, s'estudià l'evolució de la inducibilitat de FA i dels factors associats després de finalitzar l'exercici físic. Un grup de rates que s'havien entrenat durant 16 setmanes, van finalitzar l'exercici físic, van ser mantingudes sedentàries i van ser estudiades a les 2 (només per a obtenció de teixit), 4 i 8 setmanes.

Quatre setmanes després de finalitzar l'exercici, la inducibilitat de FA en el grup de rates que havia fet exercici s'havia reduït dràsticament i era comparable a les del grup Sed. Els resultats eren similars 8 setmanes després de l'exercici (Figura 21).

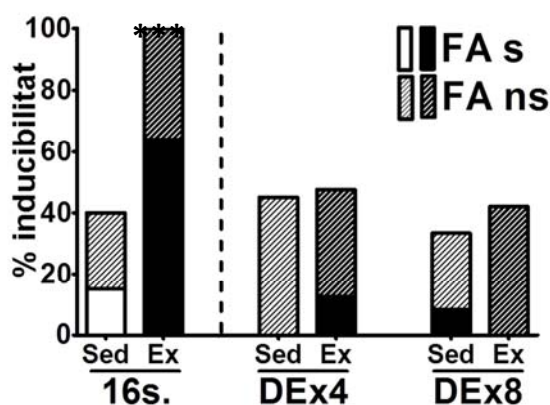


Figura 21: Inducibilitat de FA (sostinguda, FA s i no sostinguda, FA ns) en tots els grups experimentals. Els resultats a les 16 setmanes provenen de la

Figura 11 i es mostren com a referència. Per a Sed: n=15 DEx4; n=10 DEx8. Per a Ex: n=10 DEx4; n=6 DEx8. \*\*\*p<0,001 Sed vs Ex.

No hi havia diferències en cap paràmetre de l'ECG ni a les 4 ni a les 8 setmanes de finalitzar l'exercici (Taula 2).

Paràmetre	16 setmanes		DEx4		DEx8	
	Sed (n=20)	Ex (n=14)	Sed (n=20)	Ex (n=8)	Sed (n=12)	Ex (n=7)
<b>ECG</b>						
PR (ms)	51±1	53±1	21±0.1	20±0.2	22±0.3	22±0.4
Pdur (ms)	21±1	22±1	60±1	57±2	66±2	61±2
QRS (ms)	22±1	22±1	21±0.1	20±0.4	22±0.3	22±0.4
QTc (ms)	205±3	214±4	176±5	175±4	189±7	192±11
<b>EEF</b>						
WCL (ms)	121±3	139±4**	112 ± 2	113 ± 7	126 ± 4	117±4
RSCL (ms)	195±4	223±6***	185 ± 4	190 ± 11	210 ± 5	200±7
ARP (ms)	42±1	40±1	39 ± 1	37 ± 3	46 ± 3	39 ± 3

Taula 2: Resultats (mitja±EEM) de la medició dels intervals de l'ECG i del paràmetres EF en cadascun dels punts temporals estudiats. Els resultats a les 16 setmanes provenen d'estudis previs<sup>160</sup> i es mostren com a referència.

El to parasimpàtic va seguir una evolució paral·lela a la inducibilitat de FA. La longitud del cicle sinusal i de Wenckebach, que estaven incrementats a les 16 setmanes, revertiren a les 4 setmanes de finalitzar l'exercici (Taula 2). La bradicàrdia observada durant el període d'entrenament en registres de telemetria havia revertit ja en el DEx4 (Figura 19). Ambdós fets suggeriren una ràpida reversió del disbalanç autonòmic en aturar l'entrenament. L'índex parasimpàtic corroborà aquest fet (Figura 20). Després de finalitzar l'exercici, el to parasimpàtic revertí ràpidament, i era

comparable a les rates sedentàries després de 4 setmanes. No es trobaren diferències en el to simpàtic en cap punt temporal.

L'evolució del remodelat estructural diferí significativament de la del to autonòmic. En l'ecoardiografia, els diàmetres sistòlic i diastòlic de l'aurícula esquerra es varen mantenir significativament dilatats durant tot el període de desentrenament estudiat, amb poca tendència a revertir (Figura 18). L'aurícula dreta es va mantenir dilatada a les 4 setmanes de finalitzar l'exercici, però es va normalitzar 4 setmanes més tard (DEx8). La dilatació, hipertròfia i disfunció sistòlica del ventricle dret no varen retornar completament als valors sedentaris en tot l'experiment (Taula 1).

El procés de fibrogènesi activa s'avaluà mitjançant la quantificació de l'expressió de mRNA de marcadors de fibrosi (TGF- $\beta$ , MMP-2, procol·lagen I i III) en ambdues aurícules. L'expressió d'aquests marcadors s'havia demostrat incrementada en experiments previs després de 16 setmanes d'exercici.<sup>160</sup> Els quatre marcadors, havien revertit fins a valors comparables als sedentaris a les 2 setmanes d'aturar l'exercici físic (Figura 22), implicant l'aturada del procés de fibrogènesi activa. No hi havia diferències significatives entre l'aurícula dreta i esquerra.

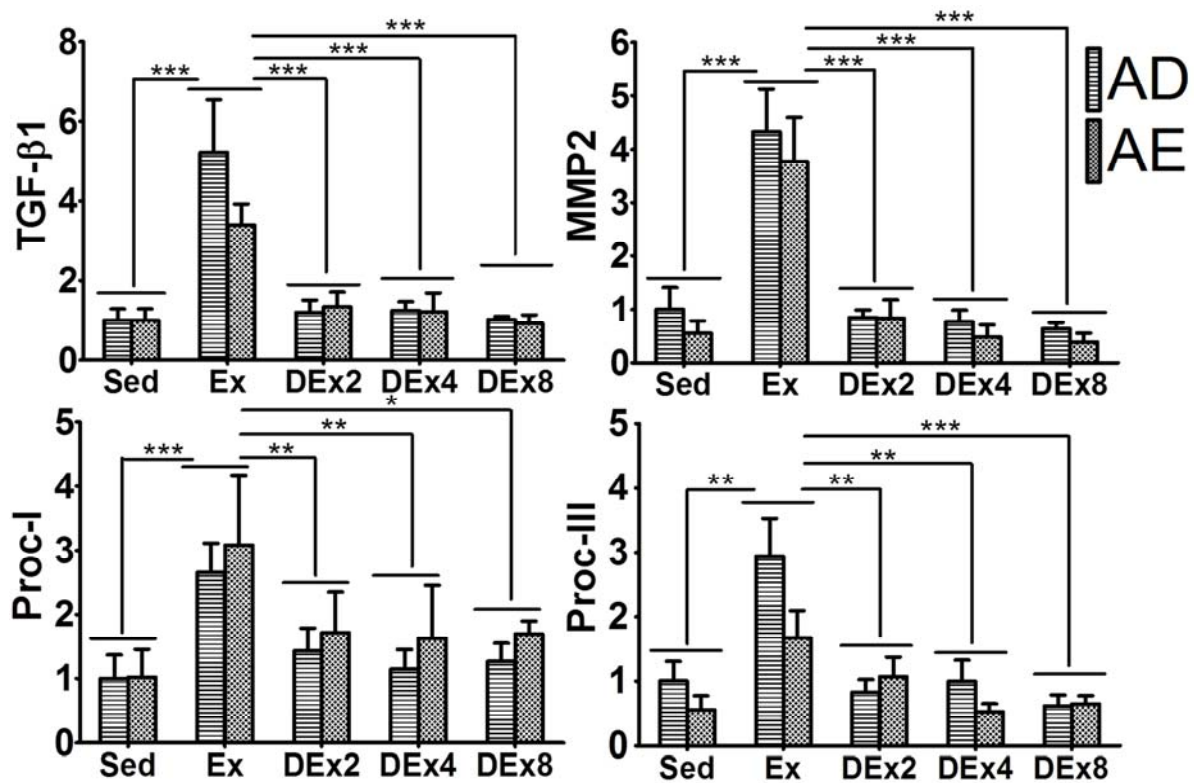


Figura 22: Quantificació (mitja±EEM) de l'expressió de mRNA de diferents marcadors de fibrosi miocàrdica en ambdues aurícules després d'aturar l'exercici. Els valors Sed i Ex (ambdós a les 16 setmanes) es mostren com a referència. Proc-I: procollagen I. Proc-III: procollagen III. \*p<0,05;\*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001 vs Ex.

El dipòsit de col·lagen es va valorar en mostres histològiques tenyides amb vermell de Picosirius. La fibrosi tissular avaluada amb aquesta tècnica revertí parcialment en aturar l'entrenament, però es mantingué significativament superior al grup Sed durant tot el període estudiat. Globalment, després de 16 setmanes d'exercici l'increment de fibrosi havia sigut del 60%, mentre que en els grups DEx4 i DEx8 s'havia reduït a 30% (Figura 23). La ràpida normalització de l'expressió dels marcadors de fibrosi amb un increment de fibrosi implica una aturada de la fibrogènesi activa, però persistència del col·lagen prèviament sintetitzat.

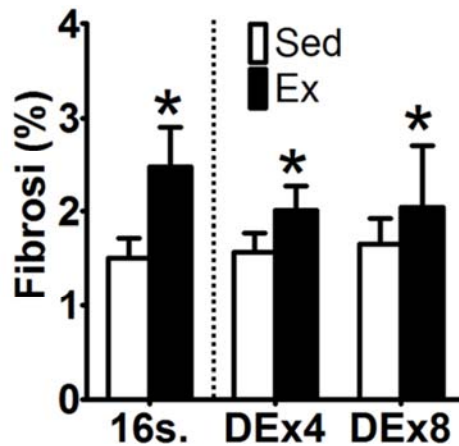


Figura 23: Quantificació (mitja±EEM) de la fibrosi intersticial en mostres histològiques. Les dades a les 16 setmanes són les de la Figura 11 i es mostren com a referència. Ex: N=3 (per a DEx4 i DEx8), Sed: n=5 (per a DEx4 i DEx8). Anàlisi mitjançant modelat lineal d'efectes mixtes, efecte de grup significatiu sense interacció. \*p<0,05 Sed vs Ex.

### Valoració de l'estrès

La valoració de l'estrès mitjançant una escala qualitativa, analitzada per una observador extern, no va trobar diferències significatives ni basalment ni una hora després de l'exercici físic (Figura 24).

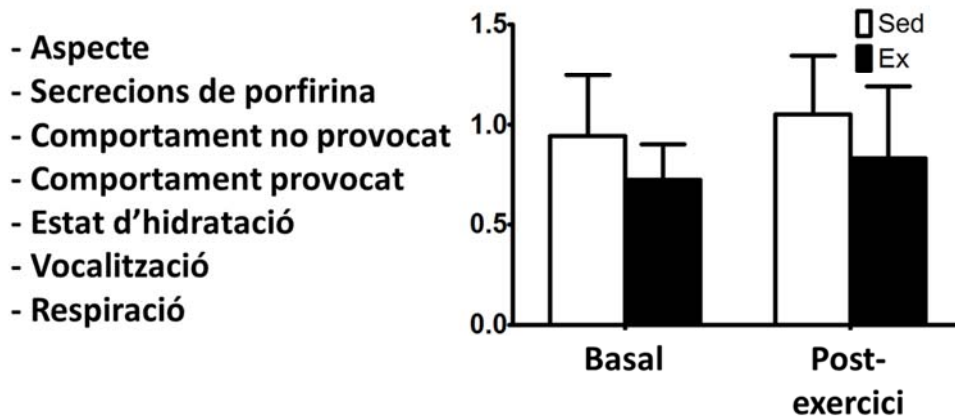


Figura 24: Ítems usats en la valoració del distrès (esquerra) i resultats obtinguts en la valoració en estat basal i post-exercici (dreta). Post-exercici inclou l'anàlisi fet una hora després de l'exercici tant el grup Ex com el Sed. N=6 per ambdós grups.

### **3.6. Conclusions**

En aquest projecte aprofundim en el coneixement dels mecanismes implicats en el desenvolupament de FA com a resultat de l'exercici físic de resistència intens i mantingut durant llargs períodes. Confirmem que el to parasimpàtic es troba incrementat en aquest grup de rates i pot contribuir al desenvolupament de FA. L'exercici físic indueix un remodelat elèctric compensat, que no genera canvis en la duració del període refractari i, probablement, sense implicació directa en l'aritmogenicitat.

Els experiments de reversibilitat demostren que la finalització de l'exercici físic és capaç de revertir la capacitat de sostenir FA. La reversió precoç del remodelat autonòmic i la inducibilitat, i la més tardana del substrat estructural, suggereixen un paper central del to autonòmic, i un de complementari del substrat estructural (fibrosi i dilatació auricular).

Si aquests resultats es confirmen en humans, tindrien importants implicacions en el tractament i prevenció de la FA de l'atleta.





# 4

## SUB-PROJECTE 2:

### ESTUDI DE LA PARTICIPACIÓ DE MIR-21 EN EL REMODELAT ESTRUCTURAL AURICULAR I POTENCIAL TERAPÉUTIC

---

#### 4.1. Justificació

L'estudi dels mediadors implicats en la fibrosi auricular com TGF $\beta$ , endotelina o el SRAA permet conèixer millor els mecanismes que generen el substrat de la FA de moltes etiologies, i proposar noves teràpies antiarítmiques.<sup>67</sup> Recentment, la descripció dels miRNA ha obert noves vies per a l'estudi de la fisiologia i patologia cardíaca.<sup>153</sup> Thum et al. van demostrar que miR-21 era el miRNA que més es desregulava en el ventricle esquerre de rates amb insuficiència cardíaca de diferents etiologies.<sup>152</sup> La repressió de la traducció de Sprouty1 per part de miR-21, un regulador negatiu de les protein-quinases activades per mitògens (o *mitogen-activated protein kinases*, MAPK1/2, també anomenades *erk1/2*) es postulava com a mecanisme mediador.<sup>152</sup>

Erk1/2 són dues proteïnes amb un 85% d'homologia, implicades en el cicle cel·lular.<sup>165</sup> La conseqüència de l'increment de l'expressió de miR-21 és la proliferació de fibroblasts, la fibrosi miocàrdica i la disfunció ventricular. El bloqueig de miR-21 mitjançant inhibidors administrats sistèmicament prevé la disfunció ventricular.<sup>152</sup>

Fins al moment es desconeix el paper de miR-21 en el remodelat auricular i de la promoció de FA. Estudis previs en gossos amb insuficiència cardíaca demostraven que erk1/2 estaven activades en teixit auricular, especialment en fases precoces, i es relacionava amb la fibrosi miocàrdica.<sup>17</sup> Aquest fet suggereix que miR-21 podria participar també en la fibrosi auricular i participar en la promoció de la FA.

Per a estudiar-ho, prèviament es va generar i descriure un model de FA en el context d'infart de miocardi en rata, donada la dificultat d'administrar inhibidors de microRNA de forma selectiva i global a tota l'aurícula en animals grans.

#### **4.2. Hipòtesis**

La producció d'un IM en rates es capaç de causar una disfunció ventricular, promovent el desenvolupament d'un remodelat auricular que incrementarà la inducibilitat de FA. El miR-21 participa en el desenvolupament d'aquest substrat i la seva inhibició és capaç de prevenir la inducció de FA.

### 4.3. Objectius

Els objectius específics d'aquest subprojecte són:

- Descriure un model animal de FA secundària a disfunció ventricular isquèmica
- Valorar si miR-21 està implicat en el desenvolupament del substrat aritmogènic.
- Conèixer si la inhibició de miR21 és capaç de revertir el substrat aritmogènic i la inducibilitat de FA.

### 4.4. Mètodes

#### Model animal

Per a generar un remodelat auricular secundari a insuficiència cardíaca, s'usà un model d'infart de miocardi en rata per lligadura de l'artèria coronària descendent anterior. S'utilitzaren rates Wistar mascle, d'entre 200 i 250 grams de pes.

Amb la rata anestesiada (isofluorà 3%), intubada i ventilada mecànicament (O<sub>2</sub> 100%, 2,5 mL/respiració, 60 respiracions per minut), es procedí a toracotomia esquerra, a través de la qual s'exposà la cara anterior del ventricle esquerre i aurícula esquerra. Es visualitzà la coronària descendent anterior i es lligà mitjançant una seda de 6-0, aprofundint aproximadament 1 mm en l'espessor del miocardi. Es comprovà una lligadura correcta de l'artèria descendent anterior mitjançant l'observació de canvis electrocardiogràfics isquèmics en l'ECG. En cas de no visualitzar-se canvis, no es procedí a un segon intent per a evitar altres danys al cor. Posteriorment, el tòrax es tancà amb sutura de seda 3-0, i la pell amb grapes. Es va administrar

analgèsia amb buprenorfina abans de la cirurgia i 6 hores després. En el grup control es va seguir tot el procediment excloent la lligadura de la coronària descendent anterior. Per a evitar el dany colateral o sobre la coronària, no s'introduí l'agulla ni la seda en el miocardi en el grup control (Ctrl).

Amb posterioritat a la cirurgia, totes les rates es van mantenir establades en les condicions habituals fins al seu estudi a les 2, 4 o 8 setmanes. Per a seleccionar aquelles rates amb un infart significatiu que fos capaç d'originar trastorns hemodinàmics secundaris, es van incloure en el grup IM únicament per a l'anàlisi aquelles en les que l'ecocardiografia va objectivar un infart de miocardi greu definit com un índex de motilitat de les parets (*WMSI, wall motion score index*) igual o superior a 1,66 (veure apartat d'ecocardiografia per a la descripció del mètode).

#### Bloqueig de miR-21

Per a bloquejar l'acció de miR21 a nivell local, s'injectà antiMir-21 intramiocàrdicament. Es descartà l'administració sistèmica per a evitar influir en l'evolució natural de l'infart de miocardi.<sup>152</sup> L'administració es va dur a terme durant la cirurgia de l'infart de miocardi. Just després de la toracotomia i abans de la lligadura de la coronària descendent anterior, es va injectar un volum final de 10 µL de solució salina amb 5 µg/µL d'antimiR-21 o un control negatiu (Exiqon, Dinamarca) en 4-5 punts de l'aurícula esquerra mitjançant una micro-xeringa Hamilton amb una agulla de 31G.

Es va administrar aleatòriament un oligonucleòtid amb seqüència completament complementària a la regió *seed* de miR-21 (grup KD21) o un oligonucleòtid inert, sense capacitat de reconèixer cap miRNA conegut (grup Scram). Ambdues sondes disposaven de 9 nucleòtids de tipus *locked*

*nucleic acid* (LNA) en les mateixes posicions. Els nucleòtids LNA són modificats sintèticament per a tancar l'anell de la ribosa amb un grup metilè entre els àtoms 2'-O i 4'-C (Figura 25A), permetent una major estabilitat tèrmica del complex mRNA-miRNA, més facilitat per a establir unions específiques de complementarietat i major resistència a exo i endonucleases. La seqüència de la sonda del grup KD21 era *tcagtctgataagct* i la del grup Scram *cgtctagccacctag* (Figura 25B). Ambdues sondes van ser adquirides a Exiqon (Vedbaek, Dinamarca).

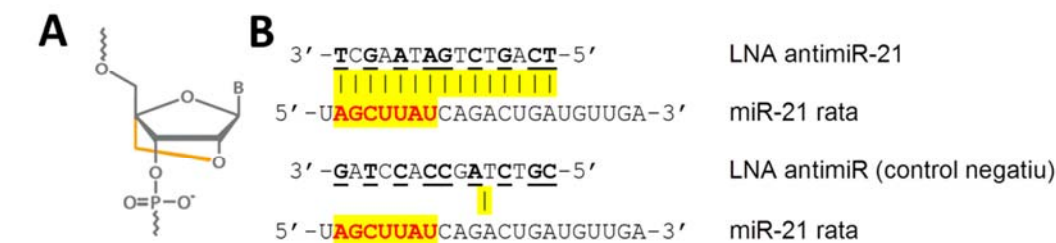


Figura 25: Sondes usades per a l'experiment de bloqueig de miR-21. (A) Nucleòtid de tipus LNA. En taronja es mostra el pont que uneix 2'-O i 4'-C. Reproduït de [www.exiqon.com](http://www.exiqon.com) (B) Seqüències de l'anti-miR-21 i la sonda control negatiu. Ressaltades en groc, la seqüència *seed* de miR-21, i mitjançant | s'indica la complementarietat de bases. En la seqüència dels LNA anti-miR, la negreta indica que un nucleòtid és de tipus LNA.

### Estudi electrofisiològic

Per a l'EEF, s'utilitzaren els mateixos mètodes que els exposats a l'apartat 3.4 per a la determinació del període refractari, cicle de Wenckebach i la mesura dels paràmetres de l'ECG. Per a la inducibilitat, s'utilitzà un protocol basat en un, dos o tres extraestímuls aplicats sobre un cicle basal de 150 ms. En cas de no induir-se FA, es van administrar ràfegues de 100 estímuls amb una longitud de cicle de 100ms, decreixent en 5 ms, fins a una longitud de cicle 10 ms superior al període refractari, reduint en 2 ms posteriorment. Es va quantificar la duració màxima dels episodis de FA induïts en cada rata.

La FA es va definir com un arítmia amb un cicle irregular en l'electrograma auricular, absència d'ones P en l'ECG, amb oscil·lació de la línia de base i ritme ventricular irregular. Quan es va induir FA, se'n va quantificar la duració.

#### Quantificació de mRNA/miRNA

El RNA total es va aïllar en mostres de teixit auricular esquerre congelat usant el kit mirVana per a aïllament enriquit de miRNA (AM1560, Invitrogen Corporation, NY, Estats Units) d'acord amb les instruccions del fabricant. La concentració resultant de RNA es va estimar quantificar amb un espectrofotòmetre Nanodrop ND-100. La quantificació de miR21 es va dur a terme mitjançant *primers* Taqman específics (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estats Units). El procés de RT-PCR es va dur a terme en un ciclador MX3000P (Stratagene, Agilent technologies, Santa Clara, CA, Estats Units) Els resultats es referencien a SnU6 i es mostren segons el mètode  $2^{-\Delta Ct}$ . Es va seguir el mateix procediment per a la quantificació de l'expressió de mRNA de Sprouty-1, procol·lagen I $\alpha$  i procol·lagen III $\alpha$ , mostrant l'expressió relativa a GAPDH mitjançant el mètode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### Quantificació de proteïnes

Es van usar mostres pulveritzades de teixit d'aurícula esquerra congelada, que es van dipositar en solució freda d'extracció (25 mmol/L Tris-HCl , 1 mmol/L EGTA, 10% glicerol, 1% Triton-X 100, 10 mmol/L dithiothreitol, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 25 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ mol/L microcystin LR, 10  $\mu$ g/mL leupeptin, 0.1 mmol/L 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl-fluoride hydrochloride) per a ser homogeneïtzades amb un polítró. El

sobrenedant després de centrifugar es va recollir i la concentració de proteïnes quantificat mitjançant una prova de Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, CA, Estats Units).

Extractes de proteïna (total de 100 µg) es van separar en gels de poliacrilamida al 12% i es van transferir a membranes de nitrocel·lulosa. Les membranes van ser incubades successivament amb l'anticòs primari i secundari, revelades mitjançant quimioluminiscència i analitzades densitomètricament. Es van utilitzar anticossos primaris contra ERK1/2 i contra la forma fosforilada d'ERK1/2 (forma activa), així com anticossos anti-GAPDH, que es va usar com a control.

### Histologia

Es quantificà la fibrosi intersticial en mostres histològiques mitjançant la tinció de tricròmic de Masson. El tricròmic de Masson tenyeix les fibres de col·lagen de color blau, i la quantificació es va dur a terme de forma similar a l'esquematitzat per a picosirius a la Figura 16.

### Ecocardiografia

Es van realitzar estudis ecocardiogràfics en tots els animals abans d'altres estudis *in vivo*. Es va utilitzar una sonda 10S (4,5 – 11,5 MHz) en un aparell Vivid-7, sota anestèsia inhalada amb isofluorà al 2%. Els mètodes usats van seguir els usats a l'apartat 3.4. Els diàmetres en telesístole (AEs), i en telediàstole (AEd) de l'aurícula esquerra, i el diàmetre sistòlic de l'aurícula dreta (AD), es varen mesurar en el mode M del pla paraesternal d'eix llarg. La fracció d'escurçament es va calcular com a paràmetre estimador de la funció auricular mitjançant:

$$FE_{auricular} (\%) = \frac{(AEd - AEs)}{AEs} * 100$$



Els diàmetres telediastòlic i telesistòlic i gruixos ventriculars del ventricle esquerre es van mesurar en el mode M en eix curt del pla paraesternal a l'alçada dels músculs papil·lars. La fracció d'ejecció es va obtenir amb la fórmula inclosa en el software incorporat a Vivid7 i basada en el càlcul bidimensional de l'àrea. La funció diastòlica es va valorar amb el quocient  $E/E_m$ , on E es la velocitat de l'ona E en el registre del Doppler polsat del flux transmitral, i  $E_m$  és la velocitat de la primera ona sistòlica en el registre de Doppler tissular en l'anell mitral lateral.

L'índex de funció miocàrdica global (*myocardial performance index, MPI*) es va calcular com:

$$MPI = \frac{MVco - TEVAo}{TEVAo} \times 100$$

on MVco és el temps entre el tancament de la vàlvula mitral i la reobertura mesurat en el registre Doppler polsat situat per sobre de la vàlvula mitral, i TEVAo és el temps d'ejecció calculat amb el registre Doppler polsat obtingut en el tracte de sortida del ventricle esquerre.

Per a la selecció de les rates amb un infart de miocardi suficientment greu com per a desenvolupar trastorns hemodinàmics secundaris, es va utilitzar l'índex de motilitat de les parets ventriculars (*wall motion score index, WMSI*). Per a calcular-lo, es va seleccionar un pla paraesternal curt a l'alçada del múscul papil·lar (Figura 26) i es va assignar una puntuació a cada segment de ventricle esquerre: 1 per a motilitat normal, 2 per a hipercinèsia, 3 per a acinèsia, 4 per a discinèsia i 5 per als segments aneurismàtics. La valoració la va realitzar personal experimentat en la valoració d'ecocardiografies. La puntuació global es va calcular sumant tots els valors i dividint per 6. Un índex superior a 1,66 es considerà infart greu.

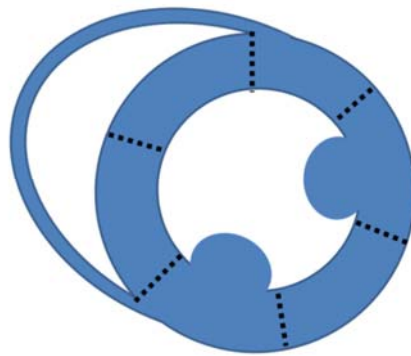


Figura 26: Representació esquemàtica dels 6 segments en els que es van valorar la motilitat regional per al càlcul del WMSI.

### Anàlisi estadístic

Les variables quantitatives amb distribució normal s'expressen com a mitja±EEM. La distribució normal de les variables es va comprovar visualment (gràfiques Q-Q) i mitjançant la prova de Shapiro-Wilks. Els anàlisis es van dur a terme mitjançant un modelat lineal d'efectes mixtes (procediment MIXED), en el que es van incloure tots els factors principals i totes les seves interaccions. Quan es va trobar una interacció o un efecte principal significatiu, es van dur a terme comparacions en parelles entre els grups adequats, ajustant mitjançant LSD (*least significant differences*).

Els resultats de variables que no seguien una distribució normal (resultats d'expressió gènica), s'hi va aplicar una transformació logarítmica de la variable, que aconseguí adaptar-les a una distribució normal:

$$y' = \ln y$$

Els resultats del WMSI i de la duració de la FA induïda no seguien una distribució normal ni basalment ni després de la transformació logarítmica, i les comparacions es van fer amb una prova no paramètrica de Kruskal-Wallis i les comparacions post-hoc ajustant segons el mètode

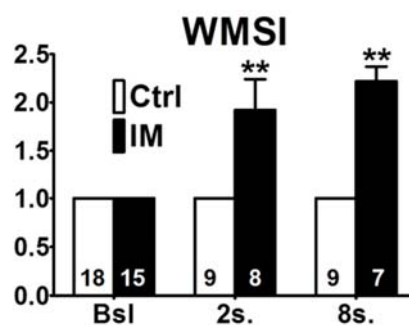
de Dunn. Per a aquestes variables, els resultats es mostren com a mediana (rang interquartil).

Tots els anàlisis estadístics es van obtenir amb SPSS v19.0 (IBM, Armonk, NY, Estats Units) i GraphPad v5.0 (La Jolla, CA, Estats Units). Una  $p < 0,05$  es va considerar com a significativa.

#### 4.5. Resultats

##### Descripció del model de FA en rates amb infart de miocardi

La cirurgia d'infart de miocardi va induir eficaçment un marcat empitjorament en la funció ventricular demostrada per ecocardiografia. El WMSI, utilitzat per a seleccionar les rates amb un gran IM, era significativament superior en el grup IM (Figura 27). Els resultats de la resta de paràmetres ecocardiogràfics es mostren a la Figura 28. La funció sistòlica ventricular, avaluada mitjançant la fracció d'ejecció, es trobava ja marcadament reduïda en el grup IM a les 2 setmanes de la lligadura de la coronària (control vs IM,  $82\% \pm 3\%$  vs  $32\% \pm 4\%$ ,  $p < 0,001$ ), i es va mantenir estable posteriorment. La disfunció sistòlica s'acompanyà de dilatació ventricular, disfunció diastòlica i un empitjorament en la funció global valorada mitjançant MPI, tots ells afectant-se de forma molt severa en les primeres dues setmanes.



**Figura 27:** Resultats (mediana, rang interquartil) de la mesura del WMSI en els grups control (Ctrl) i infart de miocardi (IM). \*\* $p < 0,01$  vs Bsl. Bsl: basal.

El remodelat auricular seguí un patró evolutiu més lent i progressiu, reflectint probablement la necessitat de desenvolupar alteracions hemodinàmiques abans de produir-se afectació auricular ecocardiogràfica. A les 2 setmanes de la cirurgia, el grup sotmès a un infart de miocardi presentà una lleuger increment en el diàmetre sistòlic i diastòlic de l'aurícula esquerra. L'aurícula esquerra es va seguir dilatant en les següents setmanes, i a les 8 setmanes post-infart de miocardi s'observà una dilatació molt marcada, significativa, en els dos diàmetres auriculars, que es corresponia amb una reducció de la funció sistòlica auricular. La dilatació de l'aurícula dreta a les 8 setmanes indica la presència d'alteracions hemodinàmiques severes que afecten el cor dret.

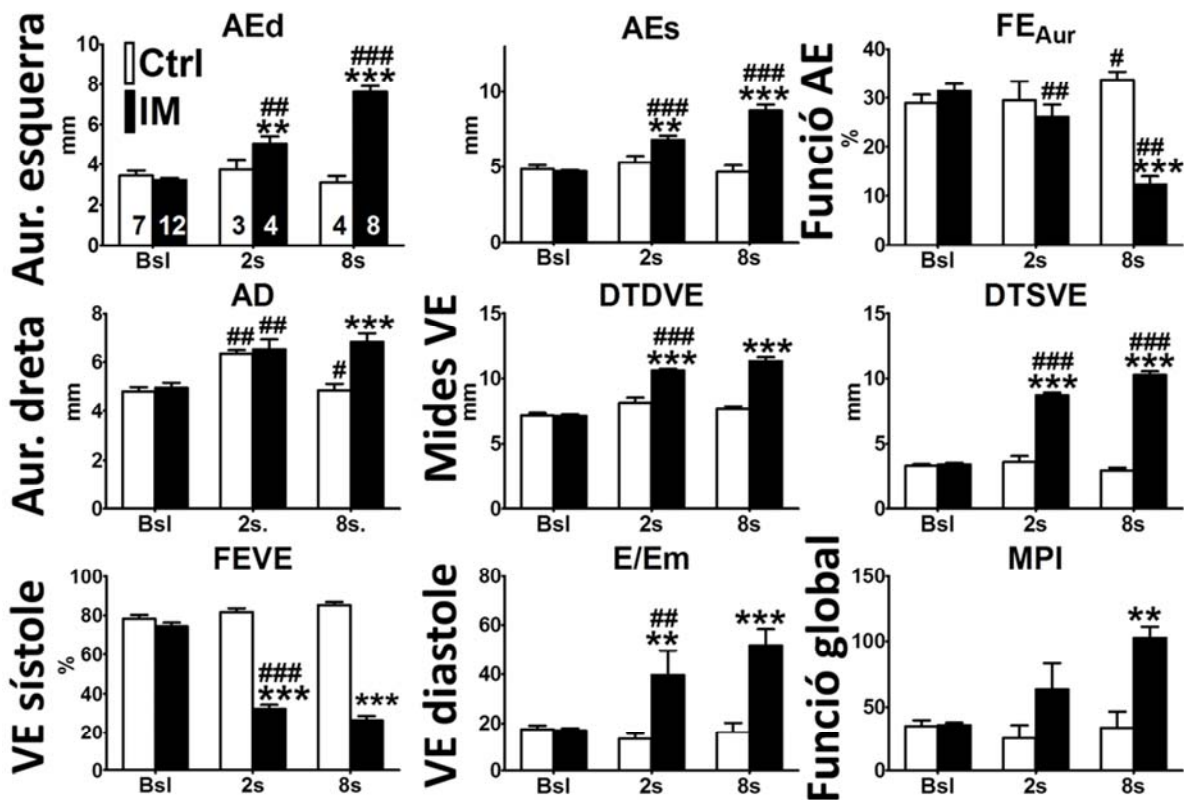


Figura 28: Resultats de l'ecocardiografia (mitja±EEM) abans de la cirurgia, a les 2 setmanes i a les 8 setmanes en els grups control i infart. Bsl: basal (pre-cirurgia); AEd: mida telediastòlica aurícula esquerra; AEs: mida telesistòlica aurícula esquerra; FE<sub>Aur</sub>: fracció d'escurçament auricular; AD: mida de l'aurícula dreta; DTDVE: diàmetre telediastòlic del ventricle esquerre; DTSVE: diàmetre telesistòlic del ventricle esquerre; FEVE: fracció d'ejecció del ventricle esquerre; MPI: *myocardial performance index*. El número d'animals utilitzats s'indica sobre les barres de la primera gràfica. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 Ctrl vs IM; # p<0,05; ###p<0,01; ###p<0,001 vs el punt temporal previ.

La fibrosi auricular miocàrdica es va avaluar mitjançant tincions histològiques de tricròmic de Masson a les 2, 4 i 8 setmanes de la cirurgia d'infart de miocardi. En la Figura 29A s'hi mostren fotografies representatives de cada punt temporal. Dues setmanes després de l'infart s'observà un increment molt marcat de la fibrosi miocàrdica. La quantificació del percentatge de fibrosi sobre l'àrea total es representa a la Figura 29B. Quantitativament, la densitat del dipòsit de col·lagen s'incrementà 5 vegades en les primeres dues setmanes post-infart. Aquest valor es va mantenir estable en les següents setmanes.

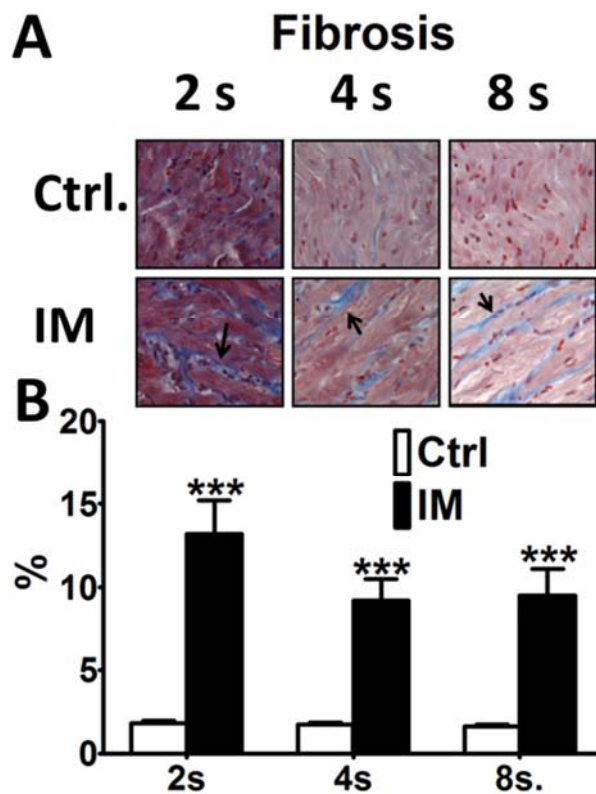


Figura 29: Valoració de la fibrosi miocàrdica induïda per l'infart de miocardi. (A) Microfotografies representatives de tincions d'aurícula esquerra amb tricròmic de Masson en els grup control (Ctrl) i amb infart de miocardi (IM), a les 2,4 i 8 setmanes. Els tractes fibrosis es troben representats en blau (fletxes). (B) Quantificació (mitja±EEM) del dipòsit de col·lagen en tots els grups experimentals. Per a Sed: n=4 en tots els punts temporals. Per a Ex: n=5 (2 set), n=3 (4 set), n=4 (8 set). \*\*\* p<0,001 Ctrl vs IM.

En global, aquestes dades mostren una disfunció ventricular severa precoç en l'evolució de

l'infart, que aboca a un procés fibrogènic auricular també precoç i a una dilatació auricular progressiva, més tardana.

Es va hipotetitzar que la via miR-21/Sprouty1/MAPK participa en el remodelat estructural en aquest model. En el moment del procés de fibrogènic més actiu, a les 2 setmanes de la cirurgia, l'expressió de miR-21 estava significativament incrementada en el grup IM (Figura 30A). La diana de miR-21, Sprouty-1, estava significativament menys expressada en l'aurícula esquerra de rates amb IM (Figura 30B). La reducció de Sprouty1 s'associà a un increment en la fosforilació de les proteïnes implicades en la regulació del cicle cel·lular erk1/2 (Figura 31). Aquests resultats confirmen l'activació de la cascada miR-21/Sprouty1/MAPK i suggereixen la seva participació en la fibrosi auricular en aquest model.

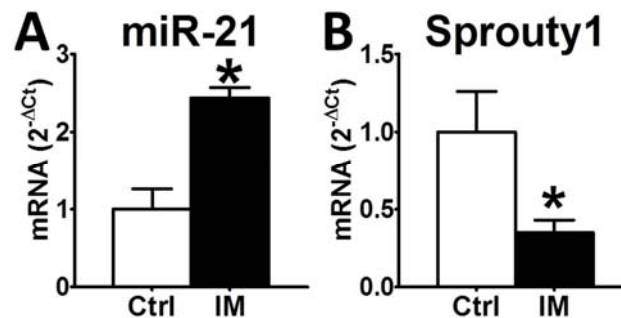


Figura 30: Quantificació (mitja±EEM) de l'expressió de (A) miR-21 i (B) Sprouty1. N=5 per a tots els grups. \*p<0,05 Ctrl vs IM.

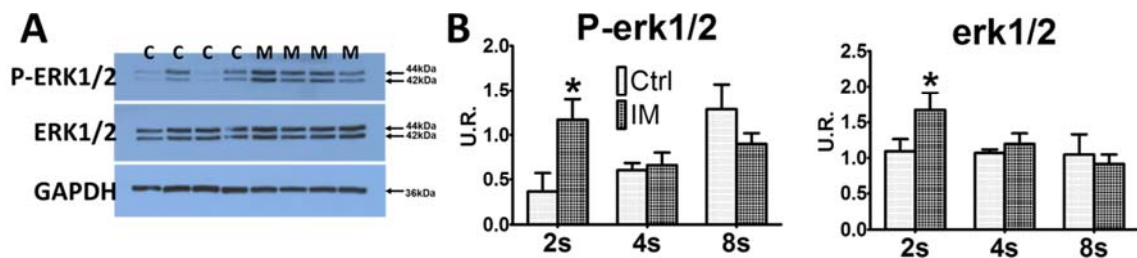


Figura 31: Quantificació de l'activació de les MAPK erk1/2 en aurícula esquerra (A) Gel de Western-blot per a la valoració d'erk1/2 en aurícula esquerra de rates control (C) i amb infart de miocardi (IM). (B) Quantificació d'erk1/2, com a proteïna total i en la seva forma fosforilada activada (p-erk1/2). N=4 per a tots els grups. U.R.: unitats relatives. \*p<0,05 Ctrl vs IM.

La validesa del model per a l'estudi de la FA es va avaluar en un EEF. Les troballes a les 2, 4 i 8 setmanes de la cirurgia es mostren a la Taula 3. Des de les 2 setmanes, les rates del grup IM presentaven una prolongació significativa del període refractari auricular i del cicle de Wenckebach, reflectint probablement el trastorn de la conducció infrahissia induït per un gran infart de miocardi. Aquests resultats es mantingueren estables a les 4 i 8 setmanes.

	2 setmanes		4 setmanes		8 setmanes	
	Ctrl. (n=5)	IM (n=12)	Ctrl. (n=12)	IM (n=15)	Ctrl. (n=12)	MI (n=15)
PRA (ms) <sup>###</sup>	39 ± 2	53 ± 2	41 ± 2	48 ± 2	41 ± 2	59 ± 3
TRNSc (ms)	39 ± 2	42 ± 12	40 ± 11	38 ± 15	36 ± 4	31 ± 6
WCL (ms) <sup>###</sup>	129 ± 9	156 ± 11	144 ± 7	151 ± 11	137 ± 4	161 ± 8

Taula 3: Resultats de l'EEF (mitja±EEM) dels grups control (Ctrl) i infart (IM) a les 2, 4 i 8 setmanes. El número d'animals usats s'indica a l'encapçalament de cada columna. PRA: període refractari auricular; TRNSc: temps de recuperació del node sinusal corregit pel RR; WCL: cicle de Wenckebach. <sup>###</sup>p<0,001 Ctrl vs IM (efecte de grup).

Es van induir episodis de FA de duració variable en totes les rates. Tot i que des de la setmana 2 algunes rates amb IM presentaven episodis de FA prolongada, no s'incrementà de forma significativa en el grup IM fins a 8 setmanes de la cirurgia (Figura 32). Aquestes dades, en conjunt, reflecteixen que és necessari el desenvolupament de fibrosi miocàrdica i dilatació auricular per a que el substrat sigui capaç de sostenir FA.

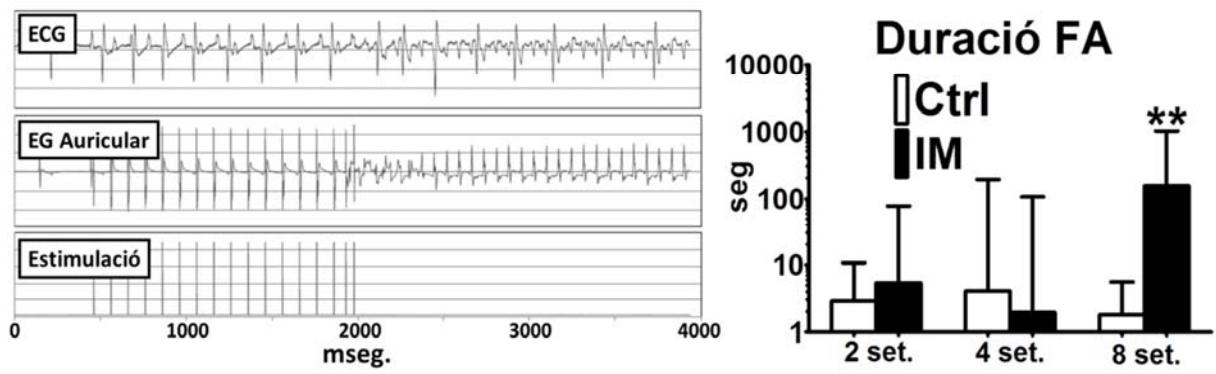


Figura 32: Traçat d'un episodi de FA induïda durant l'EEF mitjançant dos estímuls després d'un tren d'estimulació. A la dreta, duració dels episodis de FA induïda (mediana i rang interquartil). El número d'animals usats s'indica a la Taula 3. \*\* $p < 0.01$  Ctrl vs IM.

### Efecte antiarítmic del bloqueig de miR21

L'activació de miR-21/Sprouty1/MAPK no implica necessàriament la seva participació en l'increment de fibrosi. Per a confirmar que miR-21 és capaç de modular el substrat estructural i estudiar-lo com a possible nova diana terapèutica, es van realitzar estudis d'inhibició de miR-21. Per a bloquejar miR-21 es va administrar localment un LNA-antimiR complementari a miR-21 o un control negatiu (Figura 25). En un estudi preliminar, es va demostrar que una dosi intramiocàrdica auricular de 50 µg era capaç de bloquejar l'activitat local de miR-21 (resultats no mostrats).

L'efectivitat d'antimiR-21 en bloquejar l'activitat de miR-21 després de la seva administració local es va comprovar mitjançant quantificació amb RT-PCR de miR-21 en mostres d'aurícula esquerra (Figura 33). El tractament amb antimiR-21 va aconseguir reduir miR-21 tant en el grup control com en el grup IM a les 2 setmanes de la cirurgia. Sis setmanes més tard, a les 8 setmanes de la cirurgia, els nivells de miR-21 s'havien reduït dràsticament en els dos grups control i IM, i no es varen demostrar canvis per l'administració d'antimiR.



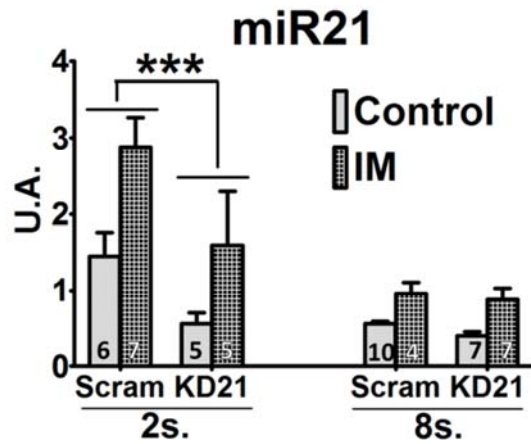


Figura 33: Quantificació de miR21 (mitja±EEM) en els diferents grups experimentals. El número d'animals utilitzats s'indica a sobre de cada barra. \*\*\* $p < 0,001$  Scram vs KD21.

En els EEF, l'administració de KD21 no va modificar el cicle de Wenckebach, el període refractari o el temps de recuperació del node sinusal en cap dels grups (control o IM) (Figura 34).

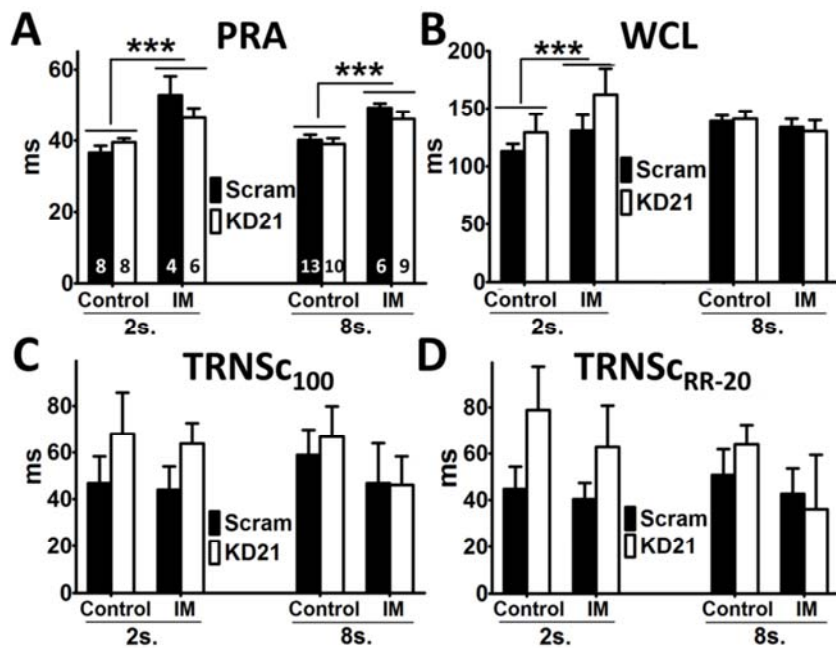
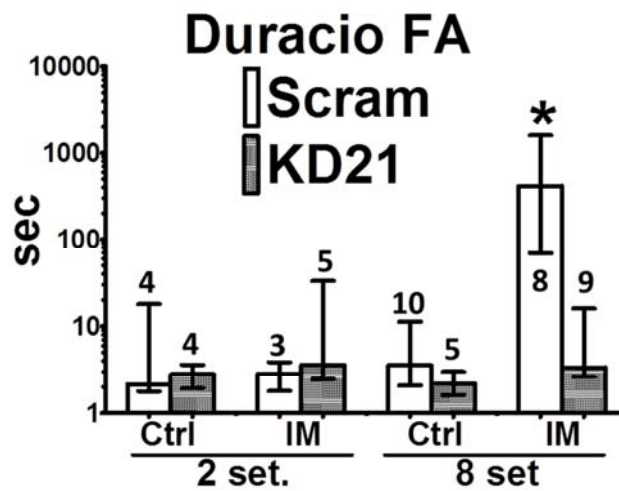


Figura 34: Paràmetres electrofisiològics (mitja±EEM) mesurats en tots els grups experimentals en l'experiment de bloqueig de miR-21. El número d'animals usats es mostra en l'interior de cada barra de la primera gràfica. PRA: període refractari auricular; WCL: cicle de Wenckebach; TRNSc<sub>100</sub>: temps de recuperació del node sinusal amb un S1 de 100 ms; TRNSc<sub>RR-20</sub>: temps de recuperació del node sinusal amb un S1 equivalent al RR-20 ms. \*\*\* $p < 0,001$  Scram vs KD21.

De forma similar als nostres resultats previs, a les 2 setmanes de la cirurgia la majoria d'episodis de FA induïts van ser de curta duració tant en el grup control com en el grup IM, sense efecte de l'administració de KD21. A les 8 setmanes, en el grup IM es van induir episodis prolongats de FA. Remarcablement, KD21 va ser capaç de reduir significativament la duració dels episodis de FA a les 8 setmanes de la cirurgia d'IM (Figura 35).



**Figura 35:** Duració de la FA induïda (mediana, rang interquartil) durant l'EEF en tots els grups experimentals. El número d'animals en cada grup es mostra sobre cada barra. \* $p < 0,05$  Scram vs KD21.

Es va hipotetitzar que l'administració de miR-21 previndria la FA a través d'una reducció de la fibrosi miocàrdica. La fibrosi miocàrdica es va estudiar en el grup Scram i KD21, control i IM, a les 8 setmanes de la cirurgia (Figura 36). En tincions histològiques de tricròmic de Masson el grup IM-Scram va incrementar 6 vegades el dipòsit de fibrosi respecte el grup control-Scram. L'administració d'antimiR-21 va revertir parcialment la fibrosi induïda per l'infart de miocardi, demostrant que miR21 participa en el desenvolupament de fibrosi miocàrdica en aquest model.

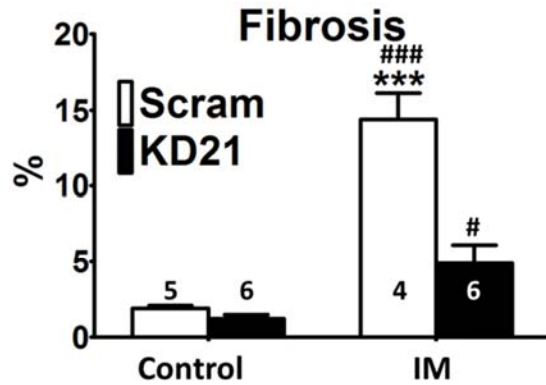


Figura 36: Quantificació de la fibrosi intersticial auricular (mitja±EEM,) en tots els grups experimentals a les 8 setmanes. El número d'animals a cada grup es mostra sobre les barres. \*\*\*p<0,001 Scram vs KD21, #p<0,05, ###p<0,001 control vs IM.

Els ECG obtinguts durant l'EEF recolzen l'efecte antifibròtic de l'administració d'antimiR-21. La duració de la ona P, que es correlaciona amb la fibrosi auricular i la vulnerabilitat a la FA,<sup>66</sup> estava prolongada en tots els grups IM respecte els control. L'administració d'antimiR-21 va reduir la duració de l'ona P tant el grup control com IM, a les 2 i 8 setmanes (Figura 37).

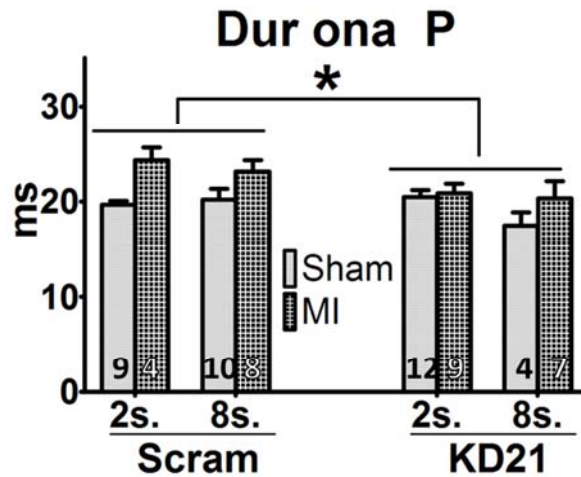


Figura 37: Duració de l'ona P (mitja±EEM) en l'ECG registrat a l'inici de l'EEF. El número d'animals en cada grup es mostra sobre cada barra. \*p<0,05 Scram vs KD21.

La duració de l'interval PR i QT, així com la duració del QRS (Figura 38 A-D) estaven incrementats en el grup IM, sense efecte d'antimiR-21, confirmant l'acció selectiva auricular.

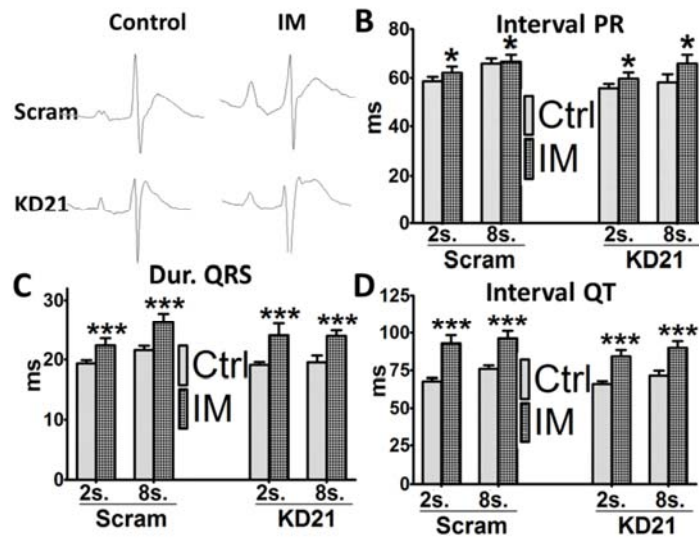


Figura 38: Altres intervals ECG en l'experiment de bloqueig de miR-21. (A) Mostres representatives d'ECG en animals a les 8 setmanes de la cirurgia, i medició (mitja±EEM) de l'interval PR (B), el QRS (C) i l'interval QT (D). El número d'animals a cada grup és el mateix que a la Figura 37. \*p<0,01; \*\*\*p<0,001 Control vs IM.

Per a aprofundir en el remodelat estructural, es va realitzar una ecocardiografia a totes les rates.

Els resultats es mostren a la Figura 39. L'administració d'antimiR-21 no va modificar la dilatació auricular esquerra ni cap altre paràmetre ecocardiogràfic en cap grup

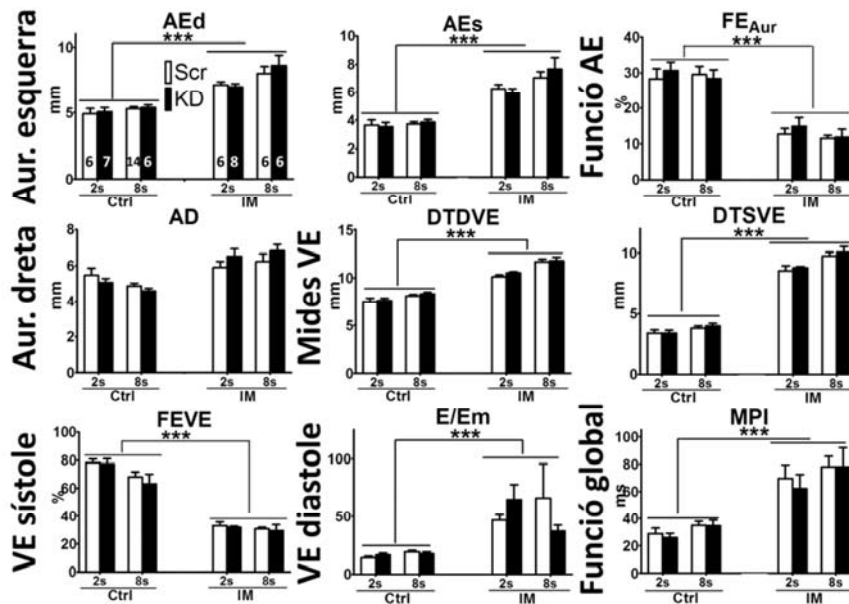


Figura 39: Mesures ecocardiogràfiques (mitjà±EEM) en tots els grups experimentals en l'experiment de bloqueig de miR-21. AEd: diàmetre de l'aurícula esquerra en diàstole; AEs: diàmetre de l'aurícula esquerra en sístole; FE<sub>Aur</sub>: fracció d'escurçament de l'aurícula esquerra; AD: aurícula dreta; DTDVE: diàmetre telediastòlic del ventricle esquerre; DTSVE: diàmetre telesistòlic del ventricle esquerre; FEVE: fracció d'ejecció del ventricle esquerre; MPI: *myocardial performance index*. El número d'animals usats es mostra en les barres de la primera gràfica. \*\*\*p<0,001 Control vs IM.

#### 4.6. Conclusions

- La inducció d'un infart de miocardi per lligadura de la coronària descendent anterior és un model vàlid per a l'estudi de la FA
- La via miR21/Sprouty1/erk1/2 participa en el desenvolupament de fibrosi auricular en aquest model de FA secundària a insuficiència cardíaca isquèmica.
- La actuació sobre miRNA és una nova estratègia terapèutica eficaç per a l'actuació sobre el substrat aritmogènic.

# 5

## **SUB-PROJECTE 3: ESTUDI D'EFICÀCIA I SEGURETAT DE LA TRIPLE COMBINACIÓ ANTITROMBÓTICA**

---

### **5.1. Justificació**

La prevenció de tromboembolismes és un dels pilars essencials del tractament de la FA. Més del 70% de pacients amb FA tenen un risc elevat de patir una complicació tromboembòlica i requereixen rebre tractament anticoagulant.<sup>117</sup> Tot i la recent aparició dels nous anticoagulants orals, com els inhibidors directes del factor II<sup>142</sup> o X,<sup>166</sup> els antagonistes de la vitamina K són encara el tractament anticoagulant més utilitzat en l'àmbit extrahospitalari.

La prevalença de cardiopatia isquèmica en els pacients amb FA se situa entre el 25 i el 40%,<sup>167,168</sup> classificant-los com una població d'elevat risc d'esdeveniments coronaris isquèmics i,

conseqüentment, de necessitat d'intervencionisme coronari stent. A més, en pacients amb FA i sense cardiopatia isquèmica prèvia coneguda, la prevalença de coronariopatia significativa és d'un 35%, que en el 65% dels casos és tributària d'intervencionisme percutani o cirurgia de revascularització.<sup>169</sup>

Després d'un síndrome coronari agut, les guies de pràctica clínica recomanen l'administració de doble tractament amb aspirina i un inhibidor de P2Y<sub>12</sub> (tienopiridines com ticlopidina, clopidogrel o prasugrel), combinació que resulta obligatòria després de rebre un stent intracoronari. Aquest tractament cal que es mantingui dotze mesos, tot i que pot reduir-se a un mes en determinades circumstàncies.<sup>170</sup>

En els pacients amb FA que pateixen un síndrome coronari agut, la decisió sobre el tractament antitrombòtic és controvertida. La combinació d'aspirina i clopidogrel és inferior al tractament amb warfarina per a la prevenció de les complicacions embòliques de la FA.<sup>171</sup> L'anticoagulació oral és menys eficaç que la combinació d'aspirina i clopidogrel en la prevenció de la trombosi del stent intracoronari i de complicacions coronàries isquèmiques.<sup>172,173</sup> Tots tres fàrmacs antitrombòtics caldria, doncs, que fossin administrats en pacients amb FA d'alt risc de complicacions tromboembòliques i antecedent d'un stent intracoronari recent. Tanmateix, el risc de sagnat s'incrementa de forma marcada en pacients que reben la triple combinació d'aspirina, clopidogrel i anticoagulació oral. L'associació d'antiagregants a l'anticoagulació oral incrementa el risc de sagnat,<sup>174</sup> tot i que la magnitud d'aquest risc es desconeixia en el moment d'iniciar el projecte.<sup>175</sup> En aquest context, s'havien publicat diversos casos de pacients amb FA i sagnats greus després d'un intervencionisme percutani.<sup>176</sup>

El tractament antiagregant òptim en un pacient anticoagulant, i en els pacients amb FA en particular, que reben un stent intracoronari no està encara ben definit.

## **5.2. Hipòtesi**

La necessitat de combinar els tractaments antitrombòtics aspirina, clopidogrel i anticoagulació oral en un mateix pacient és un problema freqüent, especialment en aquells que tenen antecedents de FA. La triple combinació antitrombòtica (aspirina, clopidogrel, anticoagulació oral) és la més efectiva en la prevenció tromboembòlica, però s'associa a un risc significatiu de sagnats.

## **5.3. Objectius**

Els objectius específics d'aquest subprojecte són:

- Comparar la seguretat i eficàcia del règim triple antitrombòtic en comparació a d'altres combinacions usades a la pràctica clínica.
- Descriure les característiques dels pacients que precisen triple tractament antitrombòtic i l'actitud seguida.

## **5.4. Mètodes**

Per a estudiar la magnitud del problema, riscos i beneficis del TT, es van identificar pacients que rebien TT i es van comparar la seva evolució a pacients que van rebre combinacions alternatives.



Per a obtenir una visió més global del problema, es varen seleccionar tots els pacients que rebien TT, independentment de si la indicació de la mateixa era FA o d'altres.

### Selecció de pacients

Els pacients es varen seleccionar en dues etapes i casuístiques diferents. En una primera etapa, exploratòria, es varen recollir retrospectivament els pacients que havien rebut tractament antitrombòtic triple i se'n va estudiar la seguretat. En una segona fase, es van seleccionar prospectivament els pacients sotmesos a coronariografia que tenien indicació de TT, independentment del tractament finalment rebut, i se'n va avaluar l'actitud terapèutica adoptada, l'eficàcia i la seguretat.

#### - Estudi exploratori retrospectiu

L'estudi es va plantejar com un estudi observacional, de cohorts històriques i exposició creuada.

Per a identificar un grup de pacients que haguessin rebut la combinació d'aspirina, clopidogrel i anticoagulació oral es van revisar tot els pacients inclosos en el registre de la Clínica d'Anticoagulació de l'Hospital Clínic de Barcelona entre gener de 2005 i juny de 2006. Mitjançant revisió de la història clínica, es van identificar tots aquells pacients que, mentre estaven sota tractament anticoagulant, van rebre un stent intracoronari, i es van seleccionar els que van rebre conjuntament anticoagulació oral, AAS i clopidogrel després del procediment.

El seguiment dels pacients es va dur a terme en dues etapes:

- Etapa de TT (aspirina, clopidogrel, anticoagulació): s'hi inclouen els esdeveniments que ocorren després de la coronariografia, i fins que el pacient abandona el clopidogrel.

- Etapa de DTp (doble teràpia posterior al TT): inclou els mateixos pacients un cop es retira el tractament amb clopidogrel i es prolonga mentre el pacient està rebent aspirina i anticoagulació oral.

Les etapes de seguiment s'esquematitzen a la Figura 40. Es varen recollir i comparar les complicacions hemorràgiques en aquests dos períodes. Donat que cada pacient és comparat amb sí mateix, s'aconsegueix la màxima homogeneïtat entre el seguiment dels grup TT i DTp, reduint-se les diferències basals entre els grups.

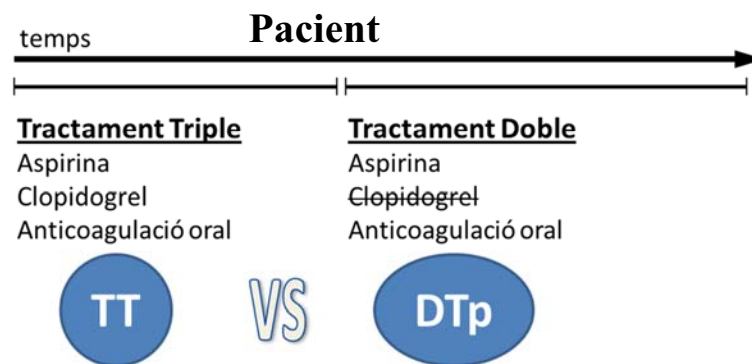


Figura 40: Esquematització del seguiment d'un pacient en dues etapes: una primera mentre el pacient rep triple tractament antitrombòtic, i una segona quan abandona clopidogrel.

- Estudi prospectiu

L'estudi prospectiu es va plantejar com un estudi prospectiu, observacional, de cohorts, amb intenció confirmatòria i d'estudi d'eficàcia.

Entre febrer de 2008 i maig de 2009, es varen revisar diàriament totes les coronariografies practicades a l'Hospital Clínic de Barcelona. Per tal de permetre una millor avaluació i seguiment, la revisió es va limitar als pacients que estaven ingressats en el moment de la coronariografia. S'identificaren tots aquells pacients que complien que:

1. Tenien indicació segons les guies clíniques internacionals vigents en aquell moment de rebre tractament anticoagulant crònic. Aquests incloïen, però no es limitaven, a pacients portadors de pròtesi valvular mecànica,<sup>177</sup> trombosi venosa profunda/tromboembolisme pulmonar recent (<6 mesos), accident vascular cerebral probablement embòlic i FA amb CHADS<sub>2</sub> >1.
2. Van rebre un stent intracoronari,.

En funció del tractament rebut es van distingir tres grups de seguiment:

- Els pacients que van rebre inicialment aspirina, clopidogrel i anticoagulació oral, van ser seguits durant l'etapa TT i l'etapa DTp, de forma anàloga a l'estudi retrospectiu.
- Els pacients que van rebre inicialment altres combinacions dobles (majoritàriament aspirina i clopidogrel) van ser seguits mentre seguits mentre la mantenien (etapa DT).

En la Figura 41 s'esquematitza el procés de selecció i els grups d'estudi.

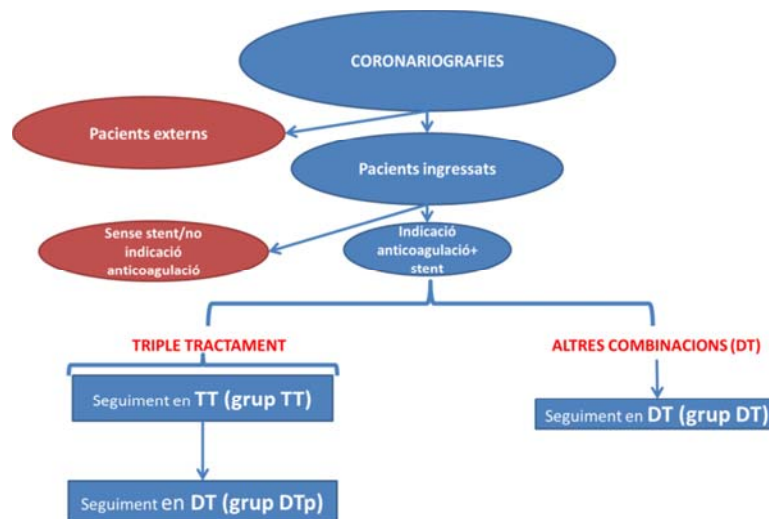


Figura 41: Esquema de l'estudi prospectiu i definició dels grups de seguiment.

## Seguiment

En tots els pacients es varen recollir les característiques demogràfiques i la indicació de l'anticoagulació. Es va definir a un individu com hipertens, dislipèmic o diabètic si rebien tractament per a la citada patologia o en van ser diagnosticats durant l'ingrés. Els pacients amb diagnòstic previ d'insuficiència renal o concentració plasmàtica de creatinina superior a 1,5 mg/dL en dues o més determinacions en condició estable i sense relació pròxima amb la coronariografia es van catalogar d'insuficiència renal. L'estat de fumador es va atribuir als pacients que reconeixien haver fumat una cigarreta en el darrer mes. Es recolliren a més les característiques de l'episodi índex així com el tractament antitrombòtic rebut a l'alta.

En tots els pacients el control i ajust dels nivells d'anticoagulació es van dur a terme a la Clínica d'Anticoagulació del Servei d'Hemostàsia de l'Hospital Clínic de Barcelona, i l'INR objectiu s'havia fixat entre 2 i 3. En cada visita a la Clínica d'anticoagulació, s'interroga de forma habitual al pacient sobre l'aparició de complicacions hemorràgiques, que s'introdueixen en una base de dades juntament amb el nivell d'anticoagulació. Només en un pacient que residia habitualment a Alemanya no es va poder concloure un seguiment adequat i va ser exclòs de la valoració de les complicacions, però inclòs en la resta d'anàlisis.

El seguiment dels pacients anticoagulants es va dur a terme mitjançant la revisió de la base de dades de la Clínica d'Anticoagulació i, en l'estudi prospectiu, entrevista telefònica cada 3 mesos en la que s'interrogà sobre les complicacions. En els pacients que no varen rebre tractament anticoagulant, el seguiment es va dur a terme mitjançant revisió de la història clínica general de l'hospital i entrevista telefònica cada 3 mesos.

Es van recollir les complicacions hemorràgiques en tots els pacients, així com les tromboembòliques en l'estudi prospectiu. Els sagnats es van classificar segons la gravetat, en dos grups:

- Hemorràgies no greus, com aquelles que precisen atenció a un Servei d'urgències i requereixen suspendre com a mínim una dosi de l'anticoagulació.
- Hemorràgies greus si havien requerit hospitalització convencional, havien precisat transfusió o eren potencialment letals.

Els sagnats lleus, definits com aquells que no requereixen atenció a un servei d'Urgències, no van ser considerades degudes a la seva universalitat en pacients que reben anticoagulació.

Per a valorar la correcta intensitat de l'anticoagulació oral i la comparabilitat entre els grups de pacients anticoagulants (TT i DTp), es va comparar el temps en INR objectiu mitjançant dos mètodes (Figura 42):

- Percentatge de controls en INR objectiu, així com controls per sobre i sota del rang objectiu, obtingut mitjançant:

$$\% \text{ controls en rang} = \frac{\text{controls en rang} / \text{per sobre} / \text{per sota}}{\text{n}^\circ \text{ total de controls}} \times 100.$$

- Mètode de Rosendaal, basat en la interpolació lineal de l'INR entre dos controls consecutius i el càlcul del número de dies en rang (Figura 42). El resultat s'ofereix com el percentatge de dies en rang.<sup>178</sup>

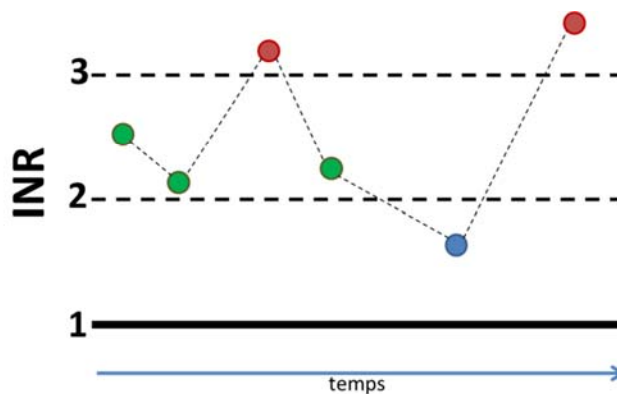


Figura 42: Mètodes per a estimar la qualitat de l'anticoagulació. Simulació dels resultat d'INR en un pacient en diversos controls consecutius. Cada punt representa un control, codificant en color segons el nivell d'anticoagulació (vermell sobrecoagulat, blau infracoagulat, verd control en rang). Les línies discontinues representen l'extrapolació utilitzada per a calcular el percentatge de dies en rang segons el mètode de Rosendaal.

### Anàlisi estadístic

Les variables quantitatives es mostren com a mitja±EEM, i les comparacions es calcularen mitjançant la prova de t de Student per a mostres independents. S'utilitzà l'ajust de Welch quan les variàncies es van demostrar significativament diferents segons la prova de Levene d'igualtat de variàncies.

Les variables categòriques es mostren com a percentatge, i les comparacions es van dur a terme amb l'estadístic de  $\chi^2$  o el test exacte de Fisher quan més del 20% de cel·les presentaven un resultat esperat inferior a 5.

La taxa d'hemorràgies es mostra com a número de complicacions per 100 pacient-anys i l'interval de confiança del 95%. Les comparacions entre taxes d'incidència es varen dur a terme mitjançant el càlcul de la raó de taxes d'incidències i tests exactes.

Les complicacions trombòtiques es mostren en una gràfica de supervivència de Kaplan-Meyer, i els dos grups (TT, DTp) es compararen mitjançant log-rank.

Els anàlisis estadístics es va calcular mitjançant SPSS v19.0 (IBM, Amtak, NY, Estats Units) i Medcalc v12.2 (Mariakerke, Bèlgica). Una  $p < 0,05$  es va considerar significativa en tots els casos.

## 5.5. Resultats

### 5.5.1. Estudi retrospectiu

En el registre de la Clínica d'Anticoagulació es van identificar un total de 33 pacients que havien rebut TT en algun moment. Les característiques basals es descriuen a la Taula 4. Es tracta d'una població majoritàriament d'homes, en la setena dècada de vida i una relativa baixa prevalença de comorbiditat. La indicació en gairebé la meitat dels pacients era la presència d'un trombus intraventricular i poc menys d'un terç tenien FA. Cap dels pacients inclosos tenia antecedents de sagnats greus.

	N (%)
Sexe masculí	28 (84%)
Edat (anys, mitja±EEM)	63±2
Fumador actiu	11 (33%)
Hipertensió arterial	15 (45%)
Dislipèmia	12 (36%)
Diabetis mellitus	7 (21%)
Insuficiència renal crònica	2 (6%)
Indicació per a l'anticoagulació	
Trombus intraventricular	19 (49%)
Fibril·lació auricular	11 (29%)
Accident vascular cerebral	4 (11%)
Trombosis repetitiva del stent	2 (5%)
Vàlvula mecànica	1 (3%)
Mutació procoagulant	1 (3%)

Taula 4: Característiques demogràfiques i indicació per a l'anticoagulació dels pacients inclosos en l'estudi retrospectiu. El total per a la indicació suma més de 100% per haver pacients amb més d'una indicació.

Es varen seguir els pacients durant un total de 53 pacient-mesos (4,42 pacient-anys) en el període de TT (rang 0,5 a 9 mesos, mitja de 1,6 mesos/pacient) i de 869 pacient-mesos (72,4 pacient-anys) durant el període de DT (rang 1-107 mesos, mitja de 26,3 mesos/pacient).

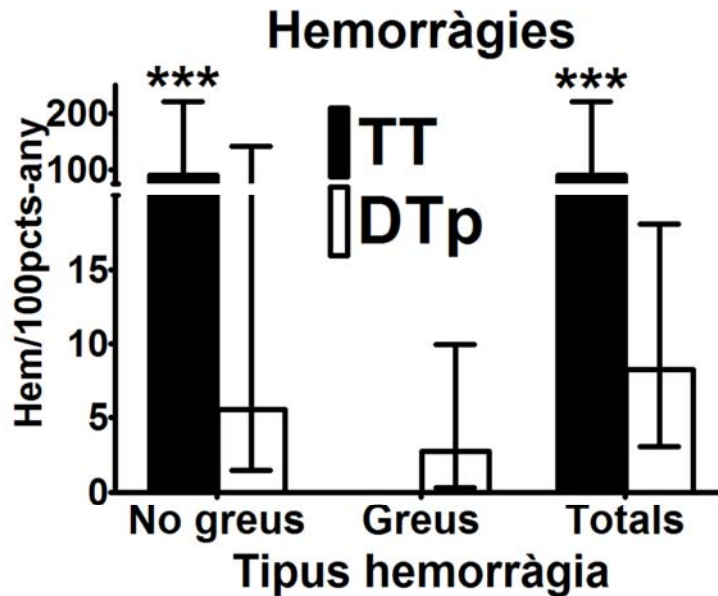


Figura 43: Mitja i interval de confiança (95%) de la taxa de complicacions hemorràgiques en el grup TT i DTp, repartit entre hemorràgies greus i no greus. \*\*\* $p < 0.001$  TT vs DTp.

La incidència de les complicacions hemorràgiques es representa a la Figura 43. Es varen identificar 2 sagnats greus en el grup DT, i cap en el grup TT, per a registrar taxes de 2,76 sagnats/100 pacients-any i 0 sagnats/100 pacients-any respectivament, no significativament diferents. En ambdós grups es van identificar 4 hemorràgies no greus, permetent calcular una taxa d'hemorràgies no greus de 5,52 hemorràgies/100 pacients-any en el grup DTp i 90,5 hemorràgies/100 pacient-anys en el grup TT. Globalment, el grup TT s'associà a un marcat increment en el risc de sagnat (RR 14, 95%IC: 10-22,  $p < 0,001$ ).



A la Taula 5 es descriuen les característiques dels episodis individuals de sagnat. Només en un episodi de sagnat en el cadascun dels grups TT i DT l'INR calculat el dia del sagnat era superior al límit del rang objectiu.

	Edat (anys)	INR en el sagnat	Tipus de sagnat
<i>Triple tractament (TT)</i>			
Hematoma femoral	75	5.47	HnG
Epistaxis	68	2.99	HnG
Hematoma muscular	74	2.99	HnG
Epistaxis	61	2.65	HnG
<i>Doble tractament (DTp)</i>			
Hematúria	70	1.97	HnG
Gingivorràgia	74	3.7	HnG
Metrorràgia	47	2.11	HnG
Hematoma subcutani	72	2.38	HnG
Sagnat gastrointestinal	64	2.44	HG. Requereix ingrès i transfusió
Hematoma subdural	59	1.95	HG. Requereix ingrès

Taula 5: Característiques dels sagnats en ambdós grups TT i DTp en l'estudi retrospectiu. HG: hemorràgia greu; HnG: hemorràgia no greu.

La qualitat en el nivell d'anticoagulació, valorat per qualsevol dels dos mètodes descrits es considerà excel·lent i sense diferències entre ambdós grups (Taula 6).

	Triple tractament (%)	Doble tractament (%)	P
INR en rang	78.4 ± 1,3	76.6 ± 1,8	0.86
INR per sobre de rang	11.7 ± 0,7	12.2 ± 1,1	0.91
INR per sota de rang	9.9 ± 1,4	11.2 ± 1,2	0.94
INR rang (Rosendaal)	64.7 ± 2,4	63.5 ± 1.6	0.96

Taula 6: Qualitat de l'anticoagulació en els grups de l'estudi retrospectiu valorat segons els dos mètodes descrits.

### 5.5.2. Estudi prospectiu

Per a confirmar els resultats i descriure l'epidemiologia d'aquesta problemàtica es va dur a terme un segon estudi prospectiu. Durant un any i tres mesos es van revisar 1355 pacients sotmesos a coronariografia a l'Hospital Clínic, de les que 662 corresponien a pacients ingressats. Vuitanta-tres pacients (12.5% dels ingressats) van rebre un stent intracoronari i tenien indicació per a rebre

anticoagulació oral. Les característiques basals dels 83 pacients es descriuen a la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** En comparació a l'estudi retrospectiu, la població inclosa és d'edat més avançada (8 anys més gran) i una major comorbiditat, com hipertensió arterial (71%), diabetis mellitus (35%) i insuficiència renal (11%). L'ecocardiografia realitzada durant l'ingrés demostra una lleugera disfunció ventricular. Malgrat tot, els pacients inclosos mantenien una funcionalitat conservada valorat mitjançant l'índex de Barthel.

La Taula 7 mostra les característiques relacionades amb l'episodi índex. La indicació d'anticoagulació venia determinada en més de la meitat de casos per una FA considerada d'elevat risc tromboembòlic, seguit de la presència d'un trombus intraventricular en un quart dels pacients. Els pacients amb una vàlvula mecànica representava només un 7% dels pacients.

A un 55% de pacients se'ls va indicar una coronariografia en el context d'un IAMSEST. Tot i que la majoria van rebre un stent convencional, una quarta part del total de pacients van rebre un stent farmacològic, requerint una duració prolongada del tractament antitrombòtic triple.

	% (n)
<b>Indicació d'anticoagulació</b>	
Vàlvula mecànica	7% (6)
Fibril·lació auricular	58% (49)
Trombus protruïent	25% (21)
TVP/TEP	4% (3)
AVC	5% (4)
<b>Indicació de coronariografia</b>	
IAMEST	37% (31)
IAMSEST	55% (46)
Angor d'esforç	7% (6)
<b>Tipus de stent</b>	
No	1% (1)
Convencional	74% (62)
Cypher	14% (12)
Taxus	11% (9)

Taula 7: Característiques de l'episodi que motiva la indicació de coronariografia en l'estudi prospectiu.

### Assignació del tractament antitrombòtic

Entre els 83 pacients que tenien indicació per a rebre el triple tractament antitrombòtic, 43 el van rebre i 40 van rebre altres combinacions (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Les diferències entre ambdós grups s'indiquen a la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** L'únic factor que es va relacionar de forma significativa amb el fet de rebre o no un triple tractament antitrombòtic va ser la indicació d'anticoagulació. Tots els pacients amb vàlvula mecànica van rebre TT, mentre que els pacients amb FA van rebre DT majoritàriament (en el 59% de casos). En el grup de pacients amb FA, la puntuació en l'escala CHADS2 era lleugerament superior, tot i que no significativament, en el grup que va rebre TT.

El seguiment dels pacients segons el tractament rebut s'esquematitza a la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** En el moment de l'estudi, ticlopidina i clopidogrel eren les úniques tienopiridines disponibles comercialment i indicades després de la implantació d'un stent. Tots els pacients en el grup TT van rebre acenocumarol, aspirina i clopidogrel. En el grup DT els pacients van rebre majoritàriament AAS+clopidogrel (39 pacients), i només un pacient va rebre AAS+anticoagulació oral. Per a incrementar l'homogeneïtat del grup DT, aquest darrer pacient va ser exclòs. Un segon pacient del grup DT també va ser exclòs per impossibilitat de seguiment (residència habitual a Alemanya). En resum, el grup TT va ésser seguit durant 129 pacient-mesos (rang 0,5 – 17 mesos, mitja de 3,1 mesos/pacient) i el grup DT durant 131 pacient-mesos (rang 1-12 mesos, mitja 3,8 pacient-mesos). En el grup DTp els pacients havien retirat clopidogrel i mantenien AAS+anticoagulació oral, excepte un pacient que va rebre únicament anticoagulació oral. Aquest darrer pacient va ser exclòs en l'anàlisi del grup DTp ja

que no rebia doble tractament. Els pacients del grup DTp van ser seguit durant 213 pacient-mesos (rang 0-17 mesos, mitja 5,1 mesos).

#### Estudi d'eficàcia: TT vs aspirina+clopidogrel

El seguiment del grup DT va demostrar que es tractava d'un grup d'alt risc trombòtic. Els pacients que van rebre únicament AAS+Clopidogrel presentaven una elevada taxa de tromboembolismes. L'adició d'anticoagulació oral (grup TT) va ser eficaç en la prevenció d'episodis trombòtics (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

A la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** es descriuen els episodis trombòtics individuals registrats durant el seguiment en ambdós grups TT i DT. De forma remarcable, la gran majoria d'esdeveniments trombòtics en el grup DT (7/9, 77%) van ocórrer en pacients amb FA com a patologia de base, i en quatre d'ells la complicació trombòtica tenia un origen probablement cardioembòlic.

#### Estudi de seguretat: TT vs aspirina+clopidogrel

Els resultats de l'estudi d'eficàcia remarquen la importància de mantenir l'anticoagulació en quan aquesta està indicada. Tanmateix, l'increment en la incidència d'hemorràgies pot representar-ne un obstacle.

La seguretat d'ambdues combinacions (TT, DT) es va estudiar mitjançant la taxa d'hemorràgies (Figura 44). La incidència d'hemorràgies es va incrementar de forma molt marcada en el grup

TT en comparació al DT (RR 9,9, IC95%: 1,4 – 429). Tanmateix, aquest increment es va deure principalment a un increment en el número d'hemorràgies no greus, sense diferències en la taxa d'hemorràgies greus.

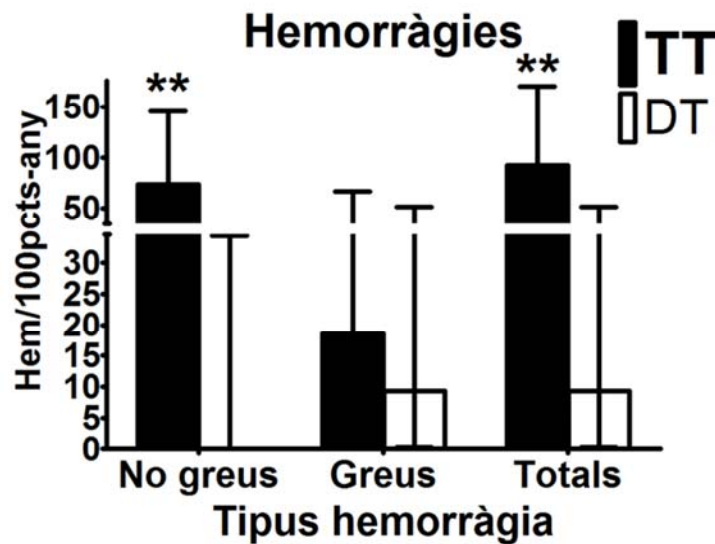


Figura 44: Comparació de la taxa d'hemorràgies en pacients que van rebre triple tractament antitrombòtic (aspirina, clopidogrel i anticoagulació oral) o doble tractament (aspirina, clopidogrel) després de l'intervencionisme percutani. \*\*p<0,01 TT vs DT.

#### Estudi de seguretat (aspirina, clopidogrel, anticoagulació vs aspirina, anticoagulació): resultats agregats

Per a obtenir una estimació més precisa de la incidència d'hemorràgies en el grup TT (aspirina, clopidogrel, anticoagulació oral) i DTp (aspirina, anticoagulació oral), es van combinar els resultats de l'estudi retrospectiu, del qual es va prolongar el seguiment, i els de l'estudi prospectiu. Això va permetre un seguiment global de 182,83 pacient-mesos en el grup TT i 1082 pacient-mesos en el grup DTp. Els resultats finals es mostren a la Figura 45. El TT incrementa el risc hemorràgic (RR 9,2 IC95%: 3,7-24,1) en comparació a aspirina i anticoagulació, amb càrrec a un increment en les hemorràgies no greus, però no modifica el risc d'hemorràgies greus.

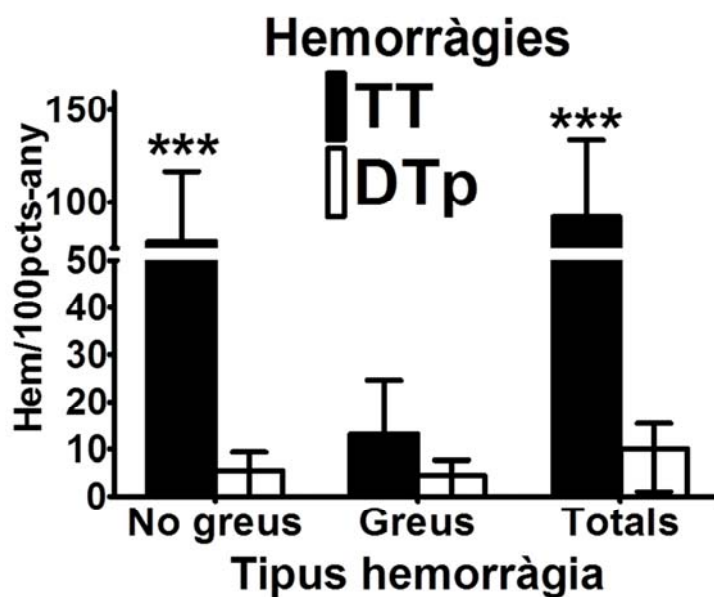


Figura 45: Agregat de la taxa d'hemorràgies incloent ambdós estudis en pacients que van rebre inicialment triple tractament antitrombòtic (TT, aspirina, clopidogrel, anticoagulació oral) i que posteriorment van suspendre clopidogrel (DTp, aspirina, anticoagulació oral). \*\*\* $p < 0,001$  TT vs DTp.

Aquestes diferències no eren degudes a la qualitat de l'anticoagulació entre ambdós grups

(**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

## 5.6. Conclusions

- La necessitat de triple tractament és un problema freqüent que afecta més del 10% de pacients sotmesos a implantació d'un stent.
- Només la meitat de pacients que segons les guies d'actuació clínica precisarien de triple tractament antitrombòtic el reben. La indicació és l'únic factor significativament associat a la decisió, i els pacients amb FA d'alt risc embòlic tenen una baixa probabilitat de rebre'l.

- En aquest grup, d'elevat risc trombòtic, rebre el triple tractament antitrombòtic sota un bon control de l'hemostàsia, prevé redueix el risc de complicacions tromboembòliques, incrementant la incidència d'hemorràgies no greus.

# 6

## DISCUSIÓ

### 6. DISCUSIÓ

En els subprojectes que engloba aquesta tesi s'han abordat la fisiopatologia i el tractament de la FA en dos models animals i un estudi clínic. Per una banda, en la vessant fisiopatològica s'ha demostrat que el to parasimpàtic té un paper predominant com a mediador de la FA en l'esportista, per sobre del remodelat estructural i elèctric, i en un model d'infart es demostra la importància de miR-21 en el procés de fibrogènesi auricular. Dels dos sub-projectes se n'extreu que aturar l'activitat física pot tractar la FA, i que la modulació de miR-21 és una nova diana terapèutica en el tractament de la FA. D'altra banda, descrivim que la necessitat de combinar doble tractament antiagregant i anticoagulació oral és un problema freqüent en els pacients en



FA, i en el que el risc d'hemorràgies no greus queda sobrepassat per la protecció trombòtica de la triple combinació.

### **6.1. Models animals en l'estudi de la FA**

Per a l'estudi de la fisiopatologia d'aquestes condicions, s'han descrit i usat dos models animals que repliquen situacions que trobem habitualment en la pràctica clínica: la del pacient amb FA que és practicant d'exercici físic de resistència, i la del pacient que desenvolupa una FA associada a la disfunció ventricular severa de causa isquèmica.

#### El model d'exercici reproduceix el cor d'atleta

La capacitat aritmogènica de l'exercici físic es va estudiar en un model d'exercici físic en cinta rodant, que replica les característiques que apareixen típicament en el cor d'atleta. La hipertròfia ventricular esquerra excèntrica, la dilatació auricular i la hipertonia vagal són característics dels atletes implicats en esports aeróbics,<sup>156</sup> i es s'observen també en aquest projecte i estudis previs del nostre grup en aquest model.<sup>160</sup> La fisiologia del desentrenament descrita aquí s'adapta també a les troballes en humans. En aturar l'exercici físic, l'aurícula esquerra es manté dilatada durant tot el període estudiat, de forma similar al que es descriu en atletes d'alt rendiment.<sup>179,180</sup> El to parasimpàtic reverteix ràpidament en aturar l'exercici físic, replicant les troballes en humans,<sup>181,182</sup> tot i que càrregues elevades d'exercici poden causar un remodelat permanent.<sup>51</sup>

L'estrès fisiològic o psicològic pot representar un factor confusor en la interpretació dels resultats en aquest model. Es van prendre totes les mesures possibles per a reduir les descàrregues i només es van analitzar les rates que eren capaç de córrer adequadament.

Tanmateix, l'administració d'uns pocs xocs elèctrics és inevitable i podria induir estrès en les rates. El procediment per a l'avaluació del distrès en animals de laboratori no s'ha estandarditzat. Els nivells plasmàtics de cortisona i noradrenalina s'han utilitzat repetidament com a marcadors, però l'exercici físic ocasiona un conjunt d'alteracions neurohormonals solapables amb les del distrès que n'impedeixen el seu ús per aquesta finalitat.<sup>183,184</sup> Les escales qualitatives, tot i la seva subjectivitat, permeten superar aquesta limitació. En el nostre model, la determinació del distrès mitjançant una escala qualitativa<sup>164</sup> no va identificar estrès significatiu. L'ús d'un observador extern, cec a l'assignació de grups, limità la possibilitat de biaix.

La comparació entre l'activitat física d'un home i una rata és complexa i probablement inexacta. Orientativament, la intensitat de l'entrenament aplicat a les rates s'aproxima a un exercici equivalent al 85% de la freqüència cardíaca màxima durant una hora diària; en un home d'uns 25 anys, entrenat, representa córrer uns 15 quilòmetres diaris en poc més d'una hora. Considerant la supervivència mitja de les rates Wistar usades, aquest exercici s'hauria de mantenir durant uns 10 anys. El nostre model replica, doncs, l'exercici físic d'elevada intensitat, mantingut durant llargs períodes de temps i no es poden aplicar analogies directes amb períodes curts d'entrenament o baixa intensitat, o amb duracions molt superiors.

#### El model d'infart de miocardi és útil per a l'estudi de la FA.

En el segon sub-projecte descrivim que un model d'infart de miocardi en rata pot ser usat per a l'estudi de la FA. El models d'insuficiència cardíaca mitjançant taquiestimulació auricular<sup>17,185</sup> o ventricular,<sup>61,99</sup> o insuficiència mitral<sup>185,186</sup> en gossos o altres animals grans són comuns en l'estudi de la FA. Tanmateix, el seu preu elevat i la dificultat en el maneig en limiten el seu ús. Els animals petits, tot i una menor similitud a la fisiologia humana, són també vàlids per l'estudi

de moltes patologies, com la FA.<sup>187</sup> Milliez et al. van estudiar un grup de rates després d'induir un infart de miocardi i van descriure que no presentaven episodis de FA espontània en registres de telemetria de 24 hores a les 4 setmanes de la cirurgia. En l'ECG els autors descriuen un increment en la duració de l'onda P i de l'interval PR,<sup>188</sup> suggerint trastorns de la conducció, que es relacionen amb una major incidència de FA.<sup>66</sup> La fibrosi auricular estava incrementada, però no s'oferien resultats d'un EEF.<sup>66</sup> Nosaltres demostrem per primer cop que és possible utilitzar aquest model per a estudiar la inducibilitat de FA.

En el nostre treball, la fibrosi miocàrdica s'estableix de forma precoç en la història del remodelat auricular, mentre que la dilatació auricular progressa lentament. Probablement un seguiment més llarg en el nostre treball que en el de Milliez et al. (8 setmanes vs 4 setmanes) expliqui una major dilatació auricular (92% vs 62% en l'increment del diàmetre telesistòlic de l'aurícula esquerra) tot i una reducció similar en la fracció d'ejecció i dilatació ventricular post-infart en els dos estudis. La mida auricular és, per contra, similar a estudis amb una evolució més llarga després de l'infart.<sup>189</sup>

La capacitat del substrat per a sostenir FA en aquest model requereix un profund remodelat estructural. Tot i un marcat increment en la fibrosi miocàrdica a les 2 setmanes, els episodis de FA són majoritàriament curts i no significativament diferents als del grup control. No és fins que s'afegeix una dilatació auricular marcada que el substrat és capaç de sostenir episodis de FA prolongats. Recolzant aquesta idea, la reversió de la fibrosi per l'administració d'antimiR-21 redueix la duració dels episodis de FA sostinguda, tot i persistir la dilatació auricular. Tanmateix, altres factors com el remodelat iònic o autonòmic podrien contribuir i han sigut estudiats només somerament en el nostre projecte.

### Limitacions dels models animals:

Els resultats obtinguts en models animals no poden ser extrapolats de forma directa als humans. La diferència de mida evident entre l'aurícula de l'humà i la rata, per exemple, és crític per a sostenir una patologia com la FA.<sup>79</sup> Tot i que demostrem un remodelat iònic balancejat en el model d'exercici, les corrents iòniques implicades en la repolarització auricular de rata difereixen en relació a les humanes.<sup>190</sup>

Les diferències entre la patologia humana i la patologia induïda a la rata sovint s'infravalora en l'anàlisi dels resultats. L'infart de miocardi, per exemple, sovint ocorre en pacients amb coronariopatia prèvia i altra comorbiditat, mentre que en el model utilitzat el llit vascular és probablement sa i les rates no presenten factors de risc per al desenvolupament de coronariopatia. El temps d'evolució és un factor que pot ser important. Mentre que en la majoria de models animals el període experimental es limita a unes poques setmanes, l'evolució en els pacients sol perllongar-se, sovint de forma oculta, durant anys o fins i tot dècades. Tanmateix, el llarg període d'entrenament aplicat en el model d'exercici (gairebé 4 mesos, equivalents a 10 anys de vida humana) pot assimilar-se més al patró evolutiu en humans. L'ús d'animals petits com la rata presenta, a més, limitacions pel que fa a la resolució de l'estudi per la petita mida del cor i la impossibilitat d'estudiar diferències regionals. Però tot i no poder fer una analogia directa amb l'humà, l'ús dels models animals permet una aproximació experimental inicial a problemes clínics habituals, generar hipòtesis i disseccionar problemes d'una manera que no es podrien realitzar en humans. La informació proporcionada pels models animals en el camp de la FA ha sigut incalculable.<sup>187</sup>

## 6.2. Fisiopatologia de la FA

### 6.2.1. Fisiopatologia de la FA de l'esportista

Dades prèvies del nostre grup demostraven en que un grup de rates entrenades durant 16 setmanes desenvolupaven una major inducibilitat de FA durant un EEF, fibrosi miocàrdica auricular, i se suggeria la participació del to parasimpàtic.

En el primer subprojecte confirmen un increment en el to parasimpàtic en les rates entrenades, que pot tenir un paper essencial en la promoció de FA. El paper del to parasimpàtic en la promoció de la FA és ben reconegut.<sup>94,97</sup> La reversibilitat de la FA a les 4 setmanes d'aturar l'exercici físic en el nostre model segueix una evolució paral·lela a l'índex parasimpàtic i la reversió de la bradicàrdia sinusal. Els resultats en humans suggereixen un patró similar. El to parasimpàtic reverteix a les poques setmanes d'aturar l'exercici,<sup>181,182</sup> i la pràctica activa d'exercici és un factor de risc per al desenvolupament de FA en els atletes,<sup>49</sup> confirmant la relació entre els dos factors. Tanmateix, el to parasimpàtic s'incrementa a les poques setmanes d'iniciar l'exercici en l'humà,<sup>191</sup> mentre que la FA es diagnostica característicament en la 5a o 6a dècada de la vida.<sup>45,48-51</sup> Esportistes joves d'elit, amb un to parasimpàtic presumiblement elevat, no tenen una prevalença de FA superior al 1%.<sup>108</sup> Conjuntament, aquests fets suggereixen que, si bé el to parasimpàtic és crític per a la promoció de FA, es requereixen factors addicionals que contribueixin al desenvolupament del substrat.

La dilatació<sup>48,79</sup> i la fibrosi<sup>53</sup> auricular presents en les rates sotmeses a entrenament (

Figura 11 i Figura 18) són coneguts promotors de la FA. L'estudi de reversibilitat els confereix un paper secundari en la FA de l'atleta. A les 4 setmanes de finalitzar l'exercici, la inducibilitat de les rates s'havia reduït a valors similars a les rates sedentàries, però persistia dilatació biauricular i fibrosi miocàrdica. Aquest fet demostra que la dilatació auricular i la fibrosi, actuant conjuntament, no són suficients per al desenvolupament d'un substrat adequat capaç de mantenir la FA. Estudis clínics i experimentals corroboren els nostres resultats. La dilatació auricular no és un factor suficient per a incrementar la incidència de FA en atletes joves.<sup>108</sup> La magnitud de la fibrosi en el model d'exercici és inferior a la detectada en altres models animals. En models de FA per insuficiència cardíaca en gossos,<sup>17</sup> ratolins transgènics per a TGFβ<sup>62</sup> o en el nostre model de FA en rates amb infart de miocardi presentat en el subprojecte 2 (Figura 29), el dipòsit de col·lagen s'incrementa entre 5 i 15 vegades, en contrast a l'increment de 1,6 vegades en les rates entrenades. Totes aquestes dades demostren que la dilatació i la fibrosi auricular contribueixen al substrat, però no en són determinats crítics, si no que requereixen de la potenciació del to parasimpàtic.

Tanmateix, amb els resultats obtinguts no és possible afirmar si una major duració o intensitat de l'exercici podria conduir a un remodelat qualitativa o quantitativament diferent, amb major dilatació o fibrosi auricular, adquirint més importància en el desenvolupament de la FA de l'atleta.

El remodelat elèctric és un factor important en la promoció d'arítmies en determinades condicions patològiques, propiciant l'allargament o escurçament del PAcc i facilitant la reentrada o la formació de post-despolaritzacions.<sup>18</sup> En l'exercici físic demostrem que es produeix un remodelat elèctric auricular balancejat que finalment resulta neutre pel que fa a la duració del

període refractari. Un remodelat equilibrat en les corrents de potassi i de calci s'ha descrit també en el ventricle esquerre de ratolins sotmesos a exercici.<sup>192</sup> Els mecanismes que possibiliten un remodelat elèctric sigui equilibrat són desconeguts. S'ha suggerit que la via metabòlica del IGF/PI3K/akt, implicada en la hipertròfia cardíaca fisiològica de l'exercici,<sup>193</sup> podria també estar implicat en el remodelat iònic.<sup>192</sup> Els nostres resultats, però, no descarten que l'exercici físic indueixi trastorns del metabolisme intracel·lular del calci. En resum, si bé es produeix un remodelat elèctric auricular en l'exercici de resistència, aquest no sembla contribuir de forma significativa en la gènesi de la FA.

#### 6.2.2. Paper de miR-21 en el remodelat estructural auricular

En el segon subprojecte demostrem que miR-21 participa en el desenvolupament de fibrosi miocàrdica auricular en un model en rata d'infart de miocardi. En el cor, miR-21 es localitza sobretot als fibroblastes,<sup>152</sup> tot i que també s'ha suggerit que participa en la protecció dels miòcits de l'estrès oxidatiu.<sup>194</sup> En teixit auricular esquerre trobem una activació congruent de tota la cascada, incloent una sobreexpressió de miR-21, reducció de Sprouty1 i activació de les MAPK erk1/2.

Remarcablement, la màxima activitat fibrogènica es produeix en les dues primeres setmanes i coincideix amb l'activació d'erk1/2, de manera similar a altres models d'insuficiència cardíaca.<sup>17</sup> Posteriorment, el dipòsit de fibrosi s'estabilitza, i la via miR-21/Sprouty/erk1/2 retorna a valors sedentaris, coincidint probablement amb una reducció de la proliferació dels fibroblastes. Les MAPK erk1/2 s'activen per factors de creixement a través d'una cascada de protein-quinases, actuant finalment sobre diversos factors de transcripció i promovent la proliferació cel·lular. Erk1/2 en la seva forma activa fosforilada participa en l'entrada en la fase S del cicle cel·lular,<sup>195</sup>

i és necessària per a la proliferació dels fibroblastes.<sup>165</sup> L'angiotensina II activa erk1/2 i TGFβ, i incrementa l'expressió de col·lagen, procés que és bloquejat amb inhibidors de erk1/2.<sup>196</sup> En models *in vivo* d'insuficiència cardíaca, la fibrosi auricular es relaciona amb un increment de diverses MAPKs com erk1/2, JNK i p38, però la prevenció de la fibrosi mitjançant enalapril ocasionava únicament un bloqueig de erk1/2, mentre que JNK i p38 romanien inalterats pel tractament.<sup>197</sup>

El model animal que s'ha usat replica els canvis que ocorren durant la insuficiència cardíaca d'origen isquèmic, i per tant, la fibrosi miocàrdica d'altres orígens pot tenir mecanismes diferents i no associar-se a increments de miR-21. Amb tot, altres estudis han demostrat que miR-21 participa en el remodelat ventricular secundari a la sobrecàrrega de pressió, en un model transgènic de receptor adrenèrgic β1, administració d'isoproterenol o d'infart de miocardi.<sup>152</sup> miR-21 s'ha involucrat també en processos fibròtics en altres òrgans com el ronyó o el pulmó.<sup>198,199</sup> Tots aquests resultats semblen conferir a miR-21 un paper essencial en la regulació de la fibrosi intersticial de múltiples orígens i situacions.

### **6.3. Tractament i prevenció de la FA**

#### Identificació i Prevenció dels pacients en risc

La prevenció i detecció precoç representen la millor alternativa per a l'abordatge de qualsevol patologia. Les nostres troballes en el model d'exercici físic aporten dades valuoses que poden permetre, si es confirmen en humans, reconèixer de forma precoç els factors que predisposen a la FA, i identificar els atletes en risc. Seran necessaris estudiar la relació entre el to parasimpàtic i



la incidència de FA, així com conèixer exactament la contribució de la dilatació auricular i la fibrosi. Les eines per a l'estudi d'aquests factors en humans ja estan, en gran mesura, disponibles. La dilatació auricular és fàcilment valorable mitjançant proves d'imatge com l'ecocardiografia o la ressonància magnètica. El to parasimpàtic pot estimar-se de forma indirecta mitjançant la determinació de la freqüència cardíaca en repòs o la seva variabilitat.<sup>200</sup> La fibrosi miocàrdica auricular és probablement el factor de més difícil valoració, si bé estudis recents amb ressonància magnètica obren noves portes.<sup>201</sup> La determinació de marcadors plasmàtics de la síntesi o degradació del col·lagen pot també ser útil.<sup>202,203</sup>

Per a que la detecció precoç aportí un benefici clínic és necessari disposar d'una estratègia terapèutica útil. En aquest projecte demostrarem que aturar l'exercici pot revertir el substrat aritmogènic, i podria ser una estratègia terapèutica útil per a la prevenció. Tanmateix un cop la FA s'ha establert, adquireix mecanismes que l'autoperpetuen,<sup>204</sup> incloent un remodelat que escurça el PAcc, incrementa la fibrosi miocàrdica i dilata l'aurícula, afavorint l'estabilització de les reentrades.<sup>52</sup> En el nostre grup de rates no es van identificar episodis espontanis de FA en la telemetria i els nostres resultats no poden extrapolar-se directament a una població d'atletes en la que la FA ha evolucionat fins a un estadi més tardà. Malgrat tot, un estudi del grup de Heidbuchel demostra que els pacients implicats en esports de resistència que abandonen l'entrenament tenen una incidència reduïda de FA.<sup>205</sup>

#### Tractament del substrat: *Upstream biological therapies*

La modificació del substrat on s'assenta la FA és un dels objectius desitjables en el tractament, i probablement més segur i eficaç que el bloqueig de corrents iòniques dels fàrmacs antiarítmics clàssic. Tot i que els fàrmacs disponibles actualment que actuen sobre el substrat, com els

bloquejants del SRAA, poden tenir el seu lloc en l'esquema terapèutic,<sup>67,117</sup> les anomenades teràpies biològiques, suposen un nou repte que pot permetre un abordatge més selectiu.<sup>125</sup> En aquesta tesi es demostra, per primera vegada en la literatura, que el bloqueig *in vivo* de miRNAs és capaç de prevenir l'aparició de FA i es postula com una nova estratègia terapèutica per a les arítmies. Els nostres resultats s'afegeixen a d'altres que demostren que la modulació dels miRNAs pot ser eficaç en diverses cardiopaties. La inhibició de miR-21 mitjançant antagomir-2 és capaç de prevenir la disfunció ventricular de diverses etiologies,<sup>152</sup> tot i la publicació d'estudis discordants.<sup>206</sup> El bloqueig de miR-15 o miR-320 són capaços de reduir la mida de l'àrea de miocardi infartat en models d'isquèmia-reperfusió.<sup>151,155</sup>

En els treballs publicats, els inhibidors de miRNA s'han administrat majoritàriament per via endovenosa,<sup>151,152,155,206,207</sup> aconseguint una distribució sistèmica i detectant-se en l'interior de diversos tipus cel·lulars.<sup>207</sup> Tot i la seva facilitat d'administració i els resultats prometedors, aquesta estratègia no està absenta de potencials riscos. Els miRNAs poden interaccionar amb gran quantitat de mRNA diana i el seu efecte sistèmic és imprevisible. Per exemple, la inhibició de miR-21 pot accelerar la progressió dels aneurismes abdominals.<sup>208</sup> L'administració intramiocàrdica aplicada en el nostre estudi, tot i ser tècnicament més complexa, permet un abordatge selectiu de l'aurícula. La seva aplicació durant una cirurgia cardíaca permetria assolir una major concentració local i evitar efectes secundaris sistèmics.

En general, els inhibidors de microRNA mostren en models animals un perfil farmacodinàmic molt atractiu. En el nostre treball una sola dosi d'antimiR va aconseguir bloquejar l'efecte de miR-21 durant com a mínim 2 setmanes, i els efectes de prevenció de fibrosi eren encara evidents a les 8 setmanes de la seva administració. Altres estudis confirmen aquest perfil.

Després de l'administració endovenosa d'antagomir-21 en ratolins, el bloqueig en l'activitat de miR-21 persisteix com a mínim tres setmanes.<sup>152,206</sup> Estudis amb una sola dosi d'antagomir-15 suggereixen una vida mitja superior a les 2 setmanes.<sup>151</sup> Resultats similars s'han trobat amb antimiR dirigits cap a altres miRNA.<sup>155,207</sup>

En el nostre model prevenim l'aparició de fibrosi mitjançant el bloqueig de miR-21, però els resultats no es poden extrapolar a la reversió de la fibrosi ja establerta. Trobem que miR-21 s'incrementa especialment en fases precoces del remodelat, coincidint amb la fase de més proliferació de (mio)fibroblasts i fibrogènesi. En fase més tardanes, els nivells de miR-21 en el grup IM s'equiparen als controls i si l'administració de miR-21 en aquest punt és capaç de revertir la fibrosi és difícilment previsible. A nivell ventricular, l'administració d'antagomir-21 tres setmanes després de l'infart va ser capaç de revertir la fibrosi ventricular.

El nostre estudi demostra que antimiR-21 pot ser útil per a la prevenció de la fibrosi auricular com a substrat de la FA. El substrat de la FA pot diferir substancialment en funció de la patologia causant,<sup>17,185</sup> i en algunes etiologies, la fibrosi té una importància menor.<sup>186</sup> Per exemple, en el nostre model d'exercici, la prevenció o reversió de la fibrosi, com a actuació aïllada, probablement tindria un efecte residual i no previndria la inducció de FA.

#### Tractament anticoagulant: el TT és necessari després de la implantació d'un stent

En el tercer subprojecte hem estudiat el perfil d'eficàcia i seguretat de la triple combinació antitrombòtica d'aspirina, clopidogrel i anticoagulació oral en dos grups de pacients, i l'hem comparat a dos règims alternatius (aspirina i anticoagulació oral per una banda, i aspirina i

clopidogrel d'altra banda). Ambdues poblacions de pacients, separades cronològicament uns 3 anys difereixen lleugerament en la indicació de l'anticoagulació i la comorbiditat. Aquestes diferències es deuen al mètode de selecció dels pacients i, possiblement, a l'evolució de la pràctica clínica en el temps entre els estudis. Tanmateix, els resultats en la taxa d'hemorràgies són comparables entre ambdós grups (~90 hemorràgies/100 pacient-anys), i indiquen que cada pacient que rep TT tindrà una hemorràgia (greu o moderada) cada any mentre rebí aquesta combinació. Això remarca la necessitat de limitar el temps de tractament el màxim possible.

En l'estudi prospectiu, el 52% de pacients que en tenien indicació van rebre TT. El percentatge de pacients als que se'ls va prescriure TT en la nostra sèrie és similar a d'altres publicades, entre el 50 i el 60% de pacients amb indicació.<sup>209-211</sup> Entre els pacients amb FA, només el 42% van rebre anticoagulació afegida a aspirina i clopidogrel (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), sensiblement inferior al percentatge global de pacients amb FA d'alt risc que reben l'anticoagulació. Aquest percentatge se situava entorn al 50-70% en estudis duts a terme durant la mateixa època.<sup>212,213</sup> Aquests resultats demostren una infravaloració del risc trombòtic de la FA en la pràctica clínica habitual.

La comparació entre els grups TT (aspirina, clopidogrel, anticoagulació) i DT (aspirina, clopidogrel) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) demostra que la no anticoagulació quan aquesta està indicada incrementa el risc tromboembòlic, especialment en pacients amb FA. Amb posterioritat al nostre treball, diverses publicacions han confirmat resultats similars. Dos meta-anàlisis recents demostren que la triple combinació antitrombòtica és superior a la combinació d'aspirina i clopidogrel en la prevenció de complicacions trombòtiques<sup>214,215</sup> i redueix la mortalitat.<sup>209,215</sup> Aquestes dades són congruents amb la eficàcia

reduïda de la combinació d'aspirina i clopidogrel per a la prevenció de tromboembolismes en pacients amb FA.<sup>171</sup>

En el perfil de seguretat demostrem que el TT incrementa el risc d'hemorràgies no greus, però no el d'hemorràgies greus, en comparació a dos règims diferents: a la combinació d'aspirina i anticoagulació oral (Figura 43) i a la combinació d'aspirina i clopidogrel (Figura 44). En contrast amb els nostres resultats, en els dos meta-anàlisis citats es demostrava un increment en la incidència d'hemorràgies majors, que es relacionava amb la presència de valors elevats d'INR.<sup>214,215</sup> Els nostres resultats no mostren aquesta relació. És possible que la diferència en la mida mostral i diferències subtils en la definició de sagnat greu puguin influir-hi. Amb tot, per desgràcia cap dels estudis publicats aporta dades sobre la qualitat crònica de l'anticoagulació en els pacients inclosos a l'estudi. Estudis realitzats en centres d'alt volum demostren que el temps en INR en pacients en la vida real es troba entorn al 40-50%,<sup>216</sup> remarcablement per sota del percentatge assolit al nostre centre (superior al 60%). Globalment, aquestes dades reforcen la necessitat d'un excel·lent control de l'anticoagulació en aquests pacients d'alt risc, preferiblement en centres amb experiència.

Actualment, les guies d'actuació clínica<sup>117</sup> i diversos consens d'experts<sup>217</sup> remarquen la necessitat de la triple teràpia antitrombòtica quan està indicada l'anticoagulació i la combinació d'aspirina i clopidogrel per separat. En els pacients amb FA i risc intermig o alt de tromboembolisme, es recomana la prescripció d'aspirina, clopidogrel i anticoagulació oral, intentant ajustar l'INR entre 2 i 2,5, durant períodes variables entre 2 setmanes i 12 mesos en funció del risc de sagnat i el tipus de stent implantat.<sup>218</sup>

El creixement futur en l'ús de dabigatran, apixaban, rivaroxaban o idrabiotaparinux en diferents situacions suposarà previsiblement un canvi en l'ús dels anticoagulants i els antitrombòtics en general. Estudis en alguns d'aquests suggereixen que poden reduir la incidència d'esdeveniments coronaris,<sup>219</sup> però no és un fet comú en tots els fàrmacs i estudis. Si bé dabigatran millora significativament el perfil de seguretat o eficàcia respecte a l'anticoagulació oral, la incidència d'esdeveniments isquèmics coronaris ha estat motiu de controvèrsia. Els estudis inicials amb dabigatran suggerien un increment en la incidència de síndrome coronaris aguts,<sup>142</sup> i tot i la identificació tardana de nous casos d'infart en el grup placebo<sup>220</sup> i un reanàlisi centrat específicament en els casos d'isquèmia coronària,<sup>221</sup> un recent meta-anàlisi demostra que el risc relatiu d'esdeveniment coronari agut s'incrementa en un terç en pacients que reben dabigatran.<sup>222</sup> Amb aquests resultats, no sembla que dabigatran pugui permetre abandonar l'aspirina en el TT. Paral·lelament, s'ha demostrat que quan es combinen dabigatran, aspirina i clopidogrel en el context d'un síndrome coronari agut, el risc d'hemorràgies significatives s'incrementa fins a quatre vegades en les dosis més altes,<sup>223</sup> de forma similar als nostres resultats. Els inhibidors del factor IIa afegits a aspirina i clopidogrel incrementen de tres a quatre vegades el risc de sagnat, incloent el sagnat intracranial.<sup>219,224</sup> Aquests dubtes amb els nous anticoagulants, lluny d'allunyar la necessitat del triple tractament antitrombòtic, reforcen la necessitat de seguir estudiant-ne la relació eficàcia-seguretat.



# 7

## CONCLUSIONS GLOBALES

Amb els resultats obtinguts en aquesta tesi, podem concloure que:

1. L'exercici físic indueix l'aparició d'un substrat aritmogénic en el que el to parasimpàtic té un paper principal. El cessament de l'exercici físic reverteix aquest substrat i redueix la inducibilitat de FA.
2. miR-21 està implicat en el desenvolupament de la fibrosi auricular, i el seu bloqueig a nivell local prevé la inducibilitat de FA en un model d'insuficiència cardíaca isquèmica.
3. La triple combinació d'aspirina, clopidogrel i anticoagulació oral incrementa el risc de sagnat enfront a qualsevol altra combinació, però és necessària per a evitar complicacions tromboembòliques.





# 8

## BIBLIOGRAFIA

---

### 8. R

- (1) Nattel S, Allessie M, Haissaguerre M. Spotlight on atrial fibrillation-the 'complete arrhythmia'. *Cardiovasc Res* 2002;54:197-203.
- (2) Lewis T. REPORT CXIX. AURICULAR FIBRILLATION: A COMMON CLINICAL CONDITION. *Br Med J* 1909;2:1528.
- (3) Lewis T. A Lecture ON THE EVIDENCES OF AURICULAR FIBRILLATION, TREATED HISTORICALLY: Delivered at University College Hospital. *Br Med J* 1912;1:57-60.
- (4) Lewis T. ELECTRO-CARDIOGRAPHY AND ITS IMPORTANCE IN THE CLINICAL EXAMINATION OF HEART AFFECTIONS. *Br Med J* 1912;2:65-7.
- (5) Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ, Cha SS, Bailey KR, Abhayaratna WP, Seward JB, Tsang TS. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation* 2006;114:119-25.
- (6) Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. Population prevalence, incidence, and predictors of atrial fibrillation in the Renfrew/Paisley study. *Heart* 2001;86:516-21.

- (7) Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, Larson MG, Levy D, Vasan RS, D'Agostino RB, Massaro JM, Beiser A, Wolf PA, Benjamin EJ. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004;110:1042-6.
- (8) Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, Kors JA, van HG, Stricker BH, Stijnen T, Lip GY, Witteman JC. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J* 2006;27:949-53.
- (9) Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 1991;22:983-8.
- (10) Kimura K, Minematsu K, Yamaguchi T. Atrial fibrillation as a predictive factor for severe stroke and early death in 15,831 patients with acute ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:679-83.
- (11) Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *Am J Med* 2002;113:359-64.
- (12) Wolowacz SE, Samuel M, Brennan VK, Jasso-Mosqueda JG, Van Gelder IC. The cost of illness of atrial fibrillation: a systematic review of the recent literature. *Europace* 2011;13:1375-85.
- (13) Stewart S, Murphy NF, Walker A, McGuire A, McMurray JJ. Cost of an emerging epidemic: an economic analysis of atrial fibrillation in the UK. *Heart* 2004;90:286-92.
- (14) Kozłowski D, Budrejko S, Lip GY, Rysz J, Mikhailidis DP, Raczak G, Banach M. Lone atrial fibrillation: what do we know? *Heart* 2010;96:498-503.
- (15) Koura T, Hara M, Takeuchi S, Ota K, Okada Y, Miyoshi S, Watanabe A, Shiraiwa K, Mitamura H, Kodama I, Ogawa S. Anisotropic conduction properties in canine atria analyzed by high-resolution optical mapping: preferential direction of conduction block changes from longitudinal to transverse with increasing age. *Circulation* 2002;105:2092-8.
- (16) Camm AJ, Al-Khatib SM, Calkins H et al. A proposal for new clinical concepts in the management of atrial fibrillation. *Am Heart J. In press*
- (17) Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 1999;100:87-95.
- (18) Nattel S, Maguy A, Le BS, Yeh YH. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 2007;87:425-56.
- (19) Miyauchi Y, Zhou S, Okuyama Y, Miyauchi M, Hayashi H, Hamabe A, Fishbein MC, Mandel WJ, Chen LS, Chen PS, Karagueuzian HS. Altered atrial electrical restitution and heterogeneous sympathetic hyperinnervation in hearts with chronic left ventricular myocardial infarction: implications for atrial fibrillation. *Circulation* 2003;108:360-6.

- (20) Hayashi H, Wang C, Miyauchi Y, Omichi C, Pak HN, Zhou S, Ohara T, Mandel WJ, Lin SF, Fishbein MC, Chen PS, Karagueuzian HS. Aging-related increase to inducible atrial fibrillation in the rat model. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13:801-8.
- (21) Sinno H, Derakhchan K, Libersan D, Merhi Y, Leung TK, Nattel S. Atrial ischemia promotes atrial fibrillation in dogs. *Circulation* 2003;107:1930-6.
- (22) Nishida K, Qi XY, Wakili R, Comtois P, Chartier D, Harada M, Iwasaki YK, Romeo P, Maguy A, Dobrev D, Michael G, Talajic M, Nattel S. Mechanisms of atrial tachyarrhythmias associated with coronary artery occlusion in a chronic canine model. *Circulation* 2011;123:137-46.
- (23) John B, Stiles MK, Kuklik P, Chandy ST, Young GD, Mackenzie L, Szumowski L, Joseph G, Jose J, Worthley SG, Kalman JM, Sanders P. Electrical remodelling of the left and right atria due to rheumatic mitral stenosis. *Eur Heart J* 2008;29:2234-43.
- (24) Verheule S, Wilson E, Everett T, Shanbhag S, Golden C, Olgin J. Alterations in atrial electrophysiology and tissue structure in a canine model of chronic atrial dilatation due to mitral regurgitation. *Circulation* 2003;107:2615-22.
- (25) Lubitz SA, Ozcan C, Magnani JW, Kaab S, Benjamin EJ, Ellinor PT. Genetics of atrial fibrillation: implications for future research directions and personalized medicine. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;3:291-9.
- (26) Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadottir A, Gretarsdottir S, Holm H, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Baker A, Thorleifsson G, Kristjansson K, Palsson A, Blondal T, Sulem P, Backman VM, Hardarson GA, Palsdottir E, Helgason A, Sigurjonsdottir R, Sverrisson JT, Kostulas K, Ng MC, Baum L, So WY, Wong KS, Chan JC, Furie KL, Greenberg SM, Sale M, Kelly P, MacRae CA, Smith EE, Rosand J, Hillert J, Ma RC, Ellinor PT, Thorgeirsson G, Gulcher JR, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature* 2007;448:353-7.
- (27) Wang J, Klysik E, Sood S, Johnson RL, Wehrens XH, Martin JF. Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:9753-8.
- (28) Mommersteeg MT, Brown NA, Prall OW, de Gier-de VC, Harvey RP, Moorman AF, Christoffels VM. Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circ Res* 2007;101:902-9.
- (29) Kirchhof P, Kahr PC, Kaese S, Piccini I, Vokshi I, Scheld HH, Roterling H, Fortmueller L, Laakmann S, Verheule S, Schotten U, Fabritz L, Brown NA. 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.
- (30) Chinchilla A, Daimi H, Lozano-Velasco E, Dominguez JN, Caballero R, Delpon E, Tamargo J, Cinca J, Hove-Madsen L, Aranega AE, Franco D. PITX2 insufficiency leads to atrial electrical and structural remodeling linked to arrhythmogenesis. *Circ Cardiovasc Genet* 2011;4:269-79.

- (31) Wakili R, Voigt N, Kaab S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2011;121:2955-68.
- (32) Chamberlain AM, Agarwal SK, Folsom AR, Duval S, Soliman EZ, Ambrose M, Eberly LE, Alonso A. Smoking and incidence of atrial fibrillation: results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Heart Rhythm* 2011;8:1160-6.
- (33) Heeringa J, Kors JA, Hofman A, van Rooij FJ, Witteman JC. Cigarette smoking and risk of atrial fibrillation: the Rotterdam Study. *Am Heart J* 2008;156:1163-9.
- (34) Goette A, Lendeckel U, Kuchenbecker A, Bukowska A, Peters B, Klein HU, Huth C, Rocken C. Cigarette smoking induces atrial fibrosis in humans via nicotine. *Heart* 2007;93:1056-63.
- (35) Shan H, Zhang Y, Lu Y, Zhang Y, Pan Z, Cai B, Wang N, Li X, Feng T, Hong Y, Yang B. Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodelling in canines. *Cardiovasc Res* 2009;83:465-72.
- (36) Najem B, Houssiere A, Pathak A, Janssen C, Lemogoum D, Xhaet O, Cuyllits N, van de Borne P. Acute cardiovascular and sympathetic effects of nicotine replacement therapy. *Hypertension* 2006;47:1162-7.
- (37) Wang H, Shi H, Zhang L, Pourrier M, Yang B, Nattel S, Wang Z. Nicotine is a potent blocker of the cardiac A-type K(+) channels. Effects on cloned Kv4.3 channels and native transient outward current. *Circulation* 2000;102:1165-71.
- (38) Kaireviciute D, Lip GY, Balakrishnan B, Uzdavinys G, Norkunas G, Kalinauskas G, Sirvydis V, Aidietis A, Zanetto U, Sihota H, Maheshwari M, Blann AD. Intra-Cardiac Expression of Markers of Endothelial Damage/Dysfunction, Inflammation, Thrombosis and Tissue Remodeling, and the Development of Post-Operative Atrial Fibrillation. *J Thromb Haemost* 2011.
- (39) Ryu K, Li L, Khrestian CM, Matsumoto N, Sahadevan J, Ruehr ML, Van Wagoner DR, Efimov IR, Waldo AL. Effects of sterile pericarditis on connexins 40 and 43 in the atria: correlation with abnormal conduction and atrial arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1231-H1241.
- (40) Ho KM, Tan JA. Benefits and risks of corticosteroid prophylaxis in adult cardiac surgery: a dose-response meta-analysis. *Circulation* 2009;119:1853-66.
- (41) Iwasaki Y, Benito B, Gillis MA, Maguy A, Nattel S. Mechanisms of atrial fibrillation associated with obesity and obstructive sleep apnea [abstract]. *Can J Cardiol* 2010;26(supplD):65D.
- (42) Ghias M, Scherlag BJ, Lu Z, Niu G, Moers A, Jackman WM, Lazzara R, Po SS. The role of ganglionated plexi in apnea-related atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2075-83.
- (43) Stevenson IH, Roberts-Thomson KC, Kistler PM, Edwards GA, Spence S, Sanders P, Kalman JM. Atrial electrophysiology is altered by acute hypercapnia but not hypoxemia: implications for promotion of atrial fibrillation in pulmonary disease and sleep apnea. *Heart Rhythm* 2010;7:1263-70.

- (44) Monahan K, Storfer-Isser A, Mehra R, Shahar E, Mittleman M, Rottman J, Punjabi N, Sanders M, Quan SF, Resnick H, Redline S. Triggering of nocturnal arrhythmias by sleep-disordered breathing events. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:1797-804.
- (45) Grimsmo J, Grundvold I, Maehlum S, Arnesen H. High prevalence of atrial fibrillation in long-term endurance cross-country skiers: echocardiographic findings and possible predictors--a 28-30 years follow-up study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2010;17:100-5.
- (46) Aizer A, Gaziano JM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Albert CM. Relation of vigorous exercise to risk of atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2009;103:1572-7.
- (47) Mont L, Elosua R, Brugada J. Endurance sport practice as a risk factor for atrial fibrillation and atrial flutter. *Europace* 2009;11:11-7.
- (48) Mont L, Tamborero D, Elosua R, Molina I, Coll-Vinent B, Sitges M, Vidal B, Scalise A, Tejeira A, Berruezo A, Brugada J. Physical activity, height, and left atrial size are independent risk factors for lone atrial fibrillation in middle-aged healthy individuals. *Europace* 2008;10:15-20.
- (49) Mont L, Sambola A, Brugada J, Vacca M, Marrugat J, Elosua R, Pare C, Azqueta M, Sanz G. Long-lasting sport practice and lone atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2002;23:477-82.
- (50) Karjalainen J, Kujala UM, Kaprio J, Sarna S, Viitasalo M. Lone atrial fibrillation in vigorously exercising middle aged men: case-control study. *BMJ* 1998;316:1784-5.
- (51) Baldesberger S, Bauersfeld U, Candinas R, Seifert B, Zuber M, Ritter M, Jenni R, Oechslin E, Luthi P, Scharf C, Marti B, Attenhofer Jost CH. Sinus node disease and arrhythmias in the long-term follow-up of former professional cyclists. *Eur Heart J* 2008;29:71-8.
- (52) Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1:62-73.
- (53) Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:802-9.
- (54) Lee KW, Everett TH, Rahmutula D, Guerra JM, Wilson E, Ding C, Olgin JE. Pirfenidone prevents the development of a vulnerable substrate for atrial fibrillation in a canine model of heart failure. *Circulation* 2006;114:1703-12.
- (55) de Bakker JM, van Capelle FJ, Janse MJ, Tasseron S, Vermeulen JT, de JN, Lahpor JR. Slow conduction in the infarcted human heart. 'Zigzag' course of activation. *Circulation* 1993;88:915-26.
- (56) Kawara T, Derksen R, de Groot JR, Coronel R, Tasseron S, Linnenbank AC, Hauer RN, Kirkels H, Janse MJ, de Bakker JM. Activation delay after premature stimulation in chronically diseased human myocardium relates to the architecture of interstitial fibrosis. *Circulation* 2001;104:3069-75.

- (57) Tanaka K, Zlochiver S, Vikstrom KL, Yamazaki M, Moreno J, Klos M, Zaitsev AV, Vaidyanathan R, Auerbach DS, Landas S, Guiraudon G, Jalife J, Berenfeld O, Kalifa J. Spatial distribution of fibrosis governs fibrillation wave dynamics in the posterior left atrium during heart failure. *Circ Res* 2007;101:839-47.
- (58) Rohr S, Kucera JP, Fast VG, Kleber AG. Paradoxical improvement of impulse conduction in cardiac tissue by partial cellular uncoupling. *Science* 1997;275:841-4.
- (59) Cabo C, Pertsov AM, Baxter WT, Davidenko JM, Gray RA, Jalife J. Wave-front curvature as a cause of slow conduction and block in isolated cardiac muscle. *Circ Res* 1994;75:1014-28.
- (60) Engelman ZJ, Trew ML, Smaill BH. Structural heterogeneity alone is a sufficient substrate for dynamic instability and altered restitution. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;3:195-203.
- (61) Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Shi YF, Tardif JC, Leung TK, Nattel S. Dissociation between ionic remodeling and ability to sustain atrial fibrillation during recovery from experimental congestive heart failure. *Circulation* 2004;109:412-8.
- (62) Verheule S, Sato T, Everett T, Engle SK, Otten D, Rubart-von der LM, Nakajima HO, Nakajima H, Field LJ, Olgin JE. Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res* 2004;94:1458-65.
- (63) Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res* 2002;54:361-79.
- (64) Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, Weigl J, Gummert J, Hindricks G, Kottkamp H, Dhein S. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart* 2004;90:400-5.
- (65) Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 1997;96:1180-4.
- (66) Goette A, Juenemann G, Peters B, Klein HU, Roessner A, Huth C, Rocken C. Determinants and consequences of atrial fibrosis in patients undergoing open heart surgery. *Cardiovasc Res* 2002;54:390-6.
- (67) Schneider MP, Hua TA, Bohm M, Wachtell K, Kjeldsen SE, Schmieder RE. Prevention of atrial fibrillation by Renin-Angiotensin system inhibition a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2299-307.
- (68) Shiraishi I, Takamatsu T, Minamikawa T, Fujita S. 3-D observation of actin filaments during cardiac myofibrinogenesis in chick embryo using a confocal laser scanning microscope. *Anat Embryol (Berl)* 1992;185:401-8.
- (69) Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2005;65:40-51.

- (70) Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2011;89:744-53.
- (71) Camelliti P, Devlin GP, Matthews KG, Kohl P, Green CR. Spatially and temporally distinct expression of fibroblast connexins after sheep ventricular infarction. *Cardiovasc Res* 2004;62:415-25.
- (72) He K, Shi X, Zhang X, Dang S, Ma X, Liu F, Xu M, Lv Z, Han D, Fang X, Zhang Y. Long-distance intercellular connectivity between cardiomyocytes and cardiofibroblasts mediated by membrane nanotubes. *Cardiovasc Res* 2011;92:39-47.
- (73) Chilton L, Giles WR, Smith GL. Evidence of intercellular coupling between co-cultured adult rabbit ventricular myocytes and myofibroblasts. *J Physiol* 2007;583:225-36.
- (74) Pedrotty DM, Klinger RY, Kirkton RD, Bursac N. Cardiac fibroblast paracrine factors alter impulse conduction and ion channel expression of neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2009;83:688-97.
- (75) Thompson SA, Copeland CR, Reich DH, Tung L. Mechanical coupling between myofibroblasts and cardiomyocytes slows electric conduction in fibrotic cell monolayers. *Circulation* 2011;123:2083-93.
- (76) Vasquez C, Mohandas P, Louie KL, Benamer N, Bapat AC, Morley GE. Enhanced fibroblast-myocyte interactions in response to cardiac injury. *Circ Res* 2010;107:1011-20.
- (77) Jacquemet V, Henriquez CS. Loading effect of fibroblast-myocyte coupling on resting potential, impulse propagation, and repolarization: insights from a microstructure model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H2040-H2052.
- (78) Miragoli M, Salvarani N, Rohr S. Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circ Res* 2007;101:755-8.
- (79) Zou R, Kneller J, Leon LJ, Nattel S. Substrate size as a determinant of fibrillatory activity maintenance in a mathematical model of canine atrium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1002-H1012.
- (80) Stein M, van Veen TA, Remme CA, Boulaksil M, Noorman M, van SL, van der Nagel R, Bezzina CR, Hauer RN, de Bakker JM, van Rijen HV. Combined reduction of intercellular coupling and membrane excitability differentially affects transverse and longitudinal cardiac conduction. *Cardiovasc Res* 2009;83:52-60.
- (81) Akar FG, Nass RD, Hahn S, Cingolani E, Shah M, Hesketh GG, DiSilvestre D, Tunin RS, Kass DA, Tomaselli GF. Dynamic changes in conduction velocity and gap junction properties during development of pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1223-H1230.



- (82) Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res* 2001;88:333-9.
- (83) Guerra JM, Everett TH, Lee KW, Wilson E, Olgin JE. Effects of the gap junction modifier rotigaptide (ZP123) on atrial conduction and vulnerability to atrial fibrillation. *Circulation* 2006;114:110-8.
- (84) Shiroshita-Takeshita A, Sakabe M, Haugan K, Hennen JK, Nattel S. Model-dependent effects of the gap junction conduction-enhancing antiarrhythmic peptide rotigaptide (ZP123) on experimental atrial fibrillation in dogs. *Circulation* 2007;115:310-8.
- (85) Bettoni M, Zimmermann M. Autonomic tone variations before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 2002;105:2753-9.
- (86) Chen PS, Tan AY. Autonomic nerve activity and atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2007;4:S61-S64.
- (87) Zipes DP, Mihalick MJ, Robbins GT. Effects of selective vagal and stellate ganglion stimulation of atrial refractoriness. *Cardiovasc Res* 1974;8:647-55.
- (88) Chen YJ, Chen SA, Chang MS, Lin CI. Arrhythmogenic activity of cardiac muscle in pulmonary veins of the dog: implication for the genesis of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2000;48:265-73.
- (89) Takei M, Furukawa Y, Narita M, Ren LM, Karasawa Y, Murakami M, Chiba S. Synergistic nonuniform shortening of atrial refractory period induced by autonomic stimulation. *Am J Physiol* 1991;261:H1988-H1993.
- (90) Tan AY, Zhou S, Ogawa M, Song J, Chu M, Li H, Fishbein MC, Lin SF, Chen LS, Chen PS. Neural mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal atrial tachycardia in ambulatory canines. *Circulation* 2008;118:916-25.
- (91) Burashnikov A, Antzelevitch C. Reinduction of atrial fibrillation immediately after termination of the arrhythmia is mediated by late phase 3 early afterdepolarization-induced triggered activity. *Circulation* 2003;107:2355-60.
- (92) Amar D, Zhang H, Miodownik S, Kadish AH. Competing autonomic mechanisms precede the onset of postoperative atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1262-8.
- (93) Vigmond EJ, Tsoi V, Kuo S, Arevalo H, Kneller J, Nattel S, Trayanova N. The effect of vagally induced dispersion of action potential duration on atrial arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2004;1:334-44.
- (94) Coumel P, Attuel P, Lavallee J, Flammang D, Leclercq JF, Slama R. [The atrial arrhythmia syndrome of vagal origin]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1978;71:645-56.
- (95) Lemola K, Chartier D, Yeh YH, Dubuc M, Cartier R, Armour A, Ting M, Sakabe M, Shiroshita-Takeshita A, Comtois P, Nattel S. Pulmonary vein region ablation in experimental vagal atrial fibrillation: role of pulmonary veins versus autonomic ganglia. *Circulation* 2008;117:470-7.

- (96) Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002;415:219-26.
- (97) Vigmond EJ, Tsoi V, Kuo S, Arevalo H, Kneller J, Nattel S, Trayanova N. The effect of vagally induced dispersion of action potential duration on atrial arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2004;1:334-44.
- (98) Spach MS, Heidlage JF, Dolber PC, Barr RC. Mechanism of origin of conduction disturbances in aging human atrial bundles: experimental and model study. *Heart Rhythm* 2007;4:175-85.
- (99) Fenelon G, Shepard RK, Stambler BS. Focal origin of atrial tachycardia in dogs with rapid ventricular pacing-induced heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;14:1093-102.
- (100) Zhou S, Chang CM, Wu TJ, Miyauchi Y, Okuyama Y, Park AM, Hamabe A, Omichi C, Hayashi H, Brodsky LA, Mandel WJ, Ting CT, Fishbein MC, Karagueuzian HS, Chen PS. Nonreentrant focal activations in pulmonary veins in canine model of sustained atrial fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1244-H1252.
- (101) Lemoine MD, Duverger JE, Naud P, Chartier D, Qi XY, Comtois P, Fabritz L, Kirchhof P, Nattel S. Arrhythmogenic left atrial cellular electrophysiology in a murine genetic long QT syndrome model. *Cardiovasc Res* 2011;92:67-74.
- (102) Lawler PR, Filion KB, Eisenberg MJ. Efficacy of exercise-based cardiac rehabilitation post-myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 2011;162:571-84.
- (103) Blair SN, Morris JN. Healthy hearts--and the universal benefits of being physically active: physical activity and health. *Ann Epidemiol* 2009;19:253-6.
- (104) La GA, Robberecht C, Kuiperi C, Nuyens D, Willems R, de RT, Matthijs G, Heidbuchel H. Lower than expected desmosomal gene mutation prevalence in endurance athletes with complex ventricular arrhythmias of right ventricular origin. *Heart* 2010;96:1268-74.
- (105) La GA, Burns AT, Mooney DJ, Inder WJ, Taylor AJ, Bogaert J, Macisaac AI, Heidbuchel H, Prior DL. Exercise-induced right ventricular dysfunction and structural remodelling in endurance athletes. *Eur Heart J* 2011.
- (106) Molina L, Mont L, Marrugat J, Berruezo A, Brugada J, Bruguera J, Rebato C, Elosua R. Long-term endurance sport practice increases the incidence of lone atrial fibrillation in men: a follow-up study. *Europace* 2008;10:618-23.
- (107) Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, Singer DE. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA* 2001;285:2370-5.
- (108) Pelliccia A, Maron BJ, Di Paolo FM, Biffi A, Quattrini FM, Pisicchio C, Roselli A, Caselli S, Culasso F. Prevalence and clinical significance of left atrial remodeling in competitive athletes. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:690-6.

- (109) Mozaffarian D, Furberg CD, Psaty BM, Siscovick D. Physical activity and incidence of atrial fibrillation in older adults: the cardiovascular health study. *Circulation* 2008;118:800-7.
- (110) Camm AJ, Al-Khatib SM, Calkins H et al. A proposal for new clinical concepts in the management of atrial fibrillation. *Am Heart J. In press*
- (111) Khan MN, Jais P, Cummings J, Di BL, Sanders P, Martin DO, Kautzner J, Hao S, Themistoclakis S, Fanelli R, Potenza D, Massaro R, Wazni O, Schweikert R, Saliba W, Wang P, Al-Ahmad A, Beheiry S, Santarelli P, Starling RC, Dello RA, Pelargonio G, Brachmann J, Schibgilla V, Bonso A, Casella M, Raviele A, Haissaguerre M, Natale A. Pulmonary-vein isolation for atrial fibrillation in patients with heart failure. *N Engl J Med* 2008;359:1778-85.
- (112) Lafuente-Lafuente C, Mouly S, Longas-Tejero MA, Bergmann JF. Antiarrhythmics for maintaining sinus rhythm after cardioversion of atrial fibrillation. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;CD005049.
- (113) Dobrev D, Nattel S. New antiarrhythmic drugs for treatment of atrial fibrillation. *Lancet* 2010;375:1212-23.
- (114) Guasch E, Mont Ls. Ranolazina: ¿tratamiento potencial de las arritmias? *Revista Española de Cardiología* 2010;10:62-72.
- (115) Connolly SJ, Camm AJ, Halperin JL, Joyner C, Alings M, Amerena J, Atar D, Avezum A, Blomstrom P, Borggrefe M, Budaj A, Chen SA, Ching CK, Commerford P, Dans A, Davy JM, Delacretaz E, Di PG, Diaz R, Dorian P, Flaker G, Golitsyn S, Gonzalez-Hermosillo A, Granger CB, Heidbuchel H, Kautzner J, Kim JS, Lanan F, Lewis BS, Merino JL, Morillo C, Murin J, Narasimhan C, Paolasso E, Parkhomenko A, Peters NS, Sim KH, Stiles MK, Tanomsup S, Toivonen L, Tomcsanyi J, Torp-Pedersen C, Tse HF, Vardas P, Vinereanu D, Xavier D, Zhu J, Zhu JR, Baret-Cormel L, Weinling E, Staiger C, Yusuf S, Chrolavicius S, Afzal R, Hohnloser SH. Dronedarone in high-risk permanent atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:2268-76.
- (116) Singh BN, Connolly SJ, Crijns HJ, Roy D, Kowey PR, Capucci A, Radzik D, Aliot EM, Hohnloser SH. Dronedarone for maintenance of sinus rhythm in atrial fibrillation or flutter. *N Engl J Med* 2007;357:987-99.
- (117) Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, Van Gelder IC, Al-Attar N, Hindricks G, Prendergast B, Heidbuchel H, Alfieri O, Angelini A, Atar D, Colonna P, De CR, De SJ, Goette A, Gorenek B, Heldal M, Hohloser SH, Kolh P, Le Heuzey JY, Ponikowski P, Rutten FH. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2010;31:2369-429.
- (118) Wachtell K, Lehto M, Gerds E, Olsen MH, Hornestam B, Dahlöf B, Ibsen H, Julius S, Kjeldsen SE, Lindholm LH, Nieminen MS, Devereux RB. Angiotensin II receptor blockade reduces new-onset atrial fibrillation and subsequent stroke compared to atenolol: the Losartan Intervention For End Point Reduction in Hypertension (LIFE) study. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:712-9.

- (119) Belluzzi F, Sernesi L, Preti P, Salinaro F, Fonte ML, Perlini S. Prevention of recurrent lone atrial fibrillation by the angiotensin-II converting enzyme inhibitor ramipril in normotensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:24-9.
- (120) Bhuriya R, Singh M, Sethi A, Molnar J, Bahekar A, Singh PP, Khosla S, Arora R. Prevention of recurrent atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011;16:178-84.
- (121) Disertori M, Barlera S, Staszewsky L, Latini R, Quintarelli S, Franzosi MG. Systematic review and meta-analysis: Renin-Angiotensin system inhibitors in the prevention of atrial fibrillation recurrences. An unfulfilled hope. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012;26:47-54.
- (122) Rahimi K, Emberson J, McGale P, Majoni W, Merhi A, Asselbergs FW, Krane V, Macfarlane PW. Effect of statins on atrial fibrillation: collaborative meta-analysis of published and unpublished evidence from randomised controlled trials. *BMJ* 2011;342:d1250.
- (123) Kowey PR, Reiffel JA, Ellenbogen KA, Naccarelli GV, Pratt CM. Efficacy and safety of prescription omega-3 fatty acids for the prevention of recurrent symptomatic atrial fibrillation: a randomized controlled trial. *JAMA* 2010;304:2363-72.
- (124) Liu T, Korantzopoulos P, Shehata M, Li G, Wang X, Kaul S. Prevention of atrial fibrillation with omega-3 fatty acids: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Heart* 2011;97:1034-40.
- (125) Amit G, Qin H, Donahue JK. Biological therapies for atrial fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;52:222-7.
- (126) Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le MA, Le MP, Clementy J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998;339:659-66.
- (127) Knecht S, Hocini M, Wright M, Lellouche N, O'Neill MD, Matsuo S, Nault I, Chauhan VS, Makati KJ, Bevilacqua M, Lim KT, Sacher F, Deplagne A, Derval N, Bordachar P, Jais P, Clementy J, Haissaguerre M. Left atrial linear lesions are required for successful treatment of persistent atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2008;29:2359-66.
- (128) Calkins H, Reynolds MR, Spector P, Sondhi M, Xu Y, Martin A, Williams CJ, Sledge I. Treatment of atrial fibrillation with antiarrhythmic drugs or radiofrequency ablation: two systematic literature reviews and meta-analyses. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009;2:349-61.
- (129) Nair GM, Nery PB, Diwakaramenon S, Healey JS, Connolly SJ, Morillo CA. A systematic review of randomized trials comparing radiofrequency ablation with antiarrhythmic medications in patients with atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2009;20:138-44.
- (130) Calkins H, Kuck KH, Cappato R, Brugada J, Camm AJ, Chen SA, Crijns HJ, Damiano RJ, Jr., Davies DW, Dimarco J, Edgerton J, Ellenbogen K, Ezekowitz MD, Haines DE, Haissaguerre M, Hindricks G, Iesaka Y, Jackman W, Jalife J, Jais P, Kalman J, Keane D, Kim YH, Kirchhof P, Klein G, Kottkamp H, Kumagai K, Lindsay BD, Mansour M, Marchlinski FE, McCarthy PM, Mont JL, Morady F,

Nademanee K, Nakagawa H, Natale A, Nattel S, Packer DL, Pappone C, Prystowsky E, Raviele A, Reddy V, Ruskin JN, Shemin RJ, Tsao HM, Wilber D, Calkins H, Kuck KH, Cappato R, Chen SA, Prystowsky EN, Kuck KH, Natale A, Haines DE, Marchlinski FE, Calkins H, Davies DW, Lindsay BD, Damiano R, Jr., Packer DL, Brugada J, Camm AJ, Crijns HJ, Dimarco J, Edgerton J, Ellenbogen K, Ezekowitz MD, Haissaguerre M, Hindricks G, Iesaka Y, Jackman WM, Jais P, Jalife J, Kalman J, Keane D, Kim YH, Kirchhof P, Klein G, Kottkamp H, Kumagai K, Mansour M, Marchlinski F, McCarthy P, Mont JL, Morady F, Nademanee K, Nakagawa H, Nattel S, Pappone C, Raviele A, Reddy V, Ruskin JN, Shemin RJ, Tsao HM, Wilber D. 2012 HRS/EHRA/ECAS Expert Consensus Statement on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation: Recommendations for Patient Selection, Procedural Techniques, Patient Management and Follow-up, Definitions, Endpoints, and Research Trial Design: A report of the Heart Rhythm Society (HRS) Task Force on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation. Developed in partnership with the European Heart Rhythm Association (EHRA), a registered branch of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Cardiac Arrhythmia Society (ECAS); and in collaboration with the American College of Cardiology (ACC), American Heart Association (AHA), the Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS), and the Society of Thoracic Surgeons (STS). Endorsed by the governing bodies of the American College of Cardiology Foundation, the American Heart Association, the European Cardiac Arrhythmia Society, the European Heart Rhythm Association, the Society of Thoracic Surgeons, the Asia Pacific Heart Rhythm Society, and the Heart Rhythm Society. *Heart Rhythm* 2012.

- (131) Calvo N, Nadal M, Berruezo A, Andreu D, Arbelo E, Tolosana JM, Guasch E, Matiello M, Matas M, Alsina X, Sitges M, Brugada J, Mont L. Improved outcomes and complications of atrial fibrillation catheter ablation over time: learning curve, techniques, and methodology. *Rev Esp Cardiol* 2012;65:131-8.
- (132) Hohnloser SH, Pajitnev D, Pogue J, Healey JS, Pfeffer MA, Yusuf S, Connolly SJ. Incidence of stroke in paroxysmal versus sustained atrial fibrillation in patients taking oral anticoagulation or combined antiplatelet therapy: an ACTIVE W Substudy. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2156-61.
- (133) Atrial Fibrillation Investigators: Atrial Fibrillation AAS, Boston Area Anticoagulation Trial for Atrial Fibrillation Study, Canadian Atrial Fibrillation Anticoagulation Study, Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Study, Veterans Affairs Stroke Prevention in Nonrheumatic Atrial Fibrillation Study. Risk Factors for Stroke and Efficacy of Antithrombotic Therapy in Atrial Fibrillation: Analysis of Pooled Data From Five Randomized Controlled Trials. *Arch Intern Med* 1994;154:1449-57.
- (134) The AF, I. The Efficacy of Aspirin in Patients With Atrial Fibrillation: Analysis of Pooled Data From 3 Randomized Trials. *Arch Intern Med* 1997;157:1237-40.
- (135) van WC, Hart RG, Singer DE, Laupacis A, Connolly S, Petersen P, Koudstaal PJ, Chang Y, Hellemons B. Oral anticoagulants vs aspirin in nonvalvular atrial fibrillation: an individual patient meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2441-8.
- (136) Singer DE, Chang Y, Fang MC, Borowsky LH, Pomernacki NK, Udaltsova N, Go AS. The net clinical benefit of warfarin anticoagulation in atrial fibrillation. *Ann Intern Med* 2009;151:297-305.

- (137) Gage BF, Waterman AD, Shannon W, Boehler M, Rich MW, Radford MJ. Validation of clinical classification schemes for predicting stroke: results from the National Registry of Atrial Fibrillation. *JAMA* 2001;285:2864-70.
- (138) Fang MC, Go AS, Chang Y, Borowsky L, Pomernacki NK, Singer DE. Comparison of risk stratification schemes to predict thromboembolism in people with nonvalvular atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:810-5.
- (139) Daccarett M, Badger TJ, Akoum N, Burgon NS, Mahnkopf C, Vergara G, Kholmovski E, McGann CJ, Parker D, Brachmann J, Macleod RS, Marrouche NF. Association of left atrial fibrosis detected by delayed-enhancement magnetic resonance imaging and the risk of stroke in patients with atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:831-8.
- (140) Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, Breithardt G, Halperin JL, Hankey GJ, Piccini JP, Becker RC, Nessel CC, Paolini JF, Berkowitz SD, Fox KA, Califf RM. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:883-91.
- (141) Connolly SJ, Eikelboom J, Joyner C, Diener HC, Hart R, Golitsyn S, Flaker G, Avezum A, Hohnloser SH, Diaz R, Talajic M, Zhu J, Pais P, Budaj A, Parkhomenko A, Jansky P, Commerford P, Tan RS, Sim KH, Lewis BS, Van MW, Lip GY, Kim JH, Lanus-Zanetti F, Gonzalez-Hermosillo A, Dans AL, Munawar M, O'Donnell M, Lawrence J, Lewis G, Afzal R, Yusuf S. Apixaban in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;364:806-17.
- (142) Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, Pogue J, Reilly PA, Themeles E, Varrone J, Wang S, Alings M, Xavier D, Zhu J, Diaz R, Lewis BS, Darius H, Diener HC, Joyner CD, Wallentin L. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009;361:1139-51.
- (143) <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicinalProducts/ucm282820.htm> consultat el
- (144) Holmes DR, Reddy VY, Turi ZG, Doshi SK, Sievert H, Buchbinder M, Mullin CM, Sick P. Percutaneous closure of the left atrial appendage versus warfarin therapy for prevention of stroke in patients with atrial fibrillation: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2009;374:534-42.
- (145) Ostermayer SH, Reisman M, Kramer PH, Matthews RV, Gray WA, Block PC, Omran H, Bartorelli AL, Della BP, Di MC, Pappone C, Casale PN, Moses JW, Poppas A, Williams DO, Meier B, Skanes A, Teirstein PS, Lesh MD, Nakai T, Bayard Y, Billinger K, Trepels T, Krumsdorf U, Sievert H. Percutaneous left atrial appendage transcatheter occlusion (PLAATO system) to prevent stroke in high-risk patients with non-rheumatic atrial fibrillation: results from the international multi-center feasibility trials. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:9-14.
- (146) <http://www.mirbase.org> consultat el 10/Mar/12

- (147) Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 2007;8:166.
- (148) van RE, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007;316:575-9.
- (149) Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007;13:486-91.
- (150) Terentyev D, Belevych AE, Terentyeva R, Martin MM, Malana GE, Kuhn DE, Abdellatif M, Feldman DS, Elton TS, Gyorke S. miR-1 overexpression enhances Ca<sup>2+</sup> release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting PP2A regulatory subunit B56alpha and causing CaMKII-dependent hyperphosphorylation of RyR2. *Circ Res* 2009;104:514-21.
- (151) Hullinger TG, Montgomery RL, Seto AG, Dickinson BA, Semus HM, Lynch JM, Dalby CM, Robinson K, Stack C, Latimer PA, Hare JM, Olson EN, van RE. Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ Res* 2012;110:71-81.
- (152) Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008;456:980-4.
- (153) Condorelli G, Latronico MV, Dorn GW. microRNAs in heart disease: putative novel therapeutic targets? *Eur Heart J* 2010;31:649-58.
- (154) Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair ML, Heymans S, Wagner DR. Use of Circulating MicroRNAs to Diagnose Acute Myocardial Infarction. *Clin Chem* 2012;58:559-67.
- (155) Ren XP, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, Nicolaou P, Pritchard TJ, Fan GC. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation* 2009;119:2357-66.
- (156) Fagard R. Athlete's heart. *Heart* 2003;89:1455-61.
- (157) Dewland TA, Androne AS, Lee FA, Lampert RJ, Katz SD. Effect of acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine on cardiac parasympathetic function in sedentary adults and trained athletes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H86-H92.
- (158) Wilhelm M, Roten L, Tanner H, Wilhelm I, Schmid JP, Saner H. Atrial remodeling, autonomic tone, and lifetime training hours in nonelite athletes. *Am J Cardiol* 2011;108:580-5.
- (159) Guiraud T, Gayda M, Curnier D, Juneau M, Talajic M, Fortier A, Nigam A. Long-term exercise-training improves QT dispersion in the metabolic syndrome. *Int Heart J* 2010;51:41-6.

- (160) Benito B, Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, Guasch E, Shi Y, Tardif JC, Brugada J, Nattel S, Mont L. Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. *Circulation* 2011;123:13-22.
- (161) Kmecova J, Klimas J. Heart rate correction of the QT duration in rats. *Eur J Pharmacol* 2010;641:187-92.
- (162) Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447-55.
- (163) Gaborit N, Le BS, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007;582:675-93.
- (164) Morton DB, Griffiths PH. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 1985;116:431-6.
- (165) Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8319-23.
- (166) Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, Al-Khalidi HR, Ansell J, Atar D, Avezum A, Bahit MC, Diaz R, Easton JD, Ezekowitz JA, Flaker G, Garcia D, Geraldes M, Gersh BJ, Golitsyn S, Goto S, Hermosillo AG, Hohnloser SH, Horowitz J, Mohan P, Jansky P, Lewis BS, Lopez-Sendon JL, Pais P, Parkhomenko A, Verheugt FW, Zhu J, Wallentin L. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:981-92.
- (167) Nabauer M, Gerth A, Limbourg T, Schneider S, Oeff M, Kirchhof P, Goette A, Lewalter T, Ravens U, Meinertz T, Breithardt G, Steinbeck G. The Registry of the German Competence NETwork on Atrial Fibrillation: patient characteristics and initial management. *Europace* 2009;11:423-34.
- (168) Crijns HJ, Van Gelder IC, Van Gilst WH, Hillege H, Gosselink AM, Lie KI. Serial antiarrhythmic drug treatment to maintain sinus rhythm after electrical cardioversion for chronic atrial fibrillation or atrial flutter. *Am J Cardiol* 1991;68:335-41.
- (169) Kravev S, Schneider K, Lang S, Suselbeck T, Borggrefe M. Incidence and severity of coronary artery disease in patients with atrial fibrillation undergoing first-time coronary angiography. *PLoS One* 2011;6:e24964.
- (170) Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, Caso P, Dudek D, Gielen S, Huber K, Ohman M, Petrie MC, Sonntag F, Uva MS, Storey RF, Wijns W, Zahger D, Bax JJ, Auricchio A, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Poldermans D, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, Windecker S, Achenbach S, Badimon L, Bertrand M, Botker HE, Collet JP, Crea F, Danchin N, Falk E, Goudevenos J, Gulba D, Hambrecht R, Herrmann J, Kastrati A, Kjeldsen K, Kristensen SD, Lancellotti P, Mehilli J, Merkely B, Montalescot G, Neumann FJ, Neyses L, Perk J, Roffi M, Romeo F, Ruda M, Swahn E, Valgimigli M, Vrints CJ,



Widimsky P. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2011;32:2999-3054.

- (171) Connolly S, Pogue J, Hart R, Pfeffer M, Hohnloser S, Chrolavicius S, Pfeffer M, Hohnloser S, Yusuf S. Clopidogrel plus aspirin versus oral anticoagulation for atrial fibrillation in the Atrial fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for prevention of Vascular Events (ACTIVE W): a randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:1903-12.
- (172) Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med* 1998;339:1665-71.
- (173) Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schuhlen H, Blasini R, Hadamitzky M, Walter H, Zitzmann-Roth EM, Richardt G, Alt E, Schmitt C, Ulm K. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med* 1996;334:1084-9.
- (174) Palareti G, Leali N, Coccheri S, Poggi M, Manotti C, D'Angelo A, Pengo V, Erba N, Moia M, Ciavarella N, Devoto G, Berrettini M, Musolesi S. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy. *Lancet* 1996;348:423-8.
- (175) Buresly K, Eisenberg MJ, Zhang X, Pilote L. Bleeding complications associated with combinations of aspirin, thienopyridine derivatives, and warfarin in elderly patients following acute myocardial infarction. *Arch Intern Med* 2005;165:784-9.
- (176) Orford JL, Fasseas P, Melby S, Burger K, Steinhubl SR, Holmes DR, Berger PB. Safety and efficacy of aspirin, clopidogrel, and warfarin after coronary stent placement in patients with an indication for anticoagulation. *Am Heart J* 2004;147:463-7.
- (177) Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, Flachskampf F, Hall R, Lung B, Kasprzak J, Nataf P, Tornos P, Torracca L, Wenink A. Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2007;28:230-68.
- (178) Schmitt L, Speckman J, Ansell J. Quality assessment of anticoagulation dose management: comparative evaluation of measures of time-in-therapeutic range. *J Thromb Thrombolysis* 2003;15:213-6.
- (179) Hoglund C. Enlarged left atrial dimension in former endurance athletes: an echocardiographic study. *Int J Sports Med* 1986;7:133-6.
- (180) Pelliccia A, Maron BJ, De LR, Di Paolo FM, Spataro A, Culasso F. Remodeling of left ventricular hypertrophy in elite athletes after long-term deconditioning. *Circulation* 2002;105:944-9.

- (181) Gamelin FX, Berthoin S, Sayah H, Libersa C, Bosquet L. Effect of training and detraining on heart rate variability in healthy young men. *Int J Sports Med* 2007;28:564-70.
- (182) Pichot V, Busso T, Roche F, Garet M, Costes F, Duverney D, Lacour JR, Barthelemy JC. Autonomic adaptations to intensive and overload training periods: a laboratory study. *Med Sci Sports Exerc* 2002;34:1660-6.
- (183) Iranmanesh A, Rochester DF, Liu J, Veldhuis JD. Impaired adrenergic- and corticotropic-axis outflow during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Metabolism* 2011;60:1521-9.
- (184) Girard I, Garland T, Jr. Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice. *J Appl Physiol* 2002;92:1553-61.
- (185) Everett TH, Wilson EE, Verheule S, Guerra JM, Foreman S, Olgin JE. Structural atrial remodeling alters the substrate and spatiotemporal organization of atrial fibrillation: a comparison in canine models of structural and electrical atrial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2911-H2923.
- (186) Anne W, Willems R, Roskams T, Sergeant P, Herijgers P, Holemans P, Ector H, Heidbuchel H. Matrix metalloproteinases and atrial remodeling in patients with mitral valve disease and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2005;67:655-66.
- (187) Nishida K, Michael G, Dobrev D, Nattel S. Animal models for atrial fibrillation: clinical insights and scientific opportunities. *Europace* 2010;12:160-72.
- (188) Milliez P, Deangelis N, Rucker-Martin C, Leenhardt A, Vicaut E, Robidel E, Beaufile P, Delcayre C, Hatem SN. Spironolactone reduces fibrosis of dilated atria during heart failure in rats with myocardial infarction. *Eur Heart J* 2005;26:2193-9.
- (189) Boixel C, Fontaine V, Rucker-Martin C, Milliez P, Louedec L, Michel JB, Jacob MP, Hatem SN. Fibrosis of the left atria during progression of heart failure is associated with increased matrix metalloproteinases in the rat. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:336-44.
- (190) Wang Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994;28:1540-6.
- (191) Collier SR, Kanaley JA, Carhart R, Jr., Frechette V, Tobin MM, Bennett N, Luckenbaugh AN, Fernhall B. Cardiac autonomic function and baroreflex changes following 4 weeks of resistance versus aerobic training in individuals with pre-hypertension. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;195:339-48.
- (192) Yang KC, Foeger NC, Marionneau C, Jay PY, McMullen JR, Nerbonne JM. Homeostatic regulation of electrical excitability in physiological cardiac hypertrophy. *J Physiol* 2010;588:5015-32.
- (193) Damilano F, Perino A, Hirsch E. PI3K kinase and scaffold functions in heart. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1188:39-45.
- (194) Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. MicroRNA-21 protects against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:5-14.

- (195) Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2007;26:3227-39.
- (196) Gao X, He X, Luo B, Peng L, Lin J, Zuo Z. Angiotensin II increases collagen I expression via transforming growth factor-beta1 and extracellular signal-regulated kinase in cardiac fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 2009;606:115-20.
- (197) Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, Nattel S. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation* 2001;104:2608-14.
- (198) Xie T, Liang J, Guo R, Liu N, Noble PW, Jiang D. Comprehensive microRNA analysis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis identifies multiple sites of molecular regulation. *Physiol Genomics* 2011;43:479-87.
- (199) Ardite E, Perdiguero E, Vidal B, Gutarra S, Serrano AL, Munoz-Canoves P. PAI-1-regulated miR-21 defines a novel age-associated fibrogenic pathway in muscular dystrophy. *J Cell Biol* 2012;196:163-75.
- (200) Chapple MW, Sabharwal R. Methods of assessing vagus nerve activity and reflexes. *Heart Fail Rev* 2011;16:109-27.
- (201) Oakes RS, Badger TJ, Kholmovski EG, Akoum N, Burgon NS, Fish EN, Blauer JJ, Rao SN, DiBella EV, Segerson NM, Daccarett M, Windfelder J, McGann CJ, Parker D, Macleod RS, Marrouche NF. Detection and quantification of left atrial structural remodeling with delayed-enhancement magnetic resonance imaging in patients with atrial fibrillation. *Circulation* 2009;119:1758-67.
- (202) Yoshihara F, Nishikimi T, Sasako Y, Hino J, Kobayashi J, Minatoya K, Bando K, Kosakai Y, Horio T, Suga S, Kawano Y, Matsuoka H, Yutani C, Matsuo H, Kitamura S, Ohe T, Kangawa K. Plasma atrial natriuretic peptide concentration inversely correlates with left atrial collagen volume fraction in patients with atrial fibrillation: plasma ANP as a possible biochemical marker to predict the outcome of the maze procedure. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:288-94.
- (203) Tziakas DN, Chalikias GK, Papanas N, Stakos DA, Chatzikyriakou SV, Maltezos E. Circulating levels of collagen type I degradation marker depend on the type of atrial fibrillation. *Europace* 2007;9:589-96.
- (204) Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;92:1954-68.
- (205) Heidebuchel H, Anne W, Willems R, Adriaenssens B, Van de Werf F, Ector H. Endurance sports is a risk factor for atrial fibrillation after ablation for atrial flutter. *Int J Cardiol* 2006;107:67-72.
- (206) Patrick DM, Montgomery RL, Qi X, Obad S, Kauppinen S, Hill JA, van RE, Olson EN. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J Clin Invest* 2010;120:3912-6.

- (207) Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438:685-9.
- (208) Maegdefessel L, Azuma J, Toh R, Deng A, Merk DR, Raiesdana A, Leeper NJ, Raaz U, Schoelmerich AM, McConnell MV, Dalman RL, Spin JM, Tsao PS. MicroRNA-21 Blocks Abdominal Aortic Aneurysm Development and Nicotine-Augmented Expansion. *Sci Transl Med* 2012;4:122ra22.
- (209) Ruiz-Nodar JM, Marin F, Hurtado JA, Valencia J, Pinar E, Pineda J, Gimeno JR, Sogorb F, Valdes M, Lip GY. Anticoagulant and antiplatelet therapy use in 426 patients with atrial fibrillation undergoing percutaneous coronary intervention and stent implantation implications for bleeding risk and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:818-25.
- (210) Sambola A, Ferreira-Gonzalez I, Angel J, Alfonso F, Maristany J, Rodriguez O, Bueno H, Lopez-Minguez JR, Zueco J, Fernandez-Aviles F, Roman AS, Prendergast B, Mainar V, Garcia-Dorado D, Tornos P. Therapeutic strategies after coronary stenting in chronically anticoagulated patients: the MUSICA study. *Heart* 2009;95:1483-8.
- (211) Wang TY, Robinson LA, Ou FS, Roe MT, Ohman EM, Gibler WB, Smith SC, Jr., Peterson ED, Becker RC. Discharge antithrombotic strategies among patients with acute coronary syndrome previously on warfarin anticoagulation: physician practice in the CRUSADE registry. *Am Heart J* 2008;155:361-8.
- (212) Coll-Vinent B, Pacheco G, Junyent M, Benito L, Hoyo J, Garcia A, Calvo N, Doltra A, Miro O, Sanchez M, Monteagudo J, Mont L. [Impact of implementing common guidelines at different care levels in a healthcare area on the improvement of atrial fibrillation treatment]. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:392-403.
- (213) Niska R, Han B. Anticoagulation for patients with atrial fibrillation in ambulatory care settings. *J Am Board Fam Med* 2009;22:299-306.
- (214) Gao F, Zhou YJ, Wang ZJ, Yang SW, Nie B, Liu XL, Jia dA, Yan ZX. Meta-analysis of the combination of warfarin and dual antiplatelet therapy after coronary stenting in patients with indications for chronic oral anticoagulation. *Int J Cardiol* 2011;148:96-101.
- (215) Zhao HJ, Zheng ZT, Wang ZH, Li SH, Zhang Y, Zhong M, Zhang W. Triple Therapy Rather Than Triple Threat. *Chest* 2011;139:260-70.
- (216) Samsa GP, Matchar DB, Goldstein LB, Bonito AJ, Lux LJ, Witter DM, Bian J. Quality of anticoagulation management among patients with atrial fibrillation: results of a review of medical records from 2 communities. *Arch Intern Med* 2000;160:967-73.
- (217) Lip GY, Huber K, Andreotti F, Arnesen H, Airaksinen JK, Cuisset T, Kirchhof P, Marin F. Antithrombotic management of atrial fibrillation patients presenting with acute coronary syndrome and/or undergoing coronary stenting: executive summary--a Consensus Document of the European Society of Cardiology Working Group on Thrombosis, endorsed by the European

Heart Rhythm Association (EHRA) and the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur Heart J* 2010;31:1311-8.

- (218) Lip GY, Huber K, Andreotti F, Arnesen H, Airaksinen KJ, Cuisset T, Kirchhof P, Marin F. Management of antithrombotic therapy in atrial fibrillation patients presenting with acute coronary syndrome and/or undergoing percutaneous coronary intervention/ stenting. *Thromb Haemost* 2010;103:13-28.
- (219) Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, Burton P, Cohen M, Cook-Bruns N, Fox KA, Goto S, Murphy SA, Plotnikov AN, Schneider D, Sun X, Verheugt FW, Gibson CM. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2012;366:9-19.
- (220) Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Reilly PA, Wallentin L. Newly identified events in the RE-LY trial. *N Engl J Med* 2010;363:1875-6.
- (221) Hohnloser SH, Oldgren J, Yang S, Wallentin L, Ezekowitz M, Reilly P, Eikelboom J, Brueckmann M, Yusuf S, Connolly SJ. Myocardial Ischemic Events in Patients With Atrial Fibrillation Treated With Dabigatran or Warfarin in the RE-LY (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy) Trial. *Circulation* 2012;125:669-76.
- (222) Uchino K, Hernandez AV. Dabigatran Association With Higher Risk of Acute Coronary Events: Meta-analysis of Noninferiority Randomized Controlled Trials. *Arch Intern Med* 2012.
- (223) Oldgren J, Budaj A, Granger CB, Khder Y, Roberts J, Siegbahn A, Tijssen JG, Van de Werf F, Wallentin L. Dabigatran vs. placebo in patients with acute coronary syndromes on dual antiplatelet therapy: a randomized, double-blind, phase II trial. *Eur Heart J* 2011;32:2781-9.
- (224) Alexander JH, Lopes RD, James S, Kilaru R, He Y, Mohan P, Bhatt DL, Goodman S, Verheugt FW, Flather M, Huber K, Liaw D, Husted SE, Lopez-Sendon J, De CR, Jansky P, Darius H, Vinereanu D, Cornel JH, Cools F, Atar D, Leiva-Pons JL, Keltai M, Ogawa H, Pais P, Parkhomenko A, Ruzyllo W, Diaz R, White H, Ruda M, Geraldles M, Lawrence J, Harrington RA, Wallentin L. Apixaban with antiplatelet therapy after acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2011;365:699-708.

## 9. Annex

En aquest annex s'hi pot trobar una còpia dels articles, acceptats o enviats per a revisió, en els que aquesta tesi doctoral s'ha basat en algun apartat.

Concretament, són els següents articles ja publicats o acceptats:

**Guasch E**, Sionis A, Reverter JC, Andrea R, Loma-Osorio P, Freixa X, Heras M. Safety issues of adjunctive clopidogrel in patients discharged after percutaneous coronary intervention with stent placement and requiring oral anticoagulation. *Int J Cardiol* 2011;146:e1-e4.

Benito B, Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, **Guasch E**, Shi Y, Tardif JC, Brugada J, Nattel S, Mont Ll. Cardiac Arrhythmogenic Remodeling in a Rat Model of Long-Term Intensive Exercise Training *Circulation* 2011;123:13-22.

Camm AJ, Al-Khatib SM, Calkins HJ, Halperin JL, Kirchhof P, Lip GYH, Nattel S, Ruskin J, Banerjee A, Blendea D, **Guasch E**, Needleman M, Savelieva I, Viles-Gonzalez J, Williams ES. A proposal for new clinical concepts in the management of atrial fibrillation. *Accepted at American Heart Journal*.

**Guasch E**, Mont Ll. Ranolazine: potential therapy for arrhythmias?. *Rev Esp Cardiol Supl* 2010(1):62A-72A.

Els següents articles han estat enviats per a revisió:

**Guasch E**(\*), Benito B(\*), Qi XY, Naud P, Shi Y, Tardif JC, Tadevosyan A, Chen Y, Gillis MA, Mont L; Nattel S. Mechanisms of Atrial Fibrillation Promotion by Long-Term Endurance Exercise: Exploration in a Rat Model. *Enviat per a revisió*.

Cardin S(\*), **Guasch E**(\*), Luo X, Naud P, Le Quang K, Shi Y, Tardif JC, Comtois P, Nattel S. Mechanisms of atrial remodeling in ischemic heart failure: Could miR21 be a novel pharmacological target in AF prevention? (\*) Co-primers autors. *Enviat per a revisió a Circulation Arrhythmia and Electrophysiology*.

Gay-Jordi G, **Guasch E**, Benito B, Brugada J, Nattel S, Mont Ll, Serrano-Mollar A. Losartan prevents heart fibrosis induced by long-term intensive exercise training in a rat model. (\*) Co-primers autors..